

# **Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo**

**Carlos Alberto de Almeida Serra**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em

**Medicina**

(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Luís Filipe da Fonseca Lopes da Silveira

Coorientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

**Maio de 2022**

(Versão definitiva, impressa no dia 30 de Maio de 2022 )



## **Edital**

As provas decorreram na Universidade da Beira Interior no dia 2 de Maio de 2022, pelas 15 horas.

O júri foi constituído pelo Doutor Luis Manuel Taborda Barata, professor catedrático da Universidade da Beira Interior, Doutor Paulo Sérgio de Matos Figueira da Costa, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Doutor António Taveira Gomes, professor associado convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Doutor António José da Silva Bernardes, professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Doutor José Augusto Rodrigues Simões, professor associado convidado da Universidade da Beira Interior.



## **Dedicatória**

Aos meus pais

Aos meus filhos

À minha família

Aos meus amigos

À Nini

Aos meus mestres

Aos meus colegas



## Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Luís Silveira, a minha imensa gratidão, pelo seu empenho, competência e amizade, essenciais para a concretização deste projeto.

Ao Prof. Doutor Manuel Carlos Lemos, coorientador, cuja experiência no meio académico foi um apoio fundamental em todo o processo.

Ao Dr. António Canudo, Diretor do Departamento de Cirurgia do Hospital dos SAMS, que participou em quase todos os atos cirúrgicos efetuados no âmbito deste projeto, cujo empenho foi decisivo para a difícil tarefa de realizar investigação clínica num hospital privado.

Ao Prof. Doutor Costa Martins, na sua dupla condição de Diretor do Departamento de Anestesiologia e Presidente da Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, pelo grande incentivo dado à realização deste projeto.

Este trabalho não seria possível sem a preciosa colaboração das Dras. Paula Guerra Marques (Coordenadora), Sara Turpin e Delfina Brito, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital dos SAMS, que, para além de fornecerem as peças que permitiram todo o estudo *in vitro* e de terem efetuado todas as análises anátomo-patológicas das peças operatórias das cirurgias humanas, desinteressadamente ocuparam parte dos seus tempos livres analisando as peças operatórias de cirurgia animal. Este agradecimento tem necessariamente de englobar os técnicos de anatomia patológica do Hospital dos SAMS, que procederam à preparação dos tecidos.

O processamento dos tecidos para exame de microscopia eletrónica foi efetuado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Prof. Doutor Fernando da Fonseca, sob supervisão da Dra. Rita Manso.

A observação dos tecidos ao microscópio eletrónico foi efetuada no Laboratório de Microscopia Eletrónica do Instituto Gulbenkian de Ciência, com a ajuda entusiástica da sua diretora, Prof<sup>a</sup> Doutora Erin Tranfield, apoio fundamental deste projeto desde o seu início.

As análises efetuadas na cirurgia experimental foram realizadas no Laboratório Affidea de Castelo Branco, graças ao empenho pessoal do Dr. Joaquim Machado Caetano, amigo de longa data e Diretor Técnico do grupo, e tendo o contributo fundamental da Dra. Sofia Jorge, Diretora Técnica do Laboratório, e técnicos de patologia do mesmo.

As cirurgias em modelo animal foram efetuadas no Biotério do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, dirigido pela Prof<sup>a</sup> Doutora Graça Baltazar e com a imprescindível colaboração das técnicas Maria João e Maria José.

As cirurgias em humano foram realizadas no bloco operatório do Hospital dos SAMS, com a colaboração de todos os seus elementos, anestesistas, enfermeiros e auxiliares de ação médica, a quem não poderia deixar de expressar a minha profunda gratidão.

Pela paciência e compreensão manifestadas, deixo especial agradecimento às enfermeiras instrumentistas Helena Antunes, Phyllis Annandale e Célia Santos.

Não posso também deixar de agradecer aos meus colegas Cirurgiões Gerais do Departamento de Cirurgia do Hospital dos SAMS, Drs. Luís Gasparinho, Eduardo Xavier e Joaquin Quiroga, o apoio e amizade sempre presentes.

Aos colegas e amigos Drs. Rui Tavares-Bello, Carlos Tavares-Bello e António Gomes agradeço o incentivo permanente, bem como a preciosa ajuda na revisão de vários artigos.

Outros colegas tiveram também um papel importante no desenvolvimento da minha carreira cirúrgica e na criação das condições técnicas e científicas que sustentaram a execução deste projeto, nomeadamente os Drs. Carlos Lopes, Rogério Matias e Joaquim Barbosa e o Prof. Doutor Joaquim Lopes Henriques.

As observações preliminares efetuadas no Departamento de Bioimagem do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa foram fundamentais para o início do projeto, e só foram possíveis graças à colaboração do seu responsável, Prof. Doutor José Rino.

Tendo este projeto uma componente Física importante agradeço aos Professores Doutores Luís Filipe Ferreira e Isabel Ferreira Machado, do Centro de Química-Física molecular, ao Prof. Doutor João Mendanha Dias, do Instituto de Plasmas e Fusão Nuclear, e à Mestre Joana Pinto dos Santos, do Centro de Tecnologia Nuclear do Instituto Superior Técnico, pela ajuda preciosa num campo em que o meu conhecimento é reduzido.

Ao meu filho João Miguel, Mestre em Engenharia Física e Tecnológica e Doutorando no Instituto Superior Técnico, agradeço a sempre pronta ajuda que me facilitou muito a compreensão do fenómeno físico que está na base do projeto.

À minha companheira, Maria do Rosário agradeço todo o incentivo, a preciosa colaboração na cirurgia animal, em que a sua formação em biologia foi fundamental e, sobretudo, a compreensão pelo tempo que este projeto sonhou ao convívio familiar.



## **Prefácio**

A evolução da cirurgia ao longo dos tempos esteve sempre na dependência da coragem e ambição de quem não se conformou ao imobilismo e procurou pela prática novos caminhos, muitas vezes à revelia do que parecia óbvio, não se furtando ao embate com o conhecimento vigente.

Essa dose de aventureirismo ajudou a que se enraizasse na comunidade científica a ideia, ainda hoje difundida, do cirurgião como alguém mais habilitado do ponto de vista prático, em oposição ao predomínio teórico que rege o exercício da generalidade das especialidades médicas.

A realidade não poderia contudo ser mais diferente, já que ao cirurgião atual se exigem profundos conhecimentos médicos sustentados por uma ampla base teórica, em que às tradicionais ciências básicas - anatomia, embriologia, fisiologia - se tornou necessário acrescentar várias outras, num espectro amplo que engloba ciências tão díspares como a genética e a ótica.

A necessidade crescente de uma precisão e rigor extremos levou nos últimos anos à emergência de um novo e desafiante campo na cirurgia, a cirurgia guiada pela imagem, da qual uma importante vertente é a cirurgia guiada pela fluorescência.

A empolgante possibilidade de discriminar intraoperatoriamente os vários tecidos pelas suas propriedades óticas, vem acrescentar uma nova dimensão ao ato cirúrgico, aumentando indiscutivelmente a qualidade e precisão desse ato.

Sendo uma área do conhecimento ainda pouco explorada são amplas as lacunas e longo o caminho a percorrer para o seu pleno desenvolvimento, envolvendo um esforço colaborativo multidisciplinar em que todos os contributos são importantes.

Ao abraçar este projeto tive de vencer não só as dificuldades intrínsecas do mesmo, como também as inerentes à realização de investigação clínica num hospital privado, pouco vocacionado para a mesma.

A ausência inicial de apoio institucional foi amplamente compensada pelo incentivo pessoal de todos aqueles que envolvi no projeto e pela sensação agradável de pioneirismo e exemplo, que levou a que outros colegas tenham ousado também iniciar projetos de investigação

clínica e percursos académicos, fomentando assim a desejável aproximação das instituições privadas de saúde à academia, com benefícios evidentes para ambas.

Se este trabalho, para além da contribuição para o conhecimento da autofluorescência das glândulas paratiroideias, contribuir também para o estreitamento da distância entre estes dois mundos sentir-me-ei plenamente realizado.



## Resumo

A identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias é sempre um desafio que se coloca aos cirurgiões, em cirurgia tiroideia e paratiroideia, pois as pequenas dimensões, coloração e forma destas glândulas tornam difícil a sua diferenciação de gânglios linfáticos, tecido adiposo e mesmo de pequenos nódulos tiroideus.

Em 2011, investigadores da Universidade de Vanderbilt descreveram pela primeira vez a autofluorescência das paratiroides quando submetidas a luz infravermelho próximo, propriedade potencialmente útil para a sua identificação intraoperatória.

No presente trabalho foram realizados vários estudos tentando contribuir para o aumento do conhecimento neste campo.

Tendo as glândulas paratiroideias e tiroide características próprias pela sua natureza secretória, tentámos em primeiro lugar assegurar a inocuidade da estimulação luminosa no padrão de secreção hormonal, em modelo animal. Dois grupos de ratos Wistar foram submetidos a incisão cervical para exposição da região tiro-paratiroideia, sendo um dos grupos irradiado com fonte de luz infravermelho próximo. Efetuaram-se colheitas sanguíneas para doseamentos de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH, cálcio e PTH no pré-operatório, 7 minutos após exposição e aos 30 e 60 dias do pós-operatório, nos animais de ambos os grupos. Não foram registadas diferenças significativas nos resultados analíticos dos dois grupos, sendo as pequenas alterações encontradas transitórias.

Noutro estudo procedeu-se ao exame histológico convencional e microscopia eletrónica das peças operatórias dos dois grupos (irradiado e controlo). Não foram encontradas diferenças estruturais ou ultraestruturais entre os tecidos de ambos os grupos.

Estes estudos permitem concluir que a irradiação da região cervical com luz infravermelho próximo, nas condições que permitem a sua identificação por autofluorescência, é inócua para os tecidos, não alterando o seu padrão de secreção.

Outra vertente deste trabalho teve como objetivo a demonstração da possibilidade de a autofluorescência das paratiroides poder ser detetada sem recurso a tecnologia dispendiosa, sendo estudada a utilização de um dispositivo de baixo custo baseado em óculos de visão noturna com a adequada filtração luminosa.

Este dispositivo foi testado *in vitro*, com análise de 32 peças operatórias, revelando-se muito eficaz na discriminação entre os tecidos ( $p < 0.001$ ).

Os estudos subsequentes, com utilização do dispositivo desenvolvido, orientaram-se para a utilização intraoperatória, contribuição para a validação da técnica.

- Quarenta peças operatórias de cirurgias tiroideias foram examinadas com recurso ao dispositivo acima referenciado, para identificação de tecido paratiroideu incidentalmente excisado, sendo os dados obtidos confrontados com o exame histológico. Foram detetados com o dispositivo sete dos oito fragmentos de paratiroides identificados no exame anatomopatológico, existindo um falso positivo (nódulo colóide), representando uma sensibilidade de 87,5 % e uma especificidade de 97,1 %. A presença de tecido paratiroideu na peça operatória não teve, contudo, repercussão nas taxas de hipocalcemia pós-operatória.

- Em cinco casos consecutivos de cirurgias por hiperparatiroidismo primário e exames de localização não concordantes, relativamente à localização superior ou inferior da glândula patológica, foi utilizada a autofluorescência como auxiliar na identificação das glândulas paratiroideias. O sistema permitiu a identificação de todas as glândulas procuradas, aumentando a confiança do cirurgião nessa identificação, refletindo-se na decisão de não proceder à exploração bilateral.

- Quarenta e cinco pacientes consecutivos submetidos a tiroidectomia total com utilização da autofluorescência para identificação das glândulas paratiroideias (grupo de estudo), foram comparados com os 60 doentes operados anteriormente pelo mesmo cirurgião sem utilização da autofluorescência (grupo controlo), sendo objetivos principais a avaliação da hipocalcemia e hipoparatiroidismo pós-operatórios, o número de paratiroides identificadas, bem como o número de paratiroides incidentalmente ressecadas.

Os pacientes no grupo de estudo apresentaram valores de hipoparatiroidismo significativamente inferiores ( $p = 0,044$ ). Apesar da redução observada neste grupo nos valores absolutos de cálcio e no número de pacientes com hipocalcemia, esta diferença não foi estatisticamente significativa. No grupo de estudo não existiram casos de hipocalcemia permanente, que ocorreu em três pacientes no grupo controlo.

O número de glândulas paratiroideias identificadas foi significativamente superior no grupo de estudo ( $p < 0.001$ ). A capacidade de o dispositivo identificar acuradamente glândulas paratiroideias inadvertidamente excisadas atingiu neste estudo uma sensibilidade de 100 % e uma especificidade de 87,5 %.

Sendo a autofluorescência das paratíroides um fenômeno pouco conhecido, desenvolvemos um estudo *in vitro* para avaliar a persistência da autofluorescência em glândulas submetidas a congelamento, aquecimento e fixação em formalina. Os resultados obtidos confirmaram a robustez do fenômeno, demonstrando-se a persistência da fluorescência mesmo após exposição a condições extremas.

Também no sentido de um melhor esclarecimento do fenômeno, procedemos a análises tecidulares com recurso a técnicas de Ground State Diffuse Reflectance Absorption Spectra e Laser induced luminescence, que, apesar de não terem fornecido pistas sobre a origem da autofluorescência, mostraram a existência de outros picos de emissão luminosa, passíveis de ser utilizados para a identificação das paratíroides, abrindo outro campo de investigação.

Do conjunto de todos os trabalhos desenvolvidos, concluímos que a autofluorescência das paratíroides na gama do infravermelho próximo, sendo inócua para os tecidos e não influenciando significativamente o padrão de secreção hormonal, poderá tornar-se uma ferramenta útil para a identificação intraoperatória das mesmas em cirurgia tiroideia e paratiroideia.

## **Palavras-chave**

Tiroide; paratiroide; autofluorescência; cirurgia; infravermelho próximo; hipocalcemia; hipoparatiroidismo.



## Abstract

Intraoperative identification of parathyroid glands represents a challenge for endocrine surgeons performing thyroid and parathyroid surgery. Differentiation from lymph nodes, fatty tissue or small thyroid nodules is not straightforward due to their small size, uncharacteristic shape and color.

In 2011 researchers from Vanderbilt university described for the first time the autofluorescence of parathyroid glands when submitted to a near infrared light, heralding a potentially useful property that may facilitate their intraoperative identification.

In this work, the authors present the relevant studies that contribute to the increasing knowledge of this field.

Bearing in mind the endocrine secretory nature of the thyroid and parathyroid glands, the authors tried to assure the innocuity of the light stimulation on the secretory pattern on an animal model. Two groups of Wistar rats were submitted to a cervical incision exposing the thyroparathyroid area. In one group the area was irradiated with a near infrared light, whereas in the other group no light stimulation was done.

Blood samples were collected before surgery, 7 minutes after irradiation, 30 days and 60 days after surgery for the evaluation of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH, total calcium and PTH. Results showed only mild and transient non-significant alterations.

In another study we analyzed the thyroparathyroid blocs of both irradiated and non-irradiated rats by conventional histology and by electron microscopy. No significant structural or ultra-structural alterations were found.

These studies suggest that near infrared irradiation of the cervical area is safe to the thyroid and parathyroid tissue from the secretory and morphological standpoint.

Another objective of our study was proving the hypothesis of parathyroid autofluorescence detection using simple technology devices, namely low cost goggle devices with appropriate filters. For this purpose, 32 operative samples were subjected to in vitro analysis, revealing a high efficacy in tissue discrimination ( $p < 0.001$ ).

Subsequent studies were directed to the intraoperative utilization of the device, contributing for validation of the technique.

- Forty operative samples of thyroid surgeries were examined with the near infrared device for identification of incidentally removed parathyroid tissue and the results were compared with the pathological report. The device detected seven of eight fragments of parathyroid tissue identified by pathological exam with one false positive (colloid nodule), representing a sensitivity of 87,5 % and a specificity of 97,1 %. Presence of parathyroid tissue on sample didn't affect post-operative hypocalcemia.

- In five consecutive surgeries for primary hyperparathyroidism with non-concordant localization studies regarding superior or inferior position of the diseased gland, we used the device as an ancillary tool for identification of the glands. All the glands sought were identified. The increased confidence on the correct identification of parathyroid glands by the surgeon supported the decision of not performing bilateral exploration.

- Outcomes of 45 consecutive patients submitted to total thyroidectomies using autofluorescence to identify parathyroid glands *in situ* (study group) were compared with the previous 60 patients operated by the same surgeon without using autofluorescence (control group). Main objectives were the evaluation of postoperative hypocalcemia and hypoparathyroidism, number of glands identified and number of incidentally removed parathyroid glands.

The study group had a significant reduction in the incidence of postoperative hypoparathyroidism ( $p=0,044$ ).

Despite being observed a reduction of postoperative hypocalcemia and higher postoperative serum calcium levels in the study group, no statistically significant differences were verified.

There were no cases of permanent hypocalcemia in the study group while 3 patients in the control group remained dependent of calcium supplementation for more than 6 months after surgery.

The number of parathyroid glands identified was significantly higher in the study group ( $p<0.001$ ). The capacity of the device to identify incidentally removed parathyroid glands achieved a sensitivity of 100 % and a specificity of 87,5 %.

As autofluorescence of parathyroid glands is a relatively unknown phenomenon we performed a study to evaluate *in vitro* the persistence of autofluorescence in parathyroid

glands submitted to heat, freezing and formalin fixation. Results confirmed the robustness of the phenomenon with persistence of autofluorescence even after exposition to extreme conditions.

In order to increase current understanding of autofluorescence the author also performed spectroscopy of parathyroid and thyroid glands using techniques of Ground State Diffuse Reflectance Absorption and Laser Induced Luminescence. In spite of not providing clues about the responsible fluorophore those works identified other spikes of fluorescence emission that can be potentially useful for identification of parathyroid glands, opening a new field of research.

The sum of our works allowed us to conclude that near infrared autofluorescence of parathyroid glands is harmless to the tissues and do not affect the glandular secretory pattern. As such, this technique may become a useful tool for intraoperative identification of parathyroid glands during thyroid and parathyroid surgeries.

## **Keywords**

Thyroid; parathyroid; autofluorescence; surgery; near infrared; hypocalcemia, hypoparathyroidism



# Índice

1	Introdução	1
1.1	Anatomia, embriologia, histologia e fisiologia da tiroide e paratiroide	3
1.1.1	Perspetiva histórica	3
1.1.2	Anatomia e embriologia	6
1.1.3	Histologia	10
1.1.4	Fisiologia	13
1.2	Cirurgia da tiroide e paratiroide	15
1.2.1	Cirurgia da tiroide	15
1.2.2	Cirurgia da paratiroide	22
1.2.3	Complicações da cirurgia da tiroide e paratiroide	25
1.3	Técnicas de identificação das glândulas paratiroideias em cirurgia tiroideia e paratiroideia	27
1.4	A fluorescência de infravermelho próximo – aplicações da fluorescência em cirurgia	35
1.5	A autofluorescência das paratiroides	39
2	Objetivos	43
3	Metodologia	45
4	Resultados – artigos publicados/submetidos	55
4.1	Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns	56
4.2	Evaluation of structural and ultrastructural changes in thyroid and parathyroid glands after near infrared irradiation - study on an animal model	65
4.3	Development of a low-cost portable device for identification of parathyroid glands using autofluorescence	78
4.4	Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device	84
4.5	Identification of inadvertently removed parathyroid glands during thyroid surgery using autofluorescence	87
4.6	Parathyroid identification by autofluorescence – preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism	94
4.7	Intraoperative identification of parathyroid glands by autofluorescence on total thyroidectomy - Does it really reduces	100

post-operative hypocalcemia?	
4.8 Persistence of autofluorescence of parathyroid glands submitted to heat, freeze and formalin.	106
4.9 Spectroscopic analysis of parathyroid and thyroid tissues by Ground-State diffuse reflectance and Laser Induced Luminescence: A preliminary report	111
5 Discussão	117
6 Conclusões e perspectivas futuras	129
7 Referências	131
8 Anexos	141



## Lista de Figuras

Figura 1	Retrato de Sir Richard Owen	3
Figura 2	Retrato de Ivar Sandstrom	4
Figura 3	Publicação original de Sandstrom	4
Figura 4	Ilustrações original de osteíte fibrosa cística de Von Recklinghausen	5
Figura 5	Origem embrionária das glândulas paratiroideias	6
Figura 6	Imagem intraoperatória captada em cirurgia da tireoide	7
Figura 7	Representação esquemática da região cervical (posterior) mostrando a localização mais comum das glândulas paratiroideias	8
Figura 8	Imagem intraoperatória de glândula paratiroide	9
Figura 9	Histologia de glândula paratiroideia humana	10
Figura 10	Células chefe de paratiroide de rato	12
Figura 11	Metabolismo do cálcio	13
Figura 12	Esboços anatômicos de Leonardo da Vinci	15
Figura 13	Fotografia de Theodore Kocher	17
Figura 14	Posicionamento do doente	20
Figura 15	Nível da incisão	20
Figura 16	Imagem intraoperatória de MIVAT	21
Figura 17	Inserção de trocar para TOETVA	22
Figura 18	Incisão para paratiroidectomia por abordagem “focada”	24
Figura 19	Imagem intraoperatória em cirurgia tiroideia	27
Figura 20	Imagem ecográfica mostrando adenoma da paratiroide inferior direita	28
Figura 21	Adenoma da paratiroide visualizado em TC-4D	29
Figura 22	Adenoma intratiroideu visualizado em Sestamibi-SPECT	30
Figura 23	Imagem intraoperatória em cirurgia de hiperparatiroidismo – adenoma da paratiroide superior direita	31
Figura 24	Utilização intraoperatória de gama-camara portátil	32

Figura 25	Diagrama de Jablonski	35
Figura 26	Dispositivo utilizado por Paras e cols	40
Figura 27	Gráfico de intensidade de fluorescência	40
Figura 28	Sistema IVIS Lumina	45
Figura 29	Bloco cervical suíno submetido a estimulação luminosa	46
Figura 30	Bloco esófago-traqueal submetido a estimulação luminosa	46
Figura 31	Imagem intraoperatória em cirurgia animal	48
Figura 32	Imagem ampliada de bloco tiroparatiroideu de rato mostrando autofluorescência das paratiroides	48
Figura 33	Fragmentos de gordura (F), tiroide (T) e paratiroide (P) captadas com câmara de infravermelhos, sob luz branca (esquerda) e LED 780 nm (direita)	50
Figura 34	LED 780 nm cm filtro bandpass 769 nm (esquerda). Dispositivo de visão noturna com filtro bandpass 710 nm (direita)	51

Nota: As figuras não referenciadas foram elaboradas ou captadas pelo autor, não estando sujeitas a direitos de autor.

Todas as figuras sem menção de autorização editorial permitem a reprodução não comercial (licenças CC BY-NC 2.0, CC BY-NC 3.0 ou CC BY 4.0) ou pertencem ao domínio público.



## Lista de Tabelas

Tabela 1	Padrão ecográfico, risco estimado de malignidade e indicação para PAAF de nódulos da tireoide	19
Tabela 2	Classificação de Bethesda	19
Tabela 3	<i>Guidelines</i> para tratamento do hiperparatiroidismo primário assintomático (4 <sup>th</sup> International Workshop for the management of asymptomatic hyperparathyroidism).	23



## Lista de Acrónimos

5-ALA	Ácido amino-levulínico
$^{99m}\text{Tc}$	Isómero nuclear meta-estável de tecnécio
aC	Antes de Cristo
ATA	American Thyroid Association
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio ionizado
CaSR	Calcium sensing receptors (recetores sensíveis ao cálcio)
CCD	Charge-couple device
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
cm	Centímetro ( $10^{-2}$ metros)
DSLR	Digital single lens reflex camera
DOCI	Dynamical optical contrast imaging
$\text{J}/\text{cm}^{-2}$	Joules por centímetro quadrado
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LSCI	Laser speckle contrast imaging
LED	Light emitting diode
M	Mol/litro (Concentração molar)
MIVAT	Minimally Invasive Video Assisted Thyroidectomy (Tiroidectomia videoassistida minimamente invasiva)
mm	Milímetros ( $10^{-3}$ metros)
NIFTP	Non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (Neoplasia folicular não invasiva da tiroide com aspetos nucleares papilares)
nm	Nanómetros ( $10^{-9}$ metros)
OTC	Tomografia de coerência ótica
PIII	Paratiroide inferior
PIV	Paratiroide superior

PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PC	Personal computer (computador pessoal)
PET	Tomografia de emissão de positrões
PTH	Paratormona, hormona paratiroideia
seg	Segundos
SPECT	Single photon emission computed tomography (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único)
RMN	Ressonância magnética nuclear
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
T3L e T4L	T3 livre, T4 livre
TC	Tomografia computadorizada
TSH	Thyroid stimulating hormone (Hormona estimuladora da tiroideia)
TOETVA	Transoral endoscopic Thyroidectomy Video Assisted (Tiroidectomia Videoassistida transoral endoscópica)
TTF1	Thyroid transcription Factor 1
UBI	Universidade da Beira interior
USA	United States of America (Estados Unidos da América)



# Capítulo 1

## Introdução

A identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias é uma das maiores dificuldades com que se deparam os cirurgiões, em cirurgia da tireoide e paratiroide.

As glândulas paratiroideias, habitualmente em número de quatro, situadas na proximidade da tireoide, com a qual compartilham a vascularização, são responsáveis pela secreção de paratormona (PTH), principal hormona reguladora do metabolismo do cálcio [1].

Sendo glândulas de muito pequenas dimensões e de coloração amarelo-acastanhada confundem-se facilmente com outros tecidos presentes na região cervical, como gânglios linfáticos ou gordura [2].

A sua origem embriológica nos 3º e 4º arcos branquiais e subsequente migração para localização cervical, possibilitam uma variabilidade anatômica que dificulta ainda mais a sua identificação [1].

O hipoparatiroidismo é a segunda complicação major da cirurgia da tireoide, após a lesão do nervo laríngeo recorrente, sendo, atualmente nos Estados Unidos, o principal motivo de litígio médico-legal relacionado com esta cirurgia, ocorrendo de forma transitória em 20 a 65 % dos casos e definitiva em 1 a 7,9 % [3-9].

Estes valores dão, provavelmente, uma ideia reduzida da dimensão do problema, já que a generalidade dos estudos são provenientes de serviços com casuísticas elevadas de cirurgia tireoideia e paratiroideia, onde a experiência dos cirurgiões se associa a um menor número de complicações [10, 11].

Sendo a grande maioria da cirurgia da tireoide praticada a nível mundial por cirurgiões com pequena casuística individual, a dimensão do problema será certamente maior, tornando pertinente o desenvolvimento de novos métodos que permitam ao cirurgião maior grau de certeza na identificação das glândulas paratiroideias, independentemente da sua experiência cirúrgica.

Esta questão torna-se ainda mais importante na cirurgia do carcinoma da tireoide, em que o cirurgião se vê, frequentemente, confrontado com a decisão de ressecar uma possível glândula paratiroideia ou deixar *in situ* um gânglio linfático potencialmente metastizado.

As técnicas atualmente disponíveis para localização das paratiroides são utilizadas, fundamentalmente, na cirurgia do hiperparatiroidismo, não tendo aplicação na cirurgia da tireoide, pelos custos associados e possibilidade de efeitos adversos.

A descrição por Paras, em 2011, da autofluorescência das paratíroides quando estimuladas por uma radiação luminosa na banda do infravermelho próximo, permitindo a sua distinção dos outros tecidos cervicais, abriu um novo campo de estudo, que poderá levar a uma modificação da prática da cirurgia tiroideia e paratiroideia [12].

Este estudo procura dar resposta a um conjunto de questões básicas, sustentando a utilização da autofluorescência na prática cirúrgica, envolvendo não só investigação clínica, como cirurgia em modelo animal e estudos com tecidos humanos *in vitro*.

## 1.1 Anatomia, embriologia, histologia e fisiologia da glândula paratiroideia

### 1.1.1 Breve perspectiva histórica

As glândulas paratiroideias têm um lugar impar na história da medicina, já que são, muitas vezes, consideradas o último órgão do organismo humano a ser descoberto [13].

Em 1862, o curador do Museu de História Natural de Londres, Sir Richard Owen (1804–1892) (Figura 1) descreveu “uma estrutura glandular pequena, compacta, amarela, anexa à tiroide no ponto de onde emergem as veias”, durante a realização de autópsia a um rinoceronte branco asiático falecido no Regent Park Zoo [14, 15].



Figura 1 – Retrato de Sir Richard Owen

(Adaptado de Wellcome Library. <https://wellcomecollection.org/works/vsg2hf5j> sob licença CC BY 4.0)

Em 1863, Rudolph Virchow (1821-1902), o pai da anatomia patológica, pode ter identificado uma glândula paratiroideia, ao descrever uma estrutura na região cervical, enfatizando não se tratar de uma glândula tiroideia acessória, de um gânglio linfático ou de qualquer outra estrutura que lhe fosse familiar.

Curiosamente esta descoberta não teve repercussão imediata, nem foi, à data, devidamente valorizada [16].

Só em 1880, um jovem estudante de Medicina da Universidade de Uppsala, Ivar Sandström (1852-1889) (Figura 2), no seu trabalho “Descoberta de uma nova glândula no homem e em diversos mamíferos” (Figura 3) descreveu a presença da glândula em vários animais, confirmando depois a existência da mesma em humanos. Deu à nova estrutura o nome de *glandulae parathyroidae* [13, 16, 17].



Figura 2 – Retrato de Ivar Sandström [17]  
(Adaptado de Welcome Library;  
<https://wellcomecollection.org/works/vsg2hf5j>  
sob licença CC BY 4.0)

UPSALA LÄKAREFÖRENINGENS  
FÖRHANDLINGAR

Band. XV. 1879—1880. Nr 7 & 8.

Fredagen den 6 Mars.

SANDSTRÖM, Glandulae parathyroidae. — BLIX, Myograf. — SANDSTRÖM, Prostata-preparat. — WIDE, Lefver-preparat. — HOLM-GREN, Retinaströmmen. — Svar till H. Cohn om färgblindheten. — Föreningens yttrande mot K. Wicksells föredrag om dryckenskap.

1. Om en ny körtel hos människan och åtskilliga däggdjur

af

IVAR SANDSTRÖM.

För snart tre år sedan påträffade jag å sköldkörteln af en hund en liten, knappt hampfröstor bildning, som låg innesluten

Figura 3 – Publicação original de Sandström [17]  
(Adaptado de Vermeulen AHM, The birth of endocrine pathology. Virchows Arch 2010, 457, 283-90  
sob licença CC BY-NC 2.0)

A publicação num jornal de circulação limitada, fez com que o seu trabalho fosse pouco valorizado durante muitos anos, o que ajudou ao agravamento da doença mental de que padecia e o levou ao suicídio aos 37 anos [13].

Os trabalhos de Eugene Gley (1857-1930), de Paris, mostrando a associação entre tetania e morte em cães submetidos a tiroidectomia, quando as glândulas descritas por Sandström eram também excisadas, vieram, tardiamente, dar importância à descoberta do jovem estudante sueco [14, 18].

Vários trabalhos mostraram depois que as alterações neuromusculares, que se desenvolvem em animais tiroidectomizados, podem ser prevenidas pela transplantação daquelas glândulas [14].

O reconhecimento do papel das glândulas paratiroideias no metabolismo do cálcio demorou, contudo, mais alguns anos [14].

Em 1891, Friedrich von Recklinghausen (1833 -1910), de Strasbourg, descreveu o caso de um paciente com múltiplas fraturas ósseas por traumatismos *minor* e que desenvolveu posteriormente deformação dos ossos longos com fibrose extensa, quistos e “tumores castanhos”. Este conjunto de manifestações foi denominado “osteíte fibrosa cística de von

Recklinghausen” [14] (Figura 4), mas este autor não correlacionou a doença óssea com alguma alteração das paratiroides [14, 16].

Esta correlação foi feita em 1908, através dos trabalhos de Jakob Erdheim (1874-1937), de Viena, que, ao examinar as glândulas paratiroideias de doentes falecidos de doenças ósseas, descobriu a existência de glândulas aumentadas em pacientes com osteomalacia e osteíte fibrosa, tendo, contudo, atribuído este aumento a compensação secundária à doença óssea [16, 17].

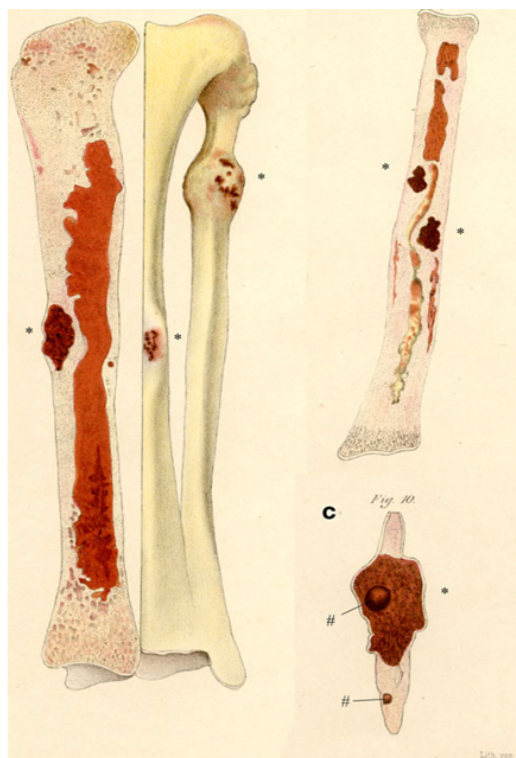


Figura 4 – Ilustração original de Osteíte fibrosa cística de von Recklinghausen [17]

(Adaptado de Vermeulen AHM, The birth of endocrine pathology. Virchows Arch 2010, 457, 283-90 sob licença CC BY-NC 2.0)

Só em 1915, Friedrich Schlagenhauer (1866–1930), de Viena, sugeriu que uma paratiroide aumentada poderá ser a causa de doença óssea e não consequência desta, apresentando dois casos de pacientes com osteomalacia a quem foram encontrados tumores da paratiroide, em autópsia, sendo o primeiro a sugerir que a cirurgia poderia, ao extrair a glândula patológica, curar a doença óssea [19].

Durante muitos anos atribuiu-se a Felix Mandl (1892–1957), também de Viena, a remoção do primeiro tumor da paratiroide em 1925, sob anestesia local, num paciente com Doença de von Recklinghausen grave, cuja sintomatologia melhorou rapidamente [15, 20]. Existe contudo evidência da excisão de um quisto da paratiroide em 1909 e da excisão de um tumor da paratiroide em 1917, por John Bland-Sutton (1855-1936), no Middlesex Hospital, de Londres [15].

### 1.1.2 - Anatomia e embriologia

No desenvolvimento embrionário, as glândulas paratiroideias (Figura 5), bem como o timo, têm origem endodérmica, desenvolvendo-se da asa dorsal das 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> bolsas faríngeas [21-24].

A glândula tiroideia tem origem a partir de um divertículo localizado na parede ventral mediana da faringe primitiva, migrando caudalmente até à sua posição cervical, que atinge cerca da 7<sup>a</sup> semana de gestação. Parte da tiroide tem origem nas 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> bolsas faríngeas. As células da crista neural destas bolsas (corpo ultimobranquial) darão origem às células C, parafoliculares, produtoras de calcitonina [1, 22].

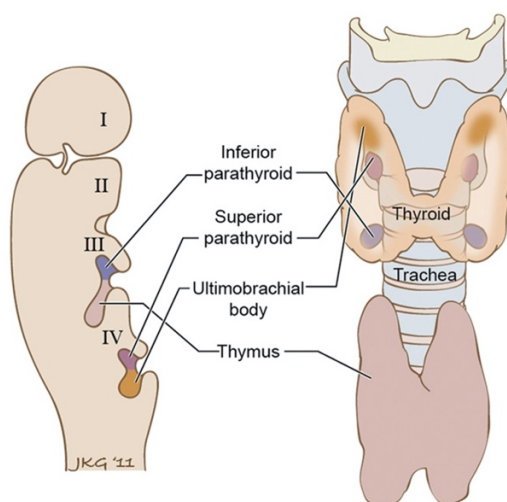


Figura 5 – Origem embrionária das glândulas paratiroideias [1]

(Adaptado de Policeni BA, Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Semin Ultrasound CT MR* 2012, 33(2):104-114 sob autorização de Elsevier)

As paratiroideias inferiores têm origem na 3<sup>a</sup> bolsa faríngea (porção dorsal), originando-se o timo da porção ventral da mesma bolsa [22, 24].

Esta relação das glândulas inferiores com o timo explica a maior variabilidade na localização destas e maior tendência à ectopia, pela extensa migração do timo até à sua posição definitiva no mediastino superior [1, 22].

As paratiroideias superiores têm origem na 4<sup>a</sup> bolsa faríngea, juntamente com o corpo ultimobranquial, que dará origem a parte da tiroide conforme referido [22].

Durante a 5<sup>a</sup> ou 6<sup>a</sup> semanas de gestação dá-se a migração caudal das paratiroides, juntamente com o timo e corpo ultimobranquial [1].

A regressão cefálica do timo leva à sua separação da paratiroideia inferior, habitualmente ao nível do polo inferior da tiroide ou do ligamento tiro-tímico [22].

No ser humano existem, normalmente, quatro glândulas paratiroideias, duas de cada lado, (80–97 %), variando a existência de glândulas supranumerárias entre 2,5 e 13 %, segundo as séries [2, 21, 25-27].

A existência de três ou menos glândulas é muito mais rara <3 %, sugerindo mais falha na identificação da quarta glândula que inexistência da mesma [2].

Na maioria dos indivíduos em que se encontraram mais de quatro paratiroides, geralmente, as supranumerárias são rudimentares ou divididas (resultantes da divisão de uma única glândula no desenvolvimento embrionário) [2].

Em cerca de 80 % dos casos existe simetria das glândulas superiores com as glândulas do lado oposto, o que também acontece em 70 % das paratiroides inferiores [21]. Simetria relativa de todas as quatro glândulas acontece em 60 % dos casos [2].

A agenesia das paratiroides é uma entidade muito rara, ocorrendo como parte da Síndrome de DiGeorge, que se manifesta por múltiplas malformações faciais, hipoplasia da tiroide, hipoparatiroidismo e alterações cardíacas. Estas alterações são condicionadas por uma ausência completa ou parcial das 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> bolsas faríngeas e dos seus derivados: timo, paratiroides e células C [28].

As paratiroides normais apresentam uma coloração variável entre o amarelo pálido e o castanho avermelhado, estando esta coloração na dependência do tipo de células maioritária: células de gordura ou células parenquimatosas [2] (Figura 6).

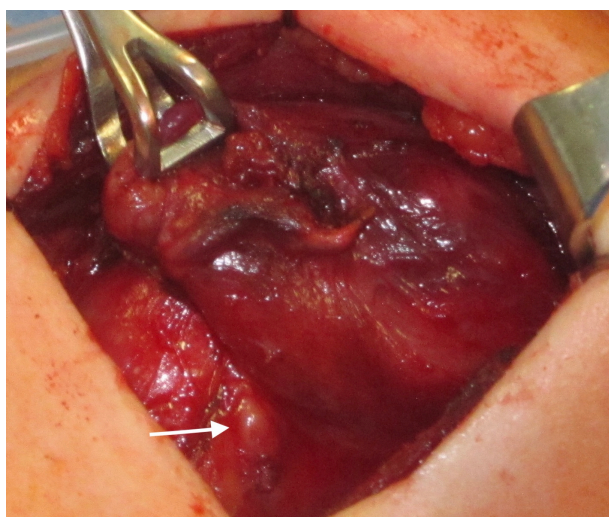


Figura 6 – Imagem intraoperatória captada em cirurgia da tiroide (seta aponta para glândula paratiroideia)

As formas mais comuns são a oval, reniforme ou esférica (em conjunto 83 %).

Mais raras são as glândulas bilobuladas ou multilobuladas [2].

As dimensões das glândulas normais variam entre os 5 e os 10 mm de comprimento por 2 a 5 mm de largura, pesando habitualmente entre 20 e 40 mg (variando entre os 10 e os 70 mg) [2, 21, 29].

A maioria (80 %) das glândulas paratiroideias superiores localizam-se numa área circunscrita, com cerca de 2 cm de diâmetro e 1 cm acima do cruzamento entre a artéria tiroideia inferior e o nervo laríngeo recorrente, muitas vezes contidas na fáscia que liga o lobo tiroideu à faringe, livremente móveis em relação à cápsula tiroideia, sendo rara a existência de uma ligação forte a esta cápsula [2, 22] (Figura 7).

Localizações inferiores ou superiores a esta área são raras (4 e 2 %, respetivamente), o mesmo acontecendo relativamente a localizações ectópicas nos espaços retrofaríngeos e retroesofágicos (1 %) [2].

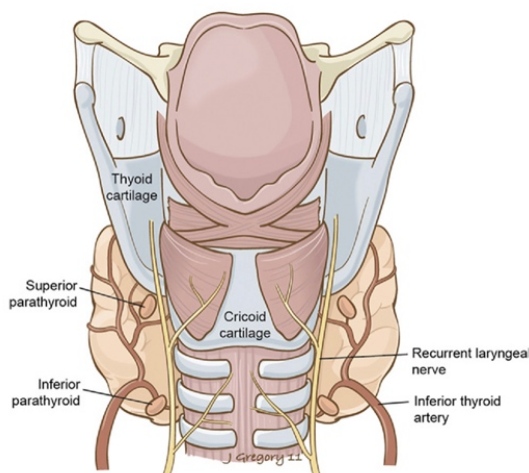


Figura 7 – Representação esquemática da região cervical (posterior) mostrando a localização mais comum das glândulas paratiroideias [1]

(Adaptado de Policeni BA, Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Semin Ultrasound CTMR* 2012, 33(2):104-114 sob autorização de Elsevier)

Ainda mais raras são as localizações verdadeiramente intratiroideias (0,2 %), sendo que a maioria das situações de aparente localização intratiroideia representam glândulas localizadas entre nódulos tiroideus, com um plano de clivagem definido [2, 30].

A distribuição das glândulas paratiroideias inferiores tem maior variabilidade, sendo que a maioria (61 %) localizam-se inferior, posterior ou lateralmente ao polo inferior da tireoide, algumas das quais em contacto íntimo com a cápsula tiroideia, da qual são, contudo, destacáveis [2].

Também as glândulas inferiores podem ter uma localização internodular, mimetizando uma situação intratiroideia, não se encontrando verdadeiras glândulas paratiroideias inferiores dentro da cápsula tiroideia [2].

Outras localizações frequentes das glândulas inferiores são o ligamento tiro-tímico (banda fibrosa que liga o polo tiroideu inferior e o corno superior do timo) e a porção cervical do timo [2].

Localizações mediastínicas são raras: timo-mediastínicas (2 %); mediastínicas abaixo do timo (0,2 %) [2].

A ausência de migração completa de uma glândula inferior durante o desenvolvimento embrionário, pode deixar a glândula em posição superior no pescoço, mesmo acima do polo superior da tireoide. Estas glândulas distinguem-se das superiores pela existência de um halo de tecido tímico a rodeá-las [2].

A maioria das glândulas, tanto superiores como inferiores, estão intimamente relacionadas com a cápsula tiroideia, da qual podem ser dissecadas livremente [2, 30] (Figura 8).

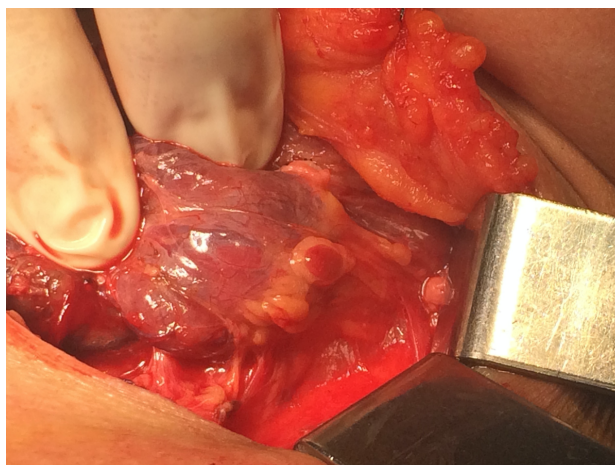


Figura 8 – Imagem intraoperatória de glândula paratiroideia, intimamente ligada à tireoide

A irrigação das glândulas paratiroideias está na dependência de ramos da artéria tiroideia inferior. Alguns ramos colaterais provenientes das artérias tiroideias superior e tiroideia ima, bem como de artérias laríngeas, traqueais, esofágicas e tímicas, podem também contribuir para a irrigação arterial das glândulas [1, 22, 31].

A drenagem venosa faz-se para os plexos tiroideus, efetuando-se a drenagem linfática para os gânglios cervicais profundos e paratraqueais [23, 32].

As paratiroides são inervadas por ramos derivados do gânglio simpático cervical médio ou superior, direta ou indiretamente através de um plexo na fáscia da superfície posterior da tireoide. Estes nervos são vasomotores, não tendo qualquer função na secreção hormonal [32, 33].

As glândulas paratiroideias existem em todos os vertebrados adultos, variando, contudo, em número e posição [34].

Os mamíferos têm habitualmente quatro glândulas, enquanto outros tipos de animais têm seis. Os ratos são uma das exceções, já que têm um único par de glândulas, localizadas junto à tireoide, podendo existir, contudo, paratiroides ectópicas [35-37].

Também o porco só tem um par de paratiroides, neste caso afastadas da tireoide, perto da inserção na porção cervical do timo de um ramo arterial proveniente da artéria carótida interna [35].

O coelho tem quatro glândulas, sendo duas localizadas junto à tiroide e duas no plano fascial entre os músculos esternohioideus e esternotiroideu e a artéria carótida [35].

### 1.1.3 - Histologia

As paratiroides humanas estão revestidas por uma cápsula fibrosa, em continuidade com a cápsula da tiroide. Finas extensões da cápsula entram na glândula, dividindo-a em pequenos lóbulos [37-40].

São extremamente vascularizadas, existindo dentro das glândulas uma rede de arteríolas, vénulas e capilares [31].

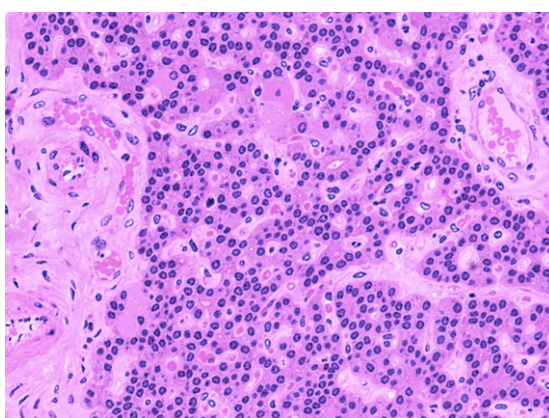


Figura 9 – Histologia de glândula paratiroideia humana

Estão presentes dois tipos de células na paratiroide normal [37] (Figura 9):

- Células-chefe – que sintetizam e libertam hormona paratiroideia. Estas células são pequenas e parecem escuras quando carregadas de PTH, clareando quando libertam esta hormona [35, 37].
- Células oxifílicas – mais claras, que aumentam de número com a idade, com função desconhecida [35, 37].

Existem diferenças significativas entre as glândulas de crianças e adultos.

Nas crianças as paratiroides são mais celulares com poucas células estromais de colagénio ou gordura [39, 41].

Perto da puberdade o número de células estromais adiposas começa a aumentar, mantendo-se este aumento no mínimo até à terceira década [38, 41].

Não existem, normalmente, células oxifílicas (oncocíticas) na criança [38-41].

As células-chefe são pequenas e têm citoplasma fracamente eosinófilo, com menos gordura intracelular que as células adultas [39, 41].

As glândulas paratiroideias adultas têm predomínio de células-chefe, que são maiores e com mais gordura intracitoplasmática que as presentes nas crianças [41].

Os núcleos são redondos e hiper cromáticos, com um padrão grosseiro de cromatina, típico das células neuro-endócrinas. O citoplasma é anfófilo, levemente eosinófilo ou claro [41].

As células parenquimatosas das glândulas adultas agrupam-se em grupos sólidos, cordonais, em forma de ninho ou em estruturas tipo foliculares, intercalados por tecido estromal [41].

As estruturas tipo foliculares contém muitas vezes material eosinófilo PAS positivo semelhante a coloide, não sendo, contudo, este material imunorreativo para a tiroglobulina ou TTF1 (Thyroid transcription factor 1). Esta substância assemelha-se muito ao amiloide tanto em microscopia ótica como eletrônica [41].

Proeminentes gotículas lipídicas estão presentes em 70-80 % das células-chefe [41].

As células-chefe secretoriamente ativas contém menor conteúdo lipídico no citoplasma, contendo mais grânulos secretórios, evidenciados em colorações de prata ou cromogranina [41].

A percentagem de gordura representa cerca de 50 % do volume estromal, sendo, habitualmente, maior na mulher [41].

O conteúdo em gordura do estroma é afetado por diversas variáveis, incluindo nutrição, estado de saúde global, morfotipo e hereditariedade [41].

As células oncocíticas podem formar nódulos ou agrupar-se em pequenos grupos entre as células-chefe [39-41].

O número relativo deste tipo de células, bem como a tendência para a sua agregação em nódulos aumenta com a idade [41].

As células transicionais parecem representar uma fase intermédia de transição de células-chefe para oncocíticas [41].

Existe um terceiro tipo de células nas glândulas paratiroideias – células claras – raramente presentes em glândulas humanas normais, estando associadas a hiperplasia ou adenoma.

Noutros animais, como o coelho ou o hamster, as células claras podem ser encontradas em glândulas normais [31, 35].

As glândulas paratiroideias do rato são compostas apenas por células-chefe. A presença deste tipo de células com colorações claras ou escuras podem ocorrer em ratos adultos, associando-se a diferentes estádios funcionais [42, 43] (Figura 10).

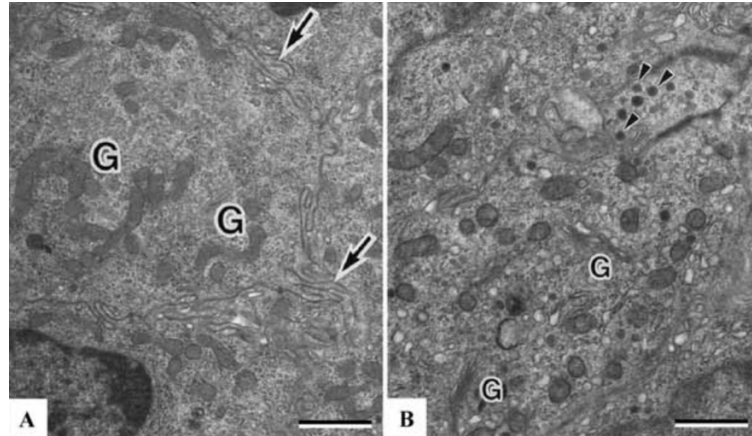


Figura 10 – Células chefe de paratiroide de rato em estágio inativo (A) e ativo (B). Note-se o retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido no estágio ativo (seta) e complexos de Golgi (G) pouco desenvolvidos face ao estágio ativo, que se caracteriza também pela presença de numerosos grânulos de secreção (ponta de seta) [31].

(Adaptado de Chen HS, T. Emura, S. Kubo, K.: An Update on the structure of the parathyroid gland. *The Open Anatomy Journal* 2013, 5:1-9 sob licença CC BY – NC 3.0)

As células-chefe no rato têm forma poligonal, organizando-se em cordões ou lâminas rodeadas por fino estroma de tecido conjuntivo e rede capilar [35, 42, 43].

Nas colorações de rotina apresentam-se com citoplasma granuloso, rodeado por uma membrana celular quase imperceptível. O núcleo é redondo ou oval com cromatina finamente dispersa [42].

Por microscopia eletrônica de transmissão, a membrana plasmática das células-chefe do rato é lisa do lado basal. Lateralmente as células conectam-se por desmossomas ou *tight junctions*. O núcleo, de localização basal é muitas vezes indentedo e de média densidade eletrônica [42].

O complexo de Golgi é bem desenvolvido e situa-se, à semelhança dos grânulos secretórios, na porção apical da célula [42].

Entre os grânulos secretórios podem ser individualizados dois tipos:

- Grânulos pequenos com grande halo (100–400 nm de diâmetro)
- Grânulos grandes com halo menor (500-700 nm) [42].

Mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e ribossomas livres encontram-se dispersos pelas células-chefe, sendo as mitocôndrias das paratiroides do rato estruturas longas e onduladas [42].

#### 1.1.4 - Fisiologia

As glândulas paratiroideias têm papel fundamental na regulação do metabolismo do cálcio no organismo, através da secreção de paratormona (PTH), hormona antagonista da calcitonina produzida pelas células C da tiroide [44, 45].

A homeostasia do cálcio é um processo complexo (Figura 11), envolvendo quatro componentes: cálcio sérico, fósforo sérico, 1,25–dihidroxitamina D3 e PTH [44].

Da homeostasia do cálcio extracelular dependem muitos processos fisiológicos, como a contração muscular, a coagulação sanguínea e a atividade sináptica [44].

Mais de 99 % do cálcio do organismo está depositado nos ossos, sob a forma de sais (fosfato e hidróxidos, predominantemente hidroxiapatite), só estando uma pequena porção de cálcio, para trocas, no soro [44].

A PTH é um polipeptídeo contendo 84 aminoácidos, segregado pelas paratiroides [44, 46-48].

O controlo da secreção de PTH pelo cálcio extracelular é mediado por um recetor existente na superfície das células paratiroideias – *calcium sensing receptor* (CaSR) – uma proteína G, descrita inicialmente por Brown [44-46, 49]. Este recetor exerce uma ação negativa na secreção de PTH: um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular leva à inibição da secreção de PTH [46, 50, 51]. Os CaSR também inibem a proliferação celular das células paratiroideias [51].

A PTH atua fundamentalmente nos rins, osso e intestino [46, 50, 51].

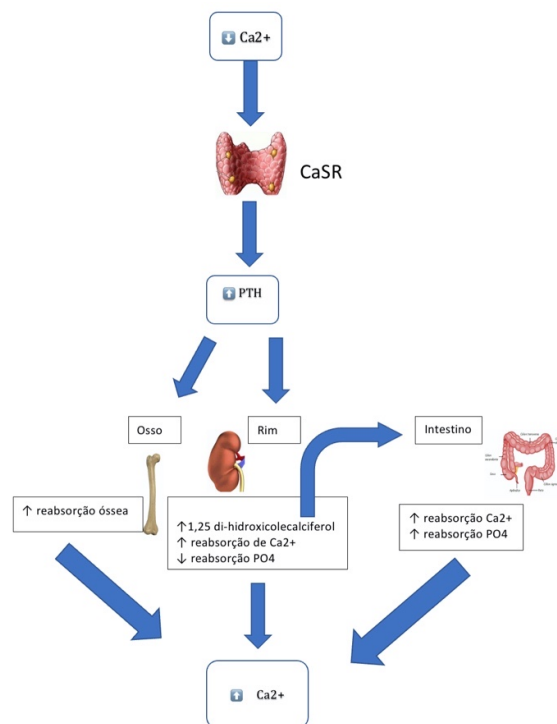


Figura 11 – Metabolismo do cálcio

A principal resposta do rim à PTH é o aumento da reabsorção de cálcio e da excreção de fosfato, bloqueando a reabsorção de fosfato nos túbulos proximais e promovendo a reabsorção de cálcio na ansa de Henle, túbulos distais e túbulos coletores [44, 46, 50, 51].

A ação da PTH na absorção de cálcio ósseo ocorre por duas formas [44, 48, 50, 51]:

- Uma fase rápida - que leva a um aumento do cálcio sérico em minutos – que ocorre ao nível dos osteoclastos e osteócitos.
- Uma fase lenta - que ocorre em dias – com dois componentes: primeiro os osteoclastos são ativados para digerir o osso; e, secundariamente, ocorre proliferação dos osteoclastos, sendo esta ativação aparentemente estimulada por citocinas libertadas por osteoblastos e osteócitos ativados ou por diferenciação de precursores osteoclastos imaturos, células que possuem recetores de membrana sensíveis à PTH e Vitamina D, inexistentes nos osteoclastos maduros [44, 50].

A PTH também é responsável pela conversão da 25-hidroxivitamina D no seu metabolito ativo 1,25-dihidroxivitamina D, através da ativação da enzima 1-hidroxilase nos túbulos proximais [44, 50].

Os CaSR também existem nas células tubulares renais, onde inibem a conversão da 25-hidroxivitamina D em 1,25-dihidroxivitamina D e têm ação supressora direta na reabsorção de cálcio, o que em conjunto com a diminuição da secreção de PTH, na hipercalcemia maximiza a excreção renal de cálcio [44, 51].

Os CaSR são também expressos nas células ósseas – osteoblastos, precursores osteoclásticos e mesmo em alguns osteoclastos maduros [51].

Também existe expressão dos CaSR na tiroide, intestino, medula óssea, cérebro, pele, pâncreas, coração e pulmões [51].

A principal ação da 1,25-dihidroxivitamina D é a promoção da absorção de cálcio, estimulando a formação de *calcium-binding-protein* nas células epiteliais intestinais. A vitamina D também promove a absorção intestinal de ião fosfato [44].

No osso a vitamina D pode ter um papel sinérgico com a PTH na estimulação da proliferação osteoclástica e na reabsorção óssea [44].

Comparado com a PTH, os efeitos regulatórios da Vitamina D, no balanço do cálcio, são muito mais lentos [50, 51].

## 1.2 Cirurgia da tireoide e paratiroide

### 1.2.1 Cirurgia da tireoide

Apesar do reconhecimento do bócio como doença, desde os primórdios da história escrita, e da sua natureza endêmica em várias regiões do mundo, a primeira cirurgia da tireoideia de que existem registos remonta ao século V aC, efetuada em Bagdad por Abdul Kasan Kelebis Abis, tendo o doente sobrevivido à grande hemorragia ocorrida [52-54].

Depois desse procedimento, foram-nos chegando outros relatos de intervenções sobre a tireoide ao longo dos tempos, apesar da fraca compreensão sobre a anatomia da glândula. Só no Renascimento apareceram os primeiros desenhos anatómicos da tireoide, por Leonardo da Vinci (Figura 12), mantendo-se contudo um grande desconhecimento da fisiologia da glândula, que persistiu até ao início do século passado [18, 55].



Figura 12 – Esboços anatómicos de Leonardo da Vinci [55]

(Adaptado de Ignjatović M: The thyroid gland in works of famous old anatomists and great artists. *Langenbecks Arch Surg* 2010, 395(7):973-985 sob autorização Springer)

A histórica audácia que sempre existiu na cirurgia levou, na tentativa de minorar o sofrimento causado essencialmente pelos bócios volumosos, à realização de excisões cirúrgicas mesmo antes da fisiologia da tireoide ser entendida e do desenvolvimento da anestesia.

Esses procedimentos eram na maioria das vezes associados a hemorragia massiva, infeção e lesão das estruturas adjacentes, tendo altas taxas de mortalidade [18]. Em 1866, Samuel

Gross (1805-1884) escreveu, a propósito da tiroidectomia: “*Every step he (the surgeon) takes will be environed with difficulty, every stroke of his knife will be followed by a torrent of blood, and lucky will it be for him if his victim lives long enough to enable him to finish his horrid butchery*”<sup>1</sup> [18, 52].

Não surpreende assim que a tiroidectomia tenha sido um dos poucos procedimentos cirúrgicos banidos pela Associação Francesa de Cirurgia [52].

Theodore Billroth (1829-1894) referiu-se, em 1881, à cirurgia da tiroide como “*a matter of no little difficulty and danger*”<sup>2</sup> [18].\*

Ao tempo de Billroth existiam três tipos principais de cirurgias da tiroide [18, 52]:

- . Sem corte – punções, cauterizações, injeções;
- . Com corte sem remoção de tecido – ligação arterial ou secção do músculo esternocleidomastoideu ou da fáscia cervical para aliviar sintomas de compressão;
- . Enucleação e ligação vascular – em que nódulos eram enucleados com ligação de vasos e tecidos para tentativa de controlo da hemorragia.

Theodore Billroth observou uma alta taxa de mortalidade associada à cirurgia da tiroide, resultante sobretudo da sepsis, situação que só a adoção das técnicas de assepsia e antisepsia, descritas por Joseph Lister, veio alterar [18, 52, 53].

Este facto levou a que Billroth se recusasse a operar a glândula tiroideia exceto em situações de emergência [18, 52].

O ponto de viragem na cirurgia da tiroide aconteceu no final do século XIX com Theodor Kocher (1841-1917) (Figura 13), que desenvolveu técnicas cirúrgicas inovadoras e, utilizando as novas técnicas de antisepsia, tornou segura uma cirurgia, até então, quase letal [18, 52, 53].

A evolução da cirurgia da tiroide por Kocher assentou em quatro pilares fundamentais [18, 52]:

- Anestesia local com cocaína (inicialmente usava anestesia geral com clorofórmio, que abandonou após um caso de morte atribuída ao fármaco);
- Conhecimento profundo da anatomia;
- Antissepsia rigorosa;
- Dissecção meticulosa com cuidado extremo na hemóstase.

Tais cuidados levaram a uma diminuição da mortalidade para menos de 1 %, permitindo o alargamento da indicação cirúrgica a casos menos emergentes [18, 52].

---

<sup>1</sup> “*Cada passo que dá estará rodeado de dificuldade, cada golpe do seu bisturi será seguido por uma torrente de sangue. Afortunado será se as suas vítimas viverem tempo suficiente que lhe permita terminar a sua horrível carnificina*”

<sup>2</sup> “*Assunto de dificuldade e perigos não pequenos*”



Figura 13 – Fotografia de Theodor Kocher  
(National Institute of Health, Estados Unidos da América ) Domínio público

O alargamento do conhecimento sobre a fisiologia da tiroide e a sua relação com os sintomas, ocorrido a partir do século XIX permitiram novos avanços na cirurgia da tiroide [18, 52, 53].

Doentes submetidos a tiroidectomia total sofriam com frequência de sintomas causados pela ausência de hormonas tiroideias, situação descrita e denominada por Kocher de “caquexia thyreopriva” e que o levava a não concordar com a realização de tiroidectomias totais [18, 52, 53].

Os trabalhos de Kocher sobre fisiologia, patologia e cirurgia da tiroide valeram-lhe a atribuição do Prémio Nobel da Medicina em 1909 [18, 52, 53].

Em 1907, Charles Mayo (1865–1939) utilizou pela primeira vez o termo hipertiroidismo, para descrever a sintomatologia causada pelo excesso de produção hormonal pela tiroide, que tratava por tiroidectomia [18, 52, 53].

Os sintomas associados à falta de secreção hormonal pós-tiroidectomia<sup>1</sup> eram, à época, evitados por extratos de tiroide animal [18, 52].

A possibilidade de dosear as hormonas tiroideias, o diagnóstico citológico e a produção de hormonas tiroideias de síntese, foram outros importantes marcos na cirurgia da tiroide [52, 53], que passou em poucas dezenas de anos de um procedimento proscrito a uma das mais admiradas cirurgias, glorificada por Halsted numa das mais empolgantes frases da história da cirurgia:

*The extirpation of the thyroid gland for goiter typifies perhaps better than any other operation the supreme triumph of the surgeon's art [56]<sup>3</sup>*

#### Indicação operatória

A cirurgia da tiroide está indicada em casos de suspeita de lesão maligna (ou lesão maligna confirmada), aumento da glândula com sintomas compressivos, hiperfuncionamento ou razões cosméticas [57-60].

A descoberta de um nódulo tiroideu com mais de 1 cm, em exame físico ou, mais frequentemente, em exame ecográfico, deve fazer iniciar um processo de vigilância que, face às características ecográficas do nódulo, deverá passar pelo doseamento de TSH, realização de biópsia aspirativa com agulha fina ou vigilância ecográfica periódica [57, 58].

Valores de TSH diminuídos são indicação para realização de cintigrafia com I131, para caracterização funcional do nódulo e doseamento de T3L e T4L [57, 58].

A existência de hiperfixação de radioisótopo – nódulo quente – exclui, quase completamente, a possibilidade de malignidade [57].

As *guidelines* da ATA (American Thyroid Association), de 2015, valorizam as características ecográficas do nódulo (Tabela 1), para além do seu tamanho, para a definição da vigilância dos nódulos tiroideus em pacientes com TSH normal ou aumentada [57].

Nódulos menores que 10 mm devem ser vigiados ecograficamente [57]. Nódulos maiores que 10 mm com características ecográficas de alta suspeição ou grau intermédio de suspeição, nódulos maiores que 15 mm com baixo grau de suspeição ou maiores que 20 mm e muito baixo grau de suspeição têm indicação para biópsia aspirativa com agulha fina (PAAF) [57].

A existência de fatores clínicos associados a aumento de risco de cancro da tiroide, como a irradiação cervical na infância, história familiar de cancro da tiroide, rouquidão, dor, imobilidade à deglutição ou presença de adenopatias cervicais suspeitas podem justificar a realização de biópsia aspirativa com agulha fina mesmo em nódulos de baixa suspeição ecográfica [57].

Apesar de benignos, os quistos tiroideus puros volumosos poderão ter indicação operatória, se sintomáticos e recidivantes após terapêuticas conservadoras (aspiração ou ablação com etanol) [57].

---

<sup>3</sup> A excisão da glândula tiroideia por bócio tipifica, talvez melhor que qualquer outra operação o triunfo supremo da arte do cirurgião

Tabela 1 – Padrão ecográfico, risco estimado de malignidade e indicação para PAAF de nódulos da tiroide [57].

	<b>Achados ecográficos</b>	<b>Risco estimado de malignidade</b>	<b>Cut off para PAAF (maior dimensão)</b>
<b>Alta suspeição</b>	Nódulo hipocóico sólido ou componente sólido de nódulo parcialmente quístico com uma ou mais das seguintes características: margens irregulares, microcalcificações, forma (altura maior que largura), calcificações em anel, extensão extratiroideia	>70-90 %	≥ 1 cm
<b>Suspeição intermédia</b>	Nódulo sólido hipocóico com margens suaves sem microcalcificações, extensão extratiroideia ou altura maior que largura	10-20 %	≥ 1 cm
<b>Baixa suspeição</b>	Nódulo sólido hiperecóico ou isoecóico ou nódulo parcialmente quístico com áreas sólidas excêntricas sem microcalcificações, margem irregular, extensão extratiroideia ou altura maior que largura	5-10 %	≥ 1.5 cm
<b>Muito baixa suspeição</b>	Nódulos espongiiformes ou parcialmente quísticos sem nenhuma das características acima referidas	<3 %	Considerar PAAF se ≥ 2 cm. Observação sem PAAF também é opção razoável
<b>Benigno</b>	Nódulos quísticos puros	<1 %	Sem indicação

PAAF – Punção aspirativa com agulha fina

A classificação de Bethesda padroniza os resultados da biópsia aspirativa, definindo face à estratificação do risco a abordagem subsequente (Tabela 2) [61-63]

Tabela 2 - Classificação de Bethesda, risco de malignidade e abordagem recomendada [48].

	<b>Risco de malignidade se NIFTP ≠ CA (%)</b>	<b>Risco de Malignidade se NIFTP = CA (%)</b>	<b>Abordagem recomendada</b>
<b>I – Não diagnóstico ou não satisfatório</b>	5-10	5-10	Repetir PAAF
<b>II - Benigno</b>	0-3	0-3	Follow up clínico e ecográfico
<b>III - Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado</b>	6-18	10-30	Repetir PAAF, testes moleculares ou lobectomia
<b>IV - Neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular</b>	10-40	25-40	Testes moleculares ou lobectomia
<b>V - Suspeito de malignidade</b>	45-60	50-75	Tiroidectomia quase total ou lobectomia
<b>VI - Maligno</b>	94-96	97-99	Tiroidectomia quase total ou lobectomia

NIFT-P - Non-invasive follicular neoplasm with papillary-like features (Neoplasia folicular não invasiva com aspetos nucleares papilares) PAAF – Punção aspirativa com agulha fina

Os tumores malignos da tireoide englobam os carcinomas papilares e foliculares (em conjunto considerados como bem diferenciados), carcinoma medular, carcinoma anaplástico ou indiferenciado, linfomas da tireoide e metástases de outros tumores [57, 58, 61, 64].

Em 2016, foi convencionado um novo nome – NIFTP – Non-invasive follicular neoplasm with papillary-like features (Neoplasia folicular não invasiva com aspetos nucleares papilares) – para a anteriormente chamada variante folicular encapsulada do carcinoma papilar da tireoide, após revisão destes casos e constatação da inexistência de mortalidade, recorrência ou metástases associadas a esta variante [60, 65].

Ao longo dos tempos, foram descritos vários tipos de intervenções cirúrgicas sobre a glândula tiroideia, que foram sendo abandonadas, sendo atualmente efetuadas apenas lobectomia (excisão de um dos lobos), hemitiroidectomia ou lobectomia com istmectomia (lobo e istmo), tiroidectomia total e quase total (preservação de poucos gramas de tecido tiroideu) [58, 64, 66].

A existência de adenopatias cervicais clínica ou ecograficamente suspeitas no contexto de um carcinoma da tireoide, obrigam à realização de esvaziamento cervical do compartimento central e eventualmente esvaziamento cervical lateral [57, 58].

#### Técnica cirúrgica

A cirurgia tiroideia, podendo ser efetuada sob anestesia local, é, contudo, realizada, habitualmente, sob anestesia geral balanceada e intubação orotraqueal [67, 68].

Com o doente em decúbito dorsal e a mesa operatória a 30° (Figura 14), após procedimentos de antisepsia, procede-se a incisão arciforme em prega cutânea cervical, cerca de 1,5 a 2 cm acima da fúrcula esternal (Figura 15) [60, 64, 68, 69].

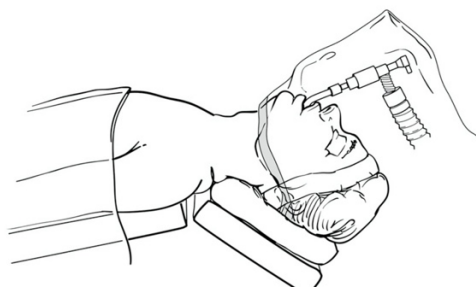


Figura 14 – Posicionamento do doente [69]

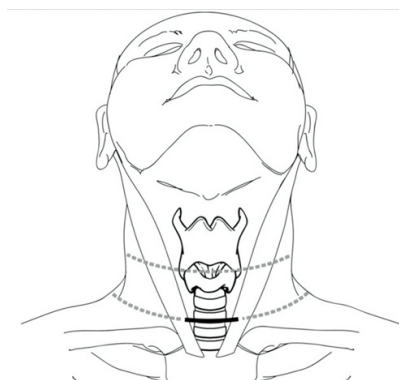


Figura 15 – Nível da incisão [69]

(Adaptadas de Gil Z :Surgery for thyroid cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2008, 17(1):93-120, viii - sob autorização Elsevier)

Após abertura do platisma procede-se à criação de retalhos superior e inferior, após o que efetua a secção da rafe mediana expondo o istmo da glândula [60, 64, 68].

Os passos seguintes não são consensuais, sendo minha preferência a libertação inicial do polo superior da tiroide, após laqueação dos vasos tiroideus superiores, devendo esta ser efetuada junto à cápsula da glândula e em vários pedículos, evitando lesar o ramo externo do nervo laríngeo superior [60, 64, 66].

A laqueação da veia tiroideia média permite depois a mobilização medial da tiroide, dando acesso à goteira traqueio-esofágica, onde deve ser procurado e identificado o nervo laríngeo recorrente e as glândulas paratiroideias superiores e inferiores, antes da laqueação dos vasos tiroideus inferiores e libertação do polo inferior da tiroide. [60, 64, 66].

De seguida procede-se à libertação da glândula da traqueia, ficando todo o lobo livre.

A secção do istmo completa a lobectomia [64].

Caso exista indicação para tiroidectomia total, o procedimento é repetido do lado contralateral [60, 64].

Após a revisão da hemóstase, a ferida operatória é encerrada por planos, existindo uma tendência crescente para não drenar a loca cirúrgica [64, 70].

Outras vias de abordagem da glândula tiroideia:

A popularização da cirurgia laparoscópica e da cirurgia minimamente invasiva em geral, bem como a crescente pressão estética, levou a que nos últimos anos tenham surgido novas vias de abordagem para a glândula tiroideia.

Em 1999, Paulo Miccoli descreveu a MIVAT – Minimally Invasive Video Assited Thyroidectomy, em que a glândula é abordada por uma incisão cervical mediana, de 15-20 mm, com recurso a uma câmara endoscópica e instrumentos próprios (Figura 16) [71, 72].



Figura 16 – Imagem intraoperatória de MIVAT

Em 2000, Ikeda e cols descreveram a abordagem transaxilar, a que se seguiram a via mamária, associações mama-axila e a via pré-auricular [73, 74].

Atualmente está a ganhar popularidade a TOETVA – Transoral Endoscopic Thyroidectomy Video Assisted – abordagem transvestibular (Figura 17) [75, 76].



Figura 17 – Inserção de trocar para TOETVA

Com exceção da MIVAT, as outras vias não podem ser consideradas verdadeiramente minimamente invasivas, pela grande disseção que implicam, sendo a sua vantagem essencialmente estética, pelo que a sua popularidade é maior no Oriente, onde a existência de cicatrizes cervicais é mal tolerada [74].

### 1.2.2 Cirurgia da paratiroide

Sendo a glândula paratiroideia a última glândula humana a ser identificada, só em 1917 foi efetuada a primeira paratiroidectomia, por John Bland-Sutton em Londres [15].

A exploração cervical para excisão de glândulas paratiroideias aumentadas ganhou popularidade crescente, apesar da dificuldade técnica que representavam e que se juntavam às dificuldades inerentes à inexistência de técnicas laboratoriais eficazes para o doseamento de hormona paratiroideia, que só viriam a aparecer na década de 60, e de técnicas imagiológicas capazes de identificar uma glândula aumentada [77].

O desenvolvimento de técnicas de cintigrafia capazes de demonstrar o hiperfuncionamento da glândula paratiroideia foi outro importante passo no desenvolvimento da cirurgia desta glândula [66, 78].

Até aos anos 90 a cirurgia padrão no hiperparatiroidismo primário foi a exploração cervical bilateral, com identificação das quatro paratiroides e excisão da glândula, morfologicamente, mais anormal [77].

A constatação do facto de 85 % dos casos de hiperparatiroidismo primário serem causados por um adenoma único, levou ao desenvolvimento da abordagem “focada”, dirigida à glândula previamente identificada por cintigrafia e ecografia concordantes, que ganhou popularidade crescente [77, 79, 80].

Outro importante marco na cirurgia da paratiroide foi o desenvolvimento de técnicas de doseamento rápido da hormona paratiroideia, cuja utilização intraoperatória permitiu a monitorização imediata do resultado da cirurgia [81].

#### Indicação operatória

São indicações para cirurgia das paratiroides as alterações patológicas associadas ao hiperparatiroidismo primário e terciário, bem como ao hiperparatiroidismo secundário renitente à terapêutica médica e os raros tumores malignos da paratiroide [64, 66, 82-85]. Também alguns casos de hiperparatiroidismo primário assintomático têm indicação operatória conforme as *guidelines* do Fourth International Workshop for the management of asymptomatic hyperparathyroidism realizado em 2013 em Florença, Itália (Tabela 3) [86-89].

Tabela 3 – Indicação operatória em hiperparatiroidismo primário assintomático [85]

<b>Cálcio sérico</b> <b>(&gt;limite superior do normal)</b>	1,0 mg/dl (0,25 mmol/l)
<b>Osso</b>	A- T.Score <2,5 B- Fratura vertebral
<b>Rim</b>	A- Filtração glomerular reduzida mais de 30% face ao valor esperado B- Cálcio Urinário de 24 horas > 400 mg/dl (>10 mmol/l) C- Presença de nefrocalcinose ou nefrolitíase
<b>Idade</b>	< 50 anos

Os procedimentos efetuados sobre as glândulas paratiroideias englobam a excisão de uma ou mais glândulas e o autotransplante de paratiroide [64, 66].

A cirurgia do hiperparatiroidismo primário, evoluiu da excisão de uma só glândula, para a exploração cervical bilateral, retornando ao ponto inicial de exploração unilateral e uniglandular, logo que o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico permitiu uma maior certeza na localização, diminuindo a possibilidade de persistência ou recorrência da doença [77].

Atualmente, com exceção dos casos associados a endocrinopatias familiares hereditárias, o tratamento do hiperparatiroidismo primário é efetuado, maioritariamente, através de abordagem “focada” [77, 90].

Esta abordagem depende da concordância dos dois exames de imagem, que devem ser efetuados por todos os pacientes, e que serão abordados no próximo capítulo: cintigrafia com Sestamibi e ecografia.

A injeção de rádio-fármaco (Tc99) pode ajudar na identificação da glândula hiperfuncionante [91, 92], sendo a sua utilização a base da cirurgia rádio-guiada das paratiroides, descrita noutro capítulo.

Nos casos em que os exames não são concordantes, continua preconizada a exploração cervical bilateral [64, 80, 85]

#### Técnica cirúrgica

Abordagem “Focada” [64, 79, 93].

Com anestesia local ou geral, e o pescoço em ligeira rotação para o lado contralateral, procede-se a incisão lateral com cerca de 2 cm, centrada à localização ecográfica (Figura 18). Abertura do platisma e disseção entre bordo interno do músculo esternocleidomastoideo e músculos pré-tiroideus.

Identificação da glândula paratiroideia aumentada e sua excisão.

Encerramento da ferida operatória por planos.



Figura 18 – Incisão para paratiroidectomia por abordagem “focada”

Abordagem bilateral [64].

Sob anestesia geral, incisão arciforme sobre prega cutânea cervical, conforme descrito para a tireoidectomia. Mobilização de ambos os lobos da tireoide expondo goteira traqueoesofágica.

Identificação de paratiroideias inferiores e superiores bilateralmente.

Excisão da(s) glândula(s) de aspeto patológico. Encerramento por planos.

Outras vias de abordagem:

À semelhança da cirurgia tireoideia, também para a cirurgia da paratiroide foram descritas vias de abordagem vídeo-assistidas (MIVAP) e extracervicais [74, 94, 95].

Sendo a abordagem “focada” uma forma de cirurgia minimamente invasiva, ela pode ser efetuada com ou sem utilização de técnicas videoassistidas.

Ambas as abordagens podem ser auxiliadas por técnicas de localização intraoperatória das glândulas paratiroideias, como a utilização de azul de metileno ou de rádio-fármaco ( $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi) [91].

### 1.2.3 Complicações da cirurgia da tiroide e paratiroide

As cirurgias da tiroide e paratiroide têm complicações comuns a qualquer outro ato cirúrgico, como a hemorragia, abscesso da loca cirúrgica, cicatrização viciante (coloides, cicatrizes hipertróficas) e complicações específicas [64, 96-98].

A proximidade com outras estruturas cervicais pode levar a lesões esofágicas, da traqueia ou de grandes vasos, situações potencialmente graves, mas de raridade extrema [98].

As complicações específicas mais frequentes são a lesão dos nervos laríngeo recorrente ou laríngeo superior, bem como o hipoparatiroidismo pós-operatório [99].

A lesão do ramo externo do nervo laríngeo superior, que ocorre em 2-28 % das cirurgias tiroideias provoca disфонia, diminuição do timbre vocal e da capacidade de projeção da voz e fadiga vocal precoce. Nem sempre é possível a identificação intraoperatória do nervo, sendo essencial a prevenção da lesão através da laqueação seletiva dos vasos tiroideus superiores junto à cápsula da glândula [64, 66, 99].

A lesão unilateral de um nervo recorrente laríngeo causa disфонia importante. A lesão bilateral causa obstrução da via aérea, podendo, em casos extremos, ser necessária a realização de traqueostomia [66, 96-98].

O nervo recorrente laríngeo pode ser lesado por ação mecânica, térmica ou por ação de fatores vasculares, sendo a gravidade da lesão e a capacidade de recuperação dependentes do grau de afeção das fibras nervosas (neuropraxia, axonotemese ou neurotemese) [100].

Lesões do nervos recorrente laríngeo ocorrem em 6 a 8 % das cirurgias sendo 1 a 2 % permanentes [66].

O hipoparatiroidismo pós-operatório ocorre em 20 a 65 % das cirurgias tiroideias, sendo geralmente transitório [5, 7, 8].

Nas mãos de cirurgiões experientes o risco de hipocalcemia permanente é de cerca de 1 % [6, 101].

As potenciais causas de hipocalcemia pós-tiroidectomia total, incluem a desvascularização das paratiroides ou a sua remoção acidental, bem como o efeito calciúrico dos fluidos endovenosos [66].

A extensão da cirurgia tem impacto no risco de hipocalcemia, que é maior quando à tireoidectomia se associa o esvaziamento ganglionar do compartimento central cervical [5, 102].

### **1.3 Técnicas de identificação das glândulas paratiroideias em cirurgia tiroideia e paratiroideia**

A importância da preservação das glândulas paratiroideias na cirurgia tiroideia faz com que todos os esforços devam ser empreendidos para a identificação intraoperatória das mesmas. Um conhecimento profundo da anatomia cirúrgica, sendo condição indispensável para a execução de qualquer procedimento, não garante por si a identificação destas glândulas, pela ampla variabilidade da sua localização, pelo seu pequeno tamanho e coloração (Figura 19).

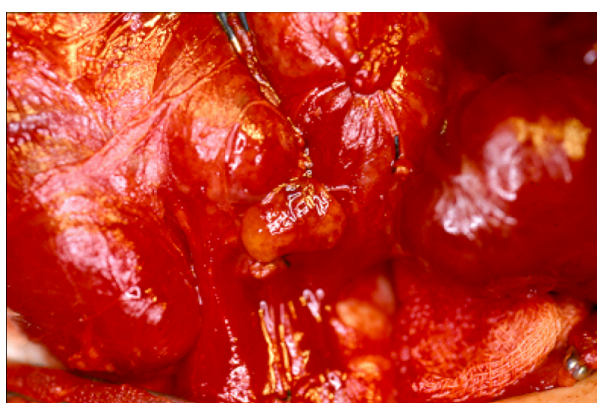


Figura 19 – Imagem intraoperatória de paratiroide em cirurgia tiroideia

As técnicas de identificação ou localização das glândulas paratiroideias podem-se dividir em dois grandes grupos: a) Técnicas de localização/identificação pré-operatória; b) Meios de identificação intraoperatória.

A - Técnicas de localização pré-operatórias

Estas técnicas são utilizadas habitualmente no decurso do processo de diagnóstico da patologia tiroideia e/ou paratiroideia, não se destinando apenas à localização.

Compreendem meios de imagem de utilização mais ou menos generalizada – ecografia, tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética nuclear (RMN) – e meios específicos de identificação das paratiroides – cintigrafia com Sestamibi.

Menos comum no âmbito da cirurgia endócrina é a utilização de tomografia de emissão de positrões e de procedimentos invasivos, como a arteriografia ou cateterismo venoso seletivo.

A ecografia é o exame de imagem mais utilizado para diagnóstico de patologia cervical, sendo o exame de primeira linha para avaliação de nódulos tiroideus e outras massas cervicais [66, 103].

A ecografia tiroideia e paratiroideia remonta a 1960, tendo o crescimento da sua popularidade acompanhado o aumento da definição da imagem, e é, atualmente, de utilização universal.

Historicamente a sua utilização na avaliação de pacientes com hiperparatiroidismo não era considerada essencial, já que o diagnóstico laboratorial desta situação obrigava à exploração cervical bilateral, tornando redundantes os exames de localização pré-operatórios [29, 66]. O advento da cirurgia minimamente invasiva veio alterar esta situação, já que só é possível uma abordagem focada, uniglandular, quando existem exames de localização e os mesmos são concordantes [29, 79, 80].

A identificação das glândulas paratiroideias normais por ecografia (Figura 20) não é, habitualmente, fácil, mesmo para os utilizadores mais experientes, pelas suas pequenas dimensões e características ultrassonográficas indistinguíveis de nódulos tiroideus ou gânglios linfáticos [29, 103].

Mesmo as glândulas aumentadas (adenoma, carcinoma, hiperplasia), não são fáceis de identificar sendo a sensibilidade da ecografia para identificação de adenomas de 70 a 80 % [29, 66].



Figura 20 –Imagem ecográfica mostrando adenoma da paratiroide inferior direita

Ecograficamente, o adenoma da paratiroide é tipicamente hipoecogénico comparado com os nódulos foliculares tiroideus, mais hiperecogénicos [29].

A ecografia tem como grandes vantagens o custo relativamente baixo e ausência de exposição a radiações [29, 103].

A tomografia computadorizada, tem sobre a ecografia a vantagem de poder detetar adenomas paratiroideus ectópicos, localizados no mediastino, tendo, contudo, maior dificuldade na identificação de pequenos adenomas que podem, por esta técnica, ser confundidos com gânglios linfáticos ou vasos tortuosos, apresentando sensibilidade que variam entre os 46 e os 87 %.

As novas técnicas de TC-4D, em que a um TC tridimensional é adicionada uma quarta dimensão baseada em alterações da perfusão tecidual, produzem imagens de alta resolução capazes de identificar adenomas com menor dificuldade que as TC convencionais, permitindo valores de sensibilidades que atingem os 88 % (Figura 21) [29].

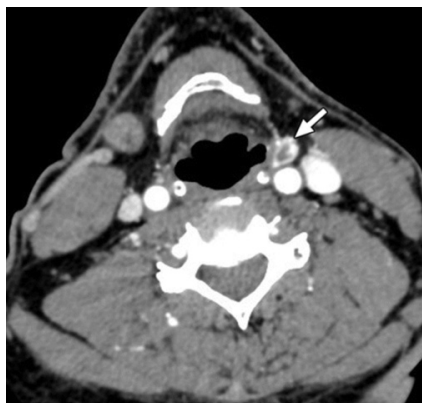


Figura 21 – Adenoma da paratiroide visualizado em TC-4D

A ressonância magnética nuclear também pode ser utilizada para localizar adenomas da paratiroide, sendo de maior utilidade na programação de reintervenções por persistência ou recorrência de hiperparatiroidismo. O desenvolvimento de protocolos específicos para a imagiologia cervical permitiu atingir sensibilidades e especificidades de 97,7 % e 97,5 %, respectivamente [66].

A cintigrafia com Sestamibi das glândulas paratiroideias começou a ser utilizada em 1983, já sendo usada previamente em estudos de perfusão cardíaca. Foram utilizados inicialmente vários rádio-fármacos. Desde o início da sua utilização, em 1989, o Tecnécio 99m (99mTC) rapidamente se impôs pelos seus melhores resultados [29].

O Sestamibi acumula-se nas mitocôndrias, pelo que a imagem varia dependendo da concentração destes organelos. A alta concentração de mitocôndrias que ocorre nos adenomas das paratiroides (com grande conteúdo de células oxifílicas que têm elevado teor mitocondrial) explica a maior visibilidade destes face às paratiroides normais, que apresentam menor concentração de mitocôndrias. O tecido tiroideu normal também capta Sestamibi, mas o seu menor teor em mitocôndrias faz com que o seu esvaziamento seja mais rápido, permitindo que as paratiroides sejam identificadas por técnicas de subtração ou dupla fase, com sensibilidades para a deteção de adenomas únicos de 89 e 73 %, respectivamente, e especificidade de 90 a 95 % para ambas as técnicas [66, 104].

Estas imagens podem ser associadas a SPECT (single photon emission computed tomography) dando uma melhor definição espacial (Figura 22) [66].

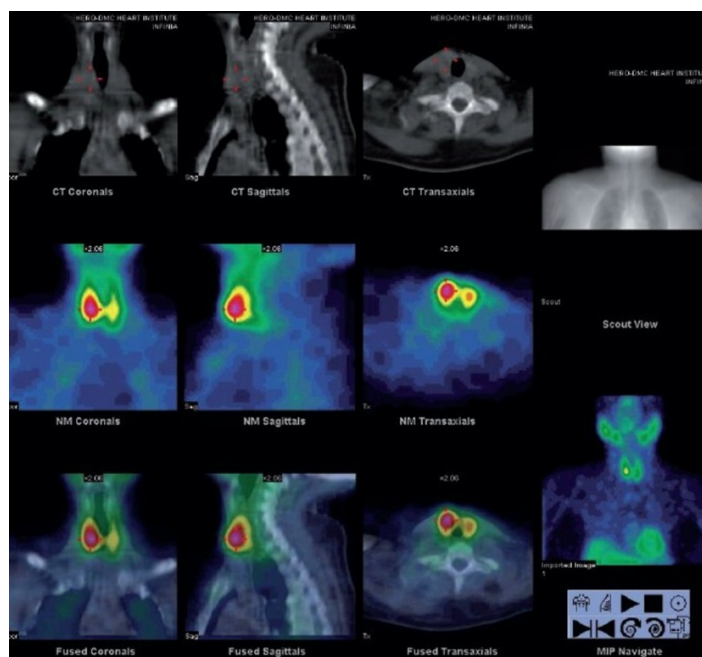


Figura 22 - Adenoma intratiroideu visualizado em Sestamibi-SPECT

São várias as limitações do Sestamibi, podendo ocorrer falsos negativos e falsos positivos: alguns nódulos tiroideus têm alto conteúdo de células oxifílicas podendo causar falsos positivos, que também podem ocorrer em carcinomas da tireoide, doença metastática, gânglios linfáticos, sarcoidose e gordura castanha. Podem ocorrer falsos negativos em adenomas com reduzido conteúdo de células oxifílicas, muitas vezes associados, também, a hiperplasia das paratiroides, adenomas duplos e pequenos adenomas únicos. A sensibilidade do Sestamibi para estas situações reduz-se para 30 % (se duplo adenoma) a 45 % (hiperplasia) [66, 105].

A tomografia por emissão de positrões, PET, associada a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética, é, hoje, um dos métodos de diagnóstico mais fiáveis pela possibilidade de fusão de dados anatómicos com dados metabólicos.

Vários rádio-marcadores podem ser usados para a obtenção de imagens, sendo, para a identificação de adenomas da paratiroide, mais utilizado o 18-F-Fluorocolina, com valores de sensibilidade de 97 % e especificidade de 93,7 % [66, 106].

Das técnicas invasivas, a biópsia aspirativa com agulha fina, guiada por ecografia ou TC, é a mais frequentemente utilizada, sendo muito específica na distinção entre tecido paratiroideu e não paratiroideu. Para esse efeito a medição dos níveis de PTH é mais sensível que a citologia.

Esta técnica não é usada habitualmente antes da cirurgia inicial, pela sua invasibilidade, reservando-se para a programação de reintervenções [66].

A arteriografia da paratiroide está praticamente abandonada, pois comportava riscos importantes (embolias do Sistema Nervoso Central, quadriplegia) que não justificam a sua utilização [66].

Também habitualmente reservada para as reintervenções ou para casos em que os exames não invasivos foram negativos, a cateterização venosa seletiva, para doseamento de PTH, apresenta uma sensibilidade que atinge 95 % em algumas séries. A necessidade de um radiologista de intervenção experiente na técnica, os custos e a exposição a doses elevadas de radiação são os principais fatores negativos associados a esta técnica [66].

#### B - Técnicas de localização intraoperatória

As técnicas utilizadas intraoperatoriamente para a localização de glândulas paratiroideias são utilizadas quase exclusivamente na cirurgia de ressecção das paratiroides, habitualmente no contexto de hiperparatiroidismo (Figura 23).

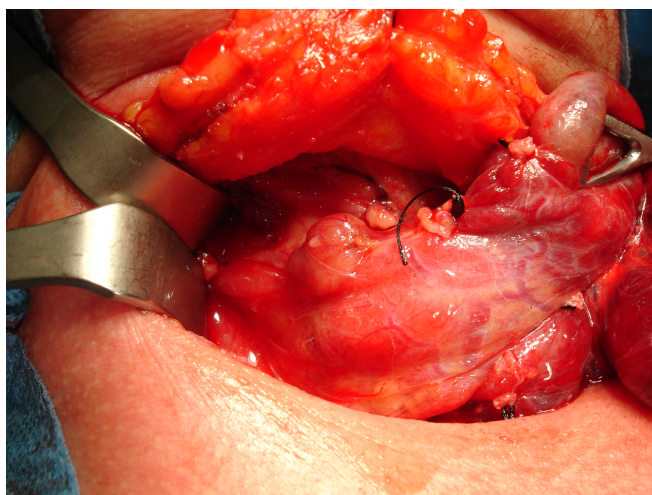


Figura 23 – Imagem intraoperatória em cirurgia de hiperparatiroidismo – adenoma da paratiroide superior direita

A administração de azul de metileno por infusão intravenosa para identificação das glândulas paratiroideias, teve o seu início em 1971, continuando a ser utilizada por alguns cirurgiões, apesar de desencorajada pela literatura pela possibilidade de efeitos secundários [107-109].

As doses empregadas variam entre os 5 e os 7,5 mg/kg de peso do doente, iniciando-se a infusão após a indução anestésica ou durante a incisão cutânea, corando entre 83 e 100 % das glândulas patológicas, existindo contudo falsos positivos (paratiroides normais, gânglios linfáticos, nódulos tiroideus, quistos do timo e tecido adiposo) [91, 108].

Foram reportados diversos efeitos secundários menores: pseudocianose, colúria temporária (verde) e pseudo-hipóxia, náusea, dor no local da infusão [108, 109].

Menos frequentes, mas de maior gravidade e com mortalidade associada, foram reportados casos de neurotoxicidade, sobretudo relacionados com o uso concomitante de fármacos inibidores da recaptação da serotonina [108, 109].

A utilização do 5-ALA (ácido amino-levulínico) para identificação das glândulas paratiroideias nunca atingiu grande popularidade, face aos efeitos secundários associados, nomeadamente, reações alérgicas e manifestações cutâneas associadas à fotossensibilização [29, 91, 108, 110].

Em 1998, Norman descreveu a cirurgia rádio-guiada das paratiroides, com a deteção intraoperatória do isótopo radioativo Tc99m-Sestamibi por uma gama câmara portátil (Figura 24), que, conforme anteriormente referido, é concentrado pelas paratiroides hiperfuncionantes [92].

O isótopo é injetado em veia periférica antes da cirurgia. Sendo captado também pela tiroide há um tempo ótimo para a deteção, que ocorre cerca de três horas após a injeção, quando o esvaziamento do rádio-fármaco na tiroide está quase completa e persiste captação na paratiroide. Esta pequena margem temporal é uma das limitações da técnica, existindo falsos negativos quando o esvaziamento da paratiroide é mais rápido [64].

A dose de radiação a que estão expostos, paciente e equipa cirúrgica, é diminuta [91].

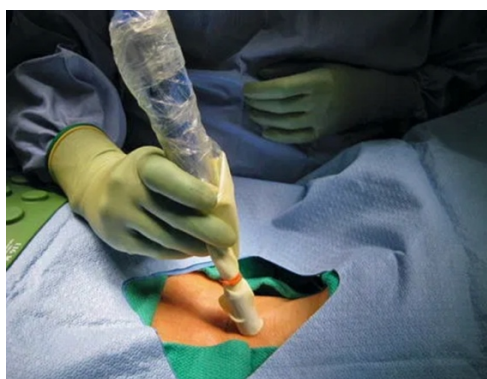


Figura 24 – Utilização intraoperatória de gama-câmara portátil

A utilização deste método permitiu atingir percentagens de cura para o hiperparatiroidismo primário até 99,1 % [91].

A gravidez, alergias e sensibilidade ao rádio-fármaco são contraindicações do método, cuja popularidade foi diminuindo ao longo do tempo, pelas dificuldades logísticas, sendo reservada, na maioria dos centros que a praticam, para os casos de reintervenção [91].

O doseamento da PTH intraoperatória é utilizado em muitos centros para confirmar a eficácia da resseção em cirurgia do hiperparatiroidismo, beneficiando da curta semivida da PTH (3 a 5 minutos). Esta técnica, descrita pela primeira vez em 1991 por Irving, ganhou

maior utilidade com o aparecimento de métodos laboratoriais que permitem resultados em cerca de 10 minutos [81, 91].

Tem como principais indicações [81, 91]:

- Verificação da remoção de todo o tecido paratiroideu hiperfuncionante;
- Demonstração de inadequada redução da PTH perante a existência de paratiroides hiperfuncionantes adicionais;
- Determinação da necessidade de exploração cirúrgica adicional;
- Discriminação de tecido paratiroideu de outros tecidos (através do doseamento direto da PTH no tecido suspeito);
- Localização da lateralidade da glândula hiperfuncionante (colheita bilateral em ambas as veias jugulares).

São efetuadas determinações em vários tempos, para avaliar a variação da PTH.

Foram definidos vários critérios (Miami, Halle, Roma, Viena, Charleston) para a previsão do sucesso do tratamento, sendo os critérios de Miami os mais amplamente usados, apresentando taxas de acurácia de 97 – 98 % [108, 111].

Os critérios de Miami consideram uma descida da PTH aos 10 minutos após excisão, maior que 50 % em relação aos valores mais altos pré-incisão ou pré-excisão, como preditiva de sucesso [81].

Apesar das inegáveis vantagens da técnica, o seu custo relativamente elevado e o benefício marginal que alguns autores atribuem à técnica, fazem com que a sua utilização não seja universal [108, 111].

O exame extemporâneo com corte de congelação é usado, desde há longo tempo, para confirmação da natureza do tecido após resseção e, embora possam ocorrer falsos negativos e falsos positivos, mantém a sua utilidade [91].

As suas maiores limitações estão na dificuldade em distinguir paratiroide de tiroide, na impossibilidade em diferenciar adenoma de hiperplasia das paratiroides, nos custos relativamente elevados do procedimento, que implica a disponibilidade de anatomopatologista, e no tempo de execução, cerca de 20 minutos, que tem repercussão no aumento do tempo operatório, com os inerentes custos de utilização do bloco operatório [91].

Para além da técnica objeto desta tese, nos últimos tempos surgiram novas técnicas de identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias utilizando tecnologias óticas: angiografia com verde de indocianina, tomografia de coerência ótica (OTC), *laser speckle contrast imaging* (LSCI), *dynamical optical contrast imaging* (DOCI) e espectroscopia de Raman. Com exceção da primeira, todas as outras são de utilização reduzida, essencialmente limitada aos grupos que as tentam implementar [112, 113].

O verde de indocianina é um agente fluorescente com pequena toxicidade e poucos efeitos secundários, já utilizado na prática médica há cerca de 25 anos, que nos últimos tempos tem vindo a ganhar maior popularidade, sendo utilizado em várias áreas cirúrgicas, nomeadamente para avaliação da perfusão de anastomoses digestivas e na identificação de gânglios linfáticos [113, 114].

A angiografia por verde de indocianina para identificação das glândulas paratiroideias começou a ser descrita, em 2015, em cirurgia do hiperparatireoidismo primário, e, em 2016, em cirurgia tiroideia. A sua utilização em cirurgia das paratireoides, apesar dos promissores resultados iniciais não tem obtido grande popularidade face à mais-valia marginal que proporciona, sendo a captação do contraste por todos os órgãos vascularizados uma das maiores limitações da técnica [115-117].

Em sentido inverso, a angiografia por verde de indocianina tem vindo a ganhar popularidade na avaliação da viabilidade das glândulas paratiroideias em cirurgias da tiroide [118]. A sua possível complementaridade com a identificação das paratireoides por autofluorescência será discutida noutro capítulo.

## 1.4 A fluorescência de infravermelho próximo – aplicações da fluorescência em cirurgia

A aplicação da fluorescência nas ciências médicas tem sido objeto de interesse crescente nas últimas décadas, sendo a sua utilização intraoperatória relativamente recente.

A emissão de luz por uma substância – luminescência – é dividida formalmente em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado (Figura 25) [119].

Em estados excitados singletos, um elétron na orbital excitada é emparelhado (por *spin* oposto) com o segundo elétron na orbital fundamental, ocorrendo um rápido retorno ao estado fundamental pela emissão de um fóton – fluorescência - sendo um fenômeno breve (cerca de 10 ns – 10<sup>-9</sup> seg). A luz emitida tem um comprimento de onda maior que a radiação incidente e cessa, quase imediatamente, após a eliminação da fonte excitante [119].

Fosforescência é a emissão de luz a partir de estados excitados tripleto, nos quais o elétron na orbital excitada, tem a mesma orientação *spin* que o elétron no estado fundamental. Transições para o estado fundamental são proibidas, sendo a taxa de emissão lenta, pelo que o tempo de fosforescência vai de milissegundos a segundos, sendo mesmo possíveis tempos maiores, o que permite a manutenção da emissão após o fim da excitação [119].

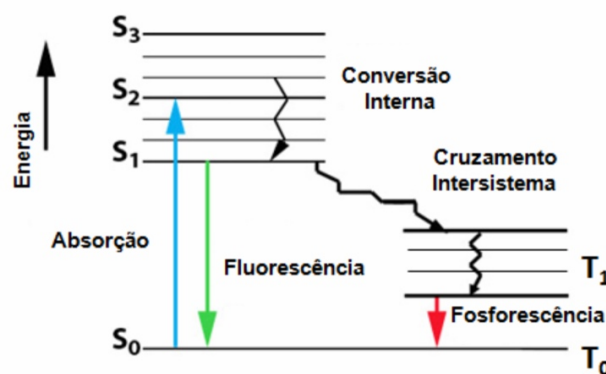


Figura 25 – Diagrama de Jablonski simplificado

Na natureza ocorre outro fenômeno associado à emissão luminosa – a bioluminescência – em que existe transformação de energia química em energia luminosa, como acontece nos pirilampos em que uma enzima, luciferase, oxida o substrato da proteína luciferina consumindo uma molécula de ATP. A molécula de luciferina excitada energeticamente, liberta essa energia química na forma de energia luminosa. Enquanto na fluorescência e fosforescência a energia luminosa é absorvida de outra fonte e depois libertada, na bioluminescência a luz é produzida por um processo químico, independentemente de outra fonte de luz [120, 121].

A emissão de fluorescência por uma estrutura depende da presença de fluoróforos (moléculas ou grupos funcionais capazes de absorver energia de um comprimento de onda específico e depois emitir num comprimento de onda menor). Estes fluoróforos podem ser intrínsecos, que ocorrem naturalmente, ou extrínsecos, corantes adicionados a uma estrutura para a tornar fluorescente [119].

Os fluoróforos intrínsecos conhecidos incluem aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), NADH, flavinas, derivados do piridoxil, bem como, nas plantas, a clorofila [119].

Os aminoácidos aromáticos têm espectros de absorção entre 260 e 295 nm e de emissão entre 282 e 353 nm [119].

Os cofatores enzimáticos são com frequência fluorescentes, tendo o NADH máximos de absorção e emissão aos 340 e 460 nm. A forma oxidada NAD<sup>+</sup> não é fluorescente, ao contrário do que acontece com as flavinas (riboflavina, FMN - flavina mononucleotido e FAD - flavina adenina dinucleotido) em que são as formas oxidadas que são fluorescentes e não as reduzidas.

As flavinas absorvem luz no espectro do visível e têm máximo de emissão aos 525 nm.

O cofator piridoxil fosfato também é fluorescente. Os seus espectros de absorção e emissão dependem da sua estrutura química dentro das proteínas, situando-se entre 250 e 300 nm e 350 e 400 nm, respetivamente [119].

Em tecidos intactos encontram-se outros fluoróforos, como o colagénio, elastina e porfirinas.

Nestes casos a emissão não se deve a um tipo único de molécula, mas representa todas as estruturas emissoras presentes no tecido, encontrando-se diferentes espectros de emissão com diferentes espectros de absorção [119, 122].

A investigação da fluorescência intrínseca, tentando identificar padrões espectrais passíveis de ser usados na discriminação entre tecidos normais e patológicos, é uma área em grande desenvolvimento nos nossos dias.

Existem numerosas substâncias com capacidades fluoróforas extrínsecas, como a fluoresceína, rodamina e dansil, que quando acopladas a substâncias não fluorescentes permitem a marcação destas [119].

A capacidade de deteção destes corantes nos tecidos é muitas vezes limitada pela existência de autofluorescência, que na quase totalidade dos casos decresce à medida que o comprimento de onda de excitação aumenta, pelo que ganharam particular interesse os corantes de maior comprimento de onda, com relevo para as cianinas, que têm espectros de absorção e emissão acima dos 550 nm [119].

A “janela ótica” entre os 700 e os 900 nm (infravermelho próximo) revela-se a mais adequada para a aquisição de imagens e deteção de patologias, já que comprimentos de

onda inferiores a 700 nm são fortemente absorvidos nos tecidos por moléculas endógenas, como a hemoglobina e mioglobina, e comprimentos de onda acima de 900 nm são limitados pelos comprimentos de onda da água e lípidos. A menor absorção pelos tecidos, permitindo maior penetração, torna os fluoróforos emitindo na banda do infravermelho próximo, adequados à utilização intraoperatória, estando na origem da cirurgia guiada pela fluorescência [119, 123, 124].

A cirurgia guiada pela fluorescência define-se como uma técnica de imagem baseada nas propriedades óticas dos tecidos, que permite a visualização de estruturas inaparentes a “olho nu” e a avaliação de atividades metabólicas dinâmicas como a perfusão de órgãos [123, 124].

Com poucas exceções, em que é utilizada a autofluorescência dos tecidos, é utilizada a injeção de corante fluorescente, que pode emitir fluorescência após excitação por fonte luminosa. Esta pode ser observada diretamente no campo operatório ou, através de câmaras específicas, projetada num monitor [123].

Há poucos corantes fluorescentes em utilização clínica, estando, contudo, em diversos estados de desenvolvimento e investigação, vários compostos [123].

Atualmente as aplicações clínicas mais populares da cirurgia guiada pela fluorescência incluem a colangiografia por fluorescência, identificação de gânglio sentinela e avaliação de perfusão de anastomoses [123-125].

A aplicação mais importante, ainda em fase embrionária é a identificação em tempo real de tecidos tumorais através de corantes fluorescentes específicos para o tipo de cancro [124].

Os grandes benefícios da cirurgia guiada pela fluorescência incluem [125]:

- Avaliação em tempo real da perfusão tecidual.

A perfusão tecidual é um fator fundamental na cicatrização, pelo que a sua avaliação poderá ter impacto na redução do número de deiscências anastomóticas. Estudos em cirurgia cólica utilizando o verde de indocianina, mostraram uma menor taxa de deiscências anastomóticas, face ao grupo controle sem utilização de contraste, o mesmo ocorrendo em cirurgia esofágica, levando a que a utilização desta técnica esteja em grande expansão [126].

- Visualização de estruturas críticas.

A fluorescência pode ajudar a prevenir lesões inadvertidas de estruturas anatómicas críticas, nomeadamente nervos, ureteres e árvore biliar [125]. A excreção hepática do verde de indocianina torna possível a visualização da árvore biliar cerca de 45 minutos após a sua injeção endovenosa, sendo a sua maior limitação a fluorescência hepática, o que não impede ser esta uma das principais aplicações da cirurgia guiada pela fluorescência [127]. A identificação dos ureteres por fluorescência minimizando o risco de lesão iatrogénica é uma área promissora, limitada, atualmente, porque o verde de indocianina não é excretado por

via urinária, estando em curso estudos com fluoróforos com excreção urinária como o IRDye800CW. Também a identificação de nervos está a ser objeto de investigação [128].

- Estadiamento intraoperatório em tempo real.

O verde de indocianina tem sido utilizado, com sucesso, na pesquisa de gânglio sentinela em vários tipos de tumores, apesar de não ser o corante ideal, pois é escassamente retido nos gânglios linfáticos, dispersando rapidamente. Estão em desenvolvimento novos corantes que poderão obviar essa limitação [125].

- Avaliação de margens tumorais, radicalidade cirúrgica e avaliação de resposta ao tratamento.

A administração de um anticorpo com fluorescência e especificidade para um determinado tumor poderá proporcionar uma rápida e acurada avaliação da radicalidade da cirurgia [125].

O desenvolvimento de corantes fluorescentes tumor-específicos teve um avanço significativo nos últimos anos, permitindo, não só a detecção de tumores em estádios precoces, como também uma resseção tumoral precisa. A estratégia de acoplar um corante fluorescente (IRDye800CW) com anticorpos monoclonais utilizados em terapêutica oncológica (bevacizumab ou cetuximab) está em estudo para o carcinoma do cólon e esôfago de Barrett [125].

Assim, nas suas várias vertentes, a cirurgia guiada pela fluorescência parece poder tornar-se uma arma poderosa na direção da medicina de precisão, permitindo melhorias no diagnóstico, decisão cirúrgica em tempo real e avaliação da eficácia [125].

## 1.5 A autofluorescência das paratiroides

Em 2011, Paras e cols da Universidade de Vanderbilt, Nashville, Estados Unidos da América, apresentaram os resultados de um estudo em que pela primeira vez é mostrada a autofluorescência das glândulas paratiroideias (Figura 26) [12].

Partindo de estudos de espectroscopia ótica (espectroscopia de Raman), técnica dirigida sobretudo à deteção de tecidos patológicos e beneficiando da capacidade desta para a deteção de diferenças na composição química e na arquitetura dos tecidos, este grupo conseguiu demonstrar um padrão de autofluorescência nas paratiroides, passível de ser aproveitado para a sua diferenciação de outros tecidos cervicais [12].

A dispersão de Raman é uma forma de dispersão não elástica, originada por perturbações numa molécula, que induzem nestas transições vibracionais ou rotacionais [119].

A espectroscopia de Raman é, assim, uma técnica molecular específica que pode ser usada para o estudo de diferentes tecidos ou materiais, podendo ser particularmente útil no diagnóstico diferencial entre situações pré-cancerosas e cancerosas, existindo publicações sobre a sua aplicação na deteção *in vivo* de cancro do colo uterino, mama, pele e trato gastrintestinal, com altas sensibilidades e especificidades [129, 130]. Esta técnica é muito sensível a alterações subtis da fisiologia dos tecidos, bem como à presença de patologia. A grande limitação desta técnica está na sua difícil aplicabilidade para colheita de imagens *in vivo*, já que é um fenómeno de fraca intensidade [130, 131].

A utilização de espectroscopia ótica em cirurgia endócrina tem sido limitada, existindo publicações sobre o uso de 5-ALA e de azul de metileno para deteção das paratiroides em hiperparatiroidismo, não tendo esta técnica, contudo, ampla aceitação [132-135].

Das e cols utilizaram a espectroscopia de Raman para a diferenciação *ex-vivo* entre adenoma e hiperplasia das paratiroides com sensibilidade de 93 % e 95 %, respetivamente [136].

Os estudos existentes dirigiam-se essencialmente à discriminação entre tecidos normais e patológicos, não sendo considerada a potencial utilidade destas técnicas para utilização intraoperatória.

Face às potencialidades da fluorescência de infravermelho próximo os investigadores da Universidade de Vanderbilt, após um estudo inicial utilizando estimulação a 337 nm e captação a 440 nm, que não demonstrou capacidade discriminativa entre os vários tecidos cervicais, iniciaram estudos com estimulação a 785 nm e captação a 820 nm.

Para esse estudo utilizaram um laser díodo 785 nm, com uma potência de 80 mW e foco de 400 µm, acoplado a uma fibra ótica, sendo a fluorescência detetada com um espectralfotómetro através da mesma fibra ótica, e o sistema controlado por um computador portátil.

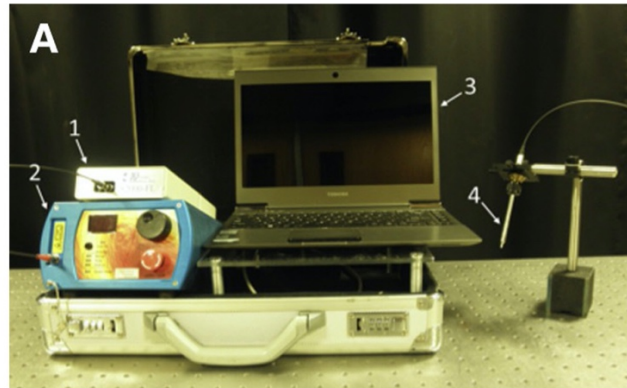


Figura 26 – Dispositivo utilizado por Paras e cols [137]

(Adaptado de McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT: A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery* 2013, 154(6):1371-1377 sob autorização Elsevier)

Obtiveram espectros de múltiplas localizações de vários tecidos (tiroide, paratiroide, gordura, músculo, gânglios linfáticos), sendo necessário o encerramento das luzes da sala.

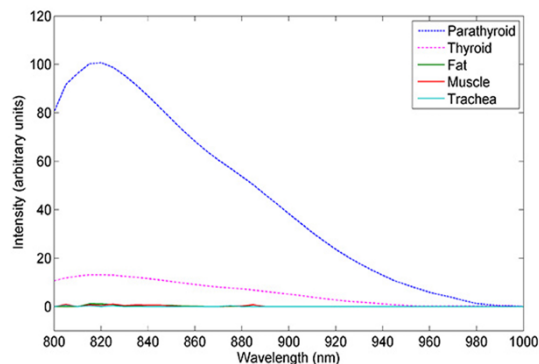


Figura 27 – Gráfico de intensidade de fluorescência [137]

(Adaptado de McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT: A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery* 2013, 154(6):1371-1377 sob autorização Elsevier)

A comparação dos espectros obtidos de diferentes tecidos cervicais mostrou emissão de fluorescência, consistentemente observada aos 822 nm, na tiroide e paratiroide e quase não existente nos outros tecidos.

A intensidade da fluorescência obtida em paratiroides foi sempre muito superior à obtida na tiroide (Figura 27), revelando a análise estatística com o teste t de Student um valor p de 0,0000235 a um nível de confiança de 99,9 % [12].

Não foram encontradas diferenças na intensidade do sinal em função do estado das glândulas: tiroide e paratiroide normais ou patológicas mantêm emissão de fluorescência [12, 137].

Análise multifatorial não revelou, para qualquer tecido, diferenças no padrão de fluorescência em função da idade ou sexo [12].

A presença de autofluorescência na tiroide e paratiroide põe uma questão ainda por esclarecer, relacionada com a geração desta.

À exceção da melanina, que não está presente na paratiroide, não são conhecidos fluoróforos naturais emitindo nesta banda do espectro [137].

Os constituintes responsáveis pela fluorescência devem estar presentes na tiroide e em maior concentração na paratiroide e ausentes nos restantes tecidos cervicais, sendo inicialmente considerados potenciais candidatos a hormona paratiroideia, várias formas de porfirinas e os recetores sensíveis ao cálcio (CaSR) [12, 137].

A ausência de PTH na tiroide, associada à não existência de aumento significativo de sinal associado ao tecido paratiroideu hiperfuncionante, levam à exclusão dessa hormona como possível causa da fluorescência [138].

As porfirinas, que emitem fluorescência entre os 600 e 700 nm, também não existem nos tecidos cervicais, pelo que deverão ser excluídas como causas possíveis [139].

Os recetores sensíveis ao cálcio (CaSR), proteínas-G, estão envolvidos no controlo da síntese e secreção de PTH e calcitonina. Existem em maior concentração nas células da paratiroide, encontrando-se também, em menor concentração nas células C da tiroide, estando ausentes no músculo, gordura ou linfáticos. Podem também ser encontrados nos túbulos renais, cérebro, osso e epitélio intestinal [51].

Alguns factos pareciam confirmar esta hipótese:

- A menor intensidade de fluorescência tendencialmente associada ao hiperparatiroidismo, situação clínica em que há menor expressão dos CaSR [137, 140, 141].
- Presença de picos de emissão de autofluorescência aos 822 nm no epitélio cólico e rim [137, 140].
- Menor intensidade de fluorescência associada a tumores de Wilms, em que há menor expressão dos CaSR, face ao tecido renal normal [140].

No entanto, investigação subsequente veio a excluir quase por completo esta hipótese:

- Sendo conhecida a localização dos CaSR nas membranas caveolares, o isolamento destas não mostrou persistência da fluorescência [140].
- Ausência de diferença no padrão de autofluorescência em xenoenxertos de carcinoma medular da tiroideia com ou sem expressão de CaSR [140].

- O isolamento dos componentes da paratiroide por imunoprecipitação, para isolar diretamente os CaSR, não mostrou autofluorescência no componente onde estes estavam presentes [140].
- Também a utilização de linhagens celulares com sobre-expressão de CaSR não mostrou existência de autofluorescência [140].

Excluídos os CaSR, estudos com microscopia de fluorescência efetuados em vários tecidos endócrinos, parecem apontar os grânulos de secreção como local de origem da fluorescência, continuando, contudo, a incerteza sobre o responsável específico pela emissão, sendo atualmente sugerido tratar-se de uma estrutura proteica termoestável e resistente à degradação, com um peso molecular aproximado de 15 Dalton [140].

## Capítulo 2

### Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal o aumento do conhecimento sobre a aplicação da autofluorescência das paratiroides na prática cirúrgica, resultando da tentativa de resposta a várias questões:

- 1- A estimulação luminosa, capaz de desencadear a autofluorescência das paratiroides, tem capacidade de provocar alterações no padrão secreção hormonal dos órgãos secretores, ou mesmo alterações estruturais ou ultraestruturais nos tecidos cervicais diretamente expostos?
- 2- Os estudos iniciais envolveram a utilização de tecnologia dispendiosa. Será possível a obtenção de imagem em tempo real com o recurso a materiais de custo reduzido?
- 3- Será a autofluorescência útil na inspeção imediata das peças operatórias para identificação de glândulas paratiroideias incidentalmente excisadas?
- 4- Existindo diferenças entre as glândulas paratiroideias normais e as patológicas, será a autofluorescência útil na cirurgia do hiperparatireoidismo?
- 5- Não proporcionando este método informação sobre a vascularização das paratiroides, a sua utilização terá influência na diminuição dos casos de hipoparatiroidismo pós-operatório?

Paralelamente a estas questões, com repercussões essencialmente clínicas, a dúvida na causa da autofluorescência, cujo completo esclarecimento implica tecnologia e conhecimentos que extravasam muito a área cirúrgica, levou ao estabelecimento de dois objetivos secundários, pequena contribuição para o conhecimento na área, sob a forma das seguintes questões:

- 1- A emissão de fluorescência pelas paratiroides será alterada pela exposição a condições extremas (aquecimento, congelação e fixação em formalina)?

- 2- A autofluorescência descrita ocorre para uma estimulação na banda do infravermelho próximo, em que os comprimentos de onda de excitação e emissão estão muito próximos, o que coloca dificuldades na filtragem da luz. Existirão outros comprimentos de onda capazes de desencadear autofluorescência com maior poder discriminativo?

## Capítulo 3

### Metodologia

A heterogeneidade dos objetivos deste estudo obrigou à utilização de vários métodos de investigação, *in vitro* e *in vivo*, incluindo modelos animais vivos e cirurgia humana, que implicaram a aquisição de competências específicas nas diversas áreas, bem como o apoio de especialistas das mesmas.

Estando esses métodos descritos, pormenorizadamente, nos capítulos subsequentes parece-me, contudo, importante uma sumarização e enquadramento dos mesmos, bem como a clarificação de alguns pontos.

Estes estudos foram precedidos por um trabalho preliminar efetuado no Departamento de Bioimagem do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa (responsável: Prof. Doutor José Rino).

Com o objetivo de testar a fluorescência *in vitro* foi efetuado um estudo em tecido suíno, com utilização do sistema IVIS Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, Massachusetts, USA), - Figura 28.



Figura 28– Sistema IVIS Lumina

Em peças animais obtidas imediatamente após abate, procurámos a captação de fluorescência nos comprimentos de onda entre os 810 e os 885 nm, após estimulação luminosa na banda do infravermelho próximo, com comprimentos de onda entre os 705 e os 780 nm e tempos de exposição de 5 e 10 segundos.

Este sistema não replica as condições dos estudos iniciais, nem é passível de aplicação intraoperatória, mas ao conseguir a estimulação luminosa dos tecidos em diversos comprimentos de onda e a captação da fluorescência emitida, permitiu-nos a confirmação da existência de autofluorescência do tecido paratiroideu na banda do infravermelho próximo.

A localização anatómica das paratiroides no porco, junto ao timo, logo afastadas da tiroide, e o facto dos blocos cervicais terem sido preparados com base na localização desta, levaram a que só em uma, das três peças anatómicas analisadas, tenha sido possível a deteção simultânea de fluorescência em ambos os tecidos (Figura 29).

Neste caso, foi possível confirmar por corte de congelação a natureza do foco de maior fluorescência: tecido paratiroideu.

A estimulação isolada de tecido esofágico e traqueal não mostrou fluorescência (Figura 30)

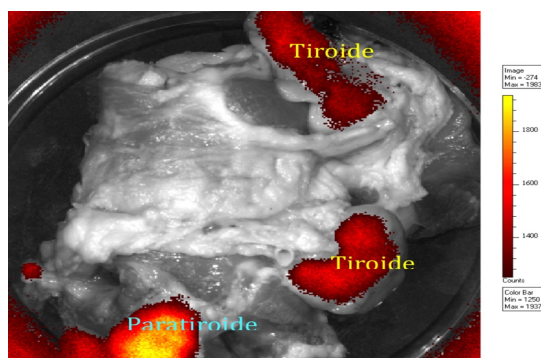


Figura 29 – Bloco cervical suíno submetido a estimulação luminosa

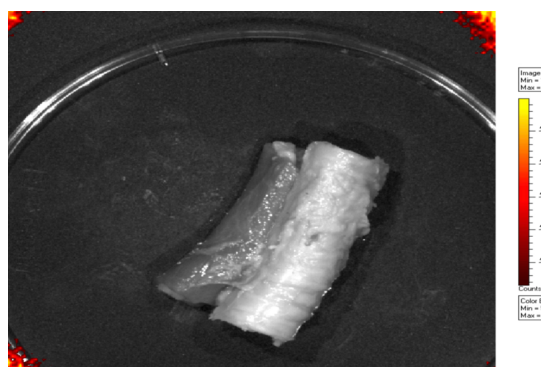


Figura 30 – Bloco esófago-traqueal submetido a estimulação luminosa

Comprovada a existência da autofluorescência das paratiroides desenhámos um projeto conducente à avaliação da sua aplicação clínica, com três vertentes principais:

- Avaliação da influência da estimulação luminosa no padrão de secreção e na estrutura dos tecidos irradiados;
- Desenvolvimento de um sistema de captação de imagem passível de utilização intraoperatória;
- Avaliação da utilização da autofluorescência das paratiroides em cirurgia tiroideia e paratiroideia.

Acessoriamente procuramos também contribuir para o esclarecimento da causa da fluorescência, através da avaliação da autofluorescência de glândulas paratiroideias submetidas a condições extremas e a análises espectrais.

Para a avaliação de eventuais alterações estruturais, ultraestruturais e do padrão de secreção hormonal utilizámos um modelo animal, o rato Wistar.

Sendo pouco provável a existência de alterações estruturais ou ultraestruturais causadas pela exposição a uma fonte luminosa de baixa intensidade, a natureza especial dos tecidos endócrinos poderia levar a que esta exposição tivesse repercussão na normal secreção hormonal, situação que poderia ser impeditiva da utilização da autofluorescência para identificação das paratiroides, pondo em causa todo o projeto.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de um dispositivo de baixo custo para visualização das glândulas paratiroideias obrigou à utilização *in vitro* de fragmentos de tecidos cedidos pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital dos SAMS.

Após a validação da utilização do sistema *in vitro* e aprovação pela Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, foi iniciada a sua utilização em cirurgia tiroideia e paratiroideia.

As várias vertentes do projeto resultaram no desenvolvimento de estudos autónomos:

#### A – Avaliação da influência da estimulação luminosa

1 - Avaliação das alterações do padrão de secreção tiroideia e paratiroideia nos tecidos submetidos a irradiação com fonte de infravermelho próximo.

Sendo um dos objetivos do estudo a aferição dos possíveis efeitos da radiação infravermelho próximo nos tecidos secretores, da qual havia escassa ou mesmo nula informação na literatura, imperativos éticos e legais levaram à opção pelo estudo em modelo animal – rato Wistar.

Apesar do pequeno porte e só ter um par de glândulas paratiroideias, o rato tem sido utilizado de forma regular como modelo em investigação endocrinológica, tendo as vantagens de um custo reduzido e uma maior manuseabilidade face a animais de maior porte.

A realização do estudo neste modelo obrigou à obtenção de autorização da Direção Geral de Agricultura e Veterinária, cuja demora (cerca de dois anos) foi o principal fator de atraso neste projeto, bem como à minha creditação como Investigador em Modelo Animal – Felasa Categoria C.

Conforme descrito detalhadamente no capítulo III, foram utilizados, neste estudo, 32 ratos, submetidos a disseção cervical sob anestesia geral, sendo 16 irradiados com fonte de infravermelho próximo (grupo de estudo) e 16 não irradiados (grupo controlo). Para garantir a uniformidade da distância de irradiação foi construído um sistema de retenção para a fonte LED (distância ao campo cirúrgico – 20 cm) representado na Figura 31.

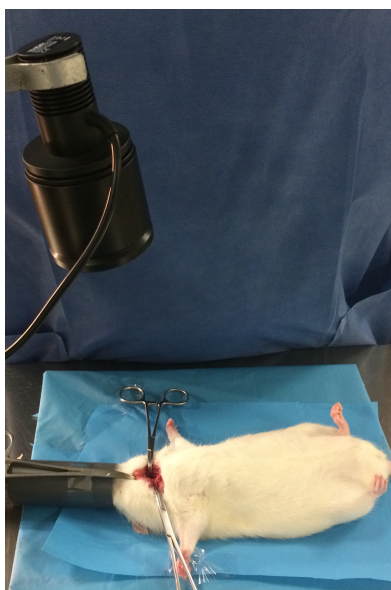


Figura 31 – Imagem intraoperatória

A Figura 32 mostra fluorescência das paratiroides de rato submetidas à estimulação luminosa.

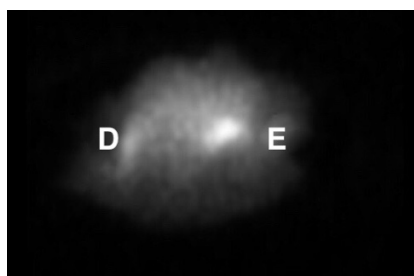


Figura 32 – Imagem ampliada de bloco tiroparatiroideu de rato mostrando autofluorescência das paratiroides Direita (D) e Esquerda (E)

Efetuarão-se colheitas sanguíneas pré-operatórias, pós-operatórias imediatas e aos 30 e 60 dias após cirurgia, para determinação de cálcio, PTH, TSH, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, sendo os resultados sido submetidos a análise estatística.

2 – Avaliação de alterações estruturais e ultraestruturais nos tecidos submetidos a irradiação com fonte de infravermelho próximo.

A possibilidade de a irradiação luminosa desencadear alterações estruturais ou ultraestruturais nos tecidos irradiados, cujas referências na literatura também são escassas, foi investigada com recurso ao mesmo modelo animal.

Foram utilizados para este efeito blocos tiroparatiroideus de 16 ratos dos grupos de estudo e de controlo, anteriormente referidos, colhidos durante o processo de eutanásia dos animais. Esses blocos foram imediatamente divididos pelo istmo, sendo metade fixados em formalina e, posteriormente, corados com hematoxilina-eosina, incluídos em parafina e montados em lâmina para observação ao microscópio ótico. A outra metade dos blocos tiroparatiroideus foi fixada em glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sucrose (fixador primário), tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (fixador secundário), acetato de uranilo 0,5 % em tampão acetato-ácido acético 0,1 M.

Posteriormente procedeu-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, transição com óxido de propileno, após o que foram incluídas em resina epoxi (araldite).

Foram efetuados cortes ultrafinos com ultramicrotomo Leica EM UC7 RT, em grelhas de cobre 200 mesh, espessura de 70 nm, contrastados com citrato de chumbo de Reynolds.

As grelhas obtidas foram observadas ao microscópio eletrónico de transmissão.

As amostras foram observadas por três experientes anatomopatologistas.

Em ambos os estudos foram avaliados qualitativamente os aspetos microscópicos, estruturais e ultraestruturais dos tecidos irradiados e não irradiados.

B – Estudos para desenvolvimento de dispositivo para identificação das glândulas paratiroideias por autofluorescência.

O atraso observado na autorização para o início da experimentação animal levou a que, os detentores da tecnologia do dispositivo que inicialmente pensáramos utilizar, iniciassem colaboração com outros grupos, obrigando-nos à procura de alternativas.

O desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo, um dos objetivos do projeto, teve como base concetual a noção de que, ocorrendo a fluorescência das paratiroides num comprimento de onda relativamente próximo ao da visão humana, que é utilizado frequentemente em fotografia, e cuja captação pode ser feita através de uma modificação

simples das máquinas fotográficas comuns, poderia não ser necessária tecnologia dispendiosa para a sua utilização intraoperatória.

A principal dificuldade esteve na escassa distância entre o comprimento de onda da luz incidente (780 nm) e o comprimento de onda da luz obtida (pico aos 822 nm), que obrigou à realização de testes com vários filtros, de forma a impedir a saturação da imagem obtida pela luz incidente (filtro de emissão) e garantir a visualização apenas de luz acima do comprimento de onda desejado.

Os estudos iniciais replicaram os trabalhos de Kim e cols, com a utilização de uma câmara fotográfica, modificada pela remoção do filtro de infravermelho, para captação de imagens e um foco de emissão LED de 780 nm [142].

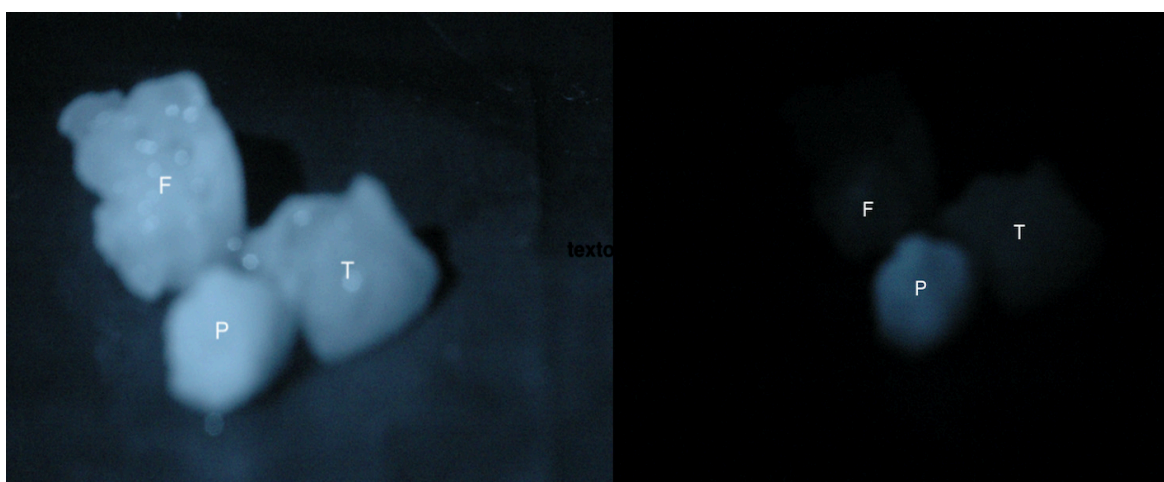


Figura 33 – Fragmentos de gordura (F), tireoide (T) e paratiroide (P) captadas com câmara de infravermelhos, sob luz branca (esquerda) e LED 780 nm (direita).

Não obstante a obtenção das imagens mostradas na Figura 33, as dificuldades encontradas na focagem da câmara modificada e os custos significativos associados à aquisição e modificação da câmara fotográfica levaram-nos à pesquisa de outras formas de captação de imagem, com recurso a *camcorder* com função de captura de infravermelhos, a *webcam* modificada e, por último a dispositivo de visão noturna (*night vision goggles*) (Figura 34). Este último dispositivo, mostrou-se mais eficiente que os anteriormente testados, passando a ser utilizado nos diversos passos deste projeto.

Antes da utilização em cirurgia o sistema foi testado *in vitro* com tecidos obtidos após cirurgias de ressecção tiroideia e paratiroideia.



Figura 34 – LED 780 nm em filtro *bandpass* 769 nm (esquerda). Dispositivo de visão noturna com filtro *bandpass* 710 nm (direita)

Foram comparados os dados de 30 tiroides, seis paratiroides e seis fragmentos de gordura cervical, para vários níveis de captação luminosa, sendo utilizado o sistema de retenção anteriormente descrito para garantir uma distância fixa de irradiação luminosa.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente.

Durante o período de desenvolvimento deste projeto, surgiram no mercado dispositivos capazes de identificar a autofluorescência das paratiroides, construídos de raiz ou adaptação de dispositivos já utilizados para outras finalidades.

Os custos associados à aquisição destes dispositivos tornam-nos inatingíveis para hospitais de baixa casuística, provavelmente os que mais beneficiariam com a sua utilização sistemática.

Sendo a captação da autofluorescência das paratiroides essencialmente dependente da filtração da luz incidente e da luz emitida, tal poderá ser conseguido através de sistemas de custo mais reduzido, o que foi demonstrado neste trabalho.

O preço atual do sistema por nós utilizado (cerca de 3000 €) representa menos de um décimo dos sistemas comercialmente disponíveis, sendo ainda passível de aperfeiçoamento e diminuição de custos.

## C - Avaliação da autofluorescência em cirurgia humana

1 - Aplicação do dispositivo para identificação de glândulas paratiroideias inadvertidamente excisadas após cirurgia da tiroide.

Uma das possíveis vantagens da aplicação da autofluorescência de infravermelho próximo na cirurgia da tiroide, poderá ser a identificação de glândulas paratiroideias inadvertidamente excisadas, sem recurso a exame extemporâneo por corte de congelação.

Esta “biópsia ótica” poderá reduzir não só os custos inerentes ao exame extemporâneo como também o tempo de cirurgia.

A identificação imediata de glândulas paratiroideias na peça operatória, oferece ao cirurgião a possibilidade de proceder ao autotransplante das mesmas, diminuindo a possibilidade de hipocalcemia permanente.

Em 40 tireoidectomias consecutivas (36 totais e 4 hemitireoidectomias) confrontámos os resultados de utilização da autofluorescência com o exame anatomopatológico das peças operatórias, quanto à presença de tecido paratiroideu, analisando em simultâneo o impacto da paratireoidectomia incidental no desenvolvimento de hipocalcemia pós-operatória.

Foi efetuado estudo estatístico dos resultados obtidos.

2 - A autofluorescência na identificação das glândulas paratiroideias em cirurgia do hiperparatireoidismo primário.

Não sendo a cirurgia do hiperparatireoidismo primário frequente no nosso hospital, não nos foi possível a condução de um estudo prospetivo, face ao escasso número de pacientes passíveis de inclusão, anualmente.

No entanto, tendo a utilização da autofluorescência potenciais vantagens, efetuámos um estudo num subgrupo de cinco pacientes com hiperparatireoidismo primário e exames de localização não concordantes, situação em que essas vantagens poderão ser mais evidentes. A não concordância dos exames de localização (ecografia cervical e cintigrafia com Sestamibi) obriga, classicamente, à exploração cervical bilateral, face à abordagem focada com incisão mínima permitida pela concordância dos exames. A utilização da autofluorescência nestas situações poderá ajudar o cirurgião na decisão de explorar apenas um lado.

Sendo um estudo de pequena dimensão, os resultados não foram objeto de análise estatística, privilegiando-se a avaliação qualitativa do procedimento.

3 - A autofluorescência na identificação das glândulas paratiroideias em tireoidectomia total. A avaliação do valor da autofluorescência na identificação das glândulas paratiroideias durante a tireoidectomia total, bem como as suas implicações clínicas, foi, desde o início, objetivo major do nosso projeto inicial.

A alteração do paradigma vigente na cirurgia da tiroideia, ocorrida com a publicação das “Guidelines” da American Thyroid Association, que passou a privilegiar a preservação do órgão face à sua remoção completa, veio diminuir o número de tireoidectomias totais efetuadas anualmente, dificultando o recrutamento de pacientes.

Essa situação obrigou-nos a alterar o estudo prospetivo randomizado, inicialmente previsto, para um estudo comparativo entre um grupo de pacientes operado antes da disponibilidade do dispositivo e um grupo de doentes operados com o auxílio do mesmo.

Sendo um estudo em que todos os pacientes foram operados pelo mesmo cirurgião, com vasta experiência em cirurgia da tiroide, a comparação entre dois períodos, com e sem utilização da autofluorescência, diminui a influência de possível viés de observador, bem como de possível efeito de Hawthorn.

No estudo foram comparados dois grupos de doentes submetidos a tiroidectomia total pelo mesmo cirurgião num período de três anos, sendo que nos primeiros 60 pacientes as glândulas paratiroideias foram identificadas visualmente pelo cirurgião (grupo de controlo), enquanto nos 45 subsequentes foi utilizada a autofluorescência para identificação das paratiroides, com o objetivo primário de aferir a influência da identificação das paratiroides por autofluorescência na incidência de hipocalcemia pós-operatória. Foi também efetuada a comparação dos resultados da inspeção das peças operatórias (utilizando a autofluorescência) com o exame anatomopatológico das mesmas.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente.

#### D - Contributos para o conhecimento da autofluorescência das paratiroides

1 - Persistência da fluorescência das paratiroides submetidas a aquecimento, congelação e fixação em formalina.

Sendo a autofluorescência um fenómeno de causa desconhecida, procuramos dar uma contribuição para o esclarecimento da sua origem, através da avaliação da persistência da mesma em glândulas paratiroideias submetidas a condições extremas, que, de várias formas, poderiam condicionar o padrão e a intensidade da emissão luminosa.

Cinco amostras de adenomas da paratiroide, obtidas imediatamente após cirurgia, foram divididas em três fragmentos, submetidos a aquecimento a 80°, arrefecimento a -50° e fixação em formalina, sendo esses fragmentos observados antes e depois da exposição.

As imagens foram analisadas com recurso ao *software* ImageJ, sendo os resultados da intensidade de autofluorescência (valores arbitrários) tratados estatisticamente.

#### 2 - Análises espectroscópicas

Paralelamente, e com a colaboração do departamento de Química do Instituto Superior Técnico, dirigido pelo Prof. Doutor Luís Filipe Ferreira, e com o empenho e participação pessoal do próprio e da Prof<sup>a</sup> Doutora Isabel Machado, efetuámos análises espectroscópicas de vários tecidos por Ground State Diffuse Reflectance e Laser induced luminescence, procurando a existência de autofluorescência noutros comprimentos de onda, que

eventualmente permitissem melhor discriminação entre os tecidos bem como a obtenção de alguma informação sobre o possível fluoróforo responsável.

Em todos os trabalhos realizados foi efetuada a análise estatística com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics (IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Armonk, NY, Estados Unidos da América), Versões 22, 23 e 25.

Sempre que a distribuição dos dados obedecia aos critérios de normalidade (testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) foram utilizados testes paramétricos (teste t de Student, ANOVA). Quando não cumpridos estes critérios ou para dados em que estes testes não eram passíveis de utilização, empregamos testes não paramétricos (Teste do qui-quadrado, Kruskal-Wallis, Friedman).

Para todos os estudos foi considerado um nível de significância de 0,05.

## **Capítulo 4**

### **Resultados – Artigos publicados**

Os principais resultados desta investigação encontram-se publicados, estando reproduzidos neste capítulo.

**4.1 Artigo I: Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns.**

Publicado em Laser in Medical Science, 2020, Volume 35, N<sup>o</sup>1, Páginas 107-114

Publicado online: 6 de Maio de 2019

Reproduzido sob autorização Springer



## Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns

Carlos Serra<sup>1,2</sup> · Luís Silveira<sup>1</sup>Received: 15 January 2019 / Accepted: 29 April 2019  
© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2019

### Abstract

This study evaluates possible changes in weight and the secretory patterns of the thyroid and parathyroid glands irradiated with a 780-nm light-emitting diode (LED) source under conditions allowing their identification in an animal model. The use of near-infrared light sources to detect the parathyroid glands has been a subject of research due to the benefit provided to patients undergoing thyroid and parathyroid surgery. However, few studies have explored possible changes in weight and the secretory patterns of the glands when subjected to light stimulation. Thirty-two male Wistar rats were divided into two groups and subjected to cervical dissection and irradiation of the thyroid-parathyroid region under general anesthesia. The animals in group 1 (irradiated) were exposed to a 780-nm LED light beam for 180 s (dose 1.37 J/cm<sup>2</sup>), whereas the animals in group 2 (control) were not irradiated. Blood samples were collected pre-exposure, 7 min after exposure, and 30 and 60 days after exposure to measure calcium, parathyroid hormone (PTH), triiodothyronine (T<sub>3</sub>), thyroxine (T<sub>4</sub>), and thyroid-stimulating hormone (TSH) levels in both groups. Weight variations between the evaluation periods were also analyzed. Parametric statistics were used (Student's *t* test and ANOVA) after assuming normal distribution of continuous variables with the Shapiro-Wilk test. No significant variation was observed in any of the analyzed parameters pre- and postexposure. A significant increase in the calcium level was observed at 30 days in the irradiated group compared with that in the control group (11.156 ± 1.31 mg/dl vs 10.300 ± 0.30 mg/dl; *df* = 30 *p* < 0.03) but this change was no longer observed at 60 days (9.925 ± 0.23 mg/dl vs 10.014 ± 0.18 mg/dl; *df* = 14 *p* = 0.21). Irradiated rats gained less weight in the first 30 days after surgery (39.647 ± 32.39 vs 55.917 ± 22.61; *df* = 30 *p* = 0.146) and at 60 days (84.000 ± 27.36 vs 84.571 ± 5.62; *df* = 14 *p* = 0.957), no differences were observed between the two groups. No significant variations in weight development or changes in the secretory patterns of the thyroid and parathyroid glands exposed to near-infrared stimulation were observed, confirming the safety of this light source in the identification of the parathyroid glands.

**Keywords** Parathyroid · Thyroid · Autofluorescence · Surgery

### Introduction

The use of infrared light sources to induce autofluorescence in the parathyroid glands, facilitating their intraoperative identification, has been a subject of research due to the potential benefit provided to patients undergoing thyroid and

parathyroid surgery [1–4]. The parathyroids are small glands closely related to the thyroid, with which they share vascularization, whose function is to regulate calcium metabolism through parathyroid hormone (PTH) secretion [5, 6]. The parathyroid glands' proximity to the thyroid, small size, and morphological characteristics place these organs at risk during thyroid resection since they are difficult to differentiate from lymph nodes or adipose tissue in the surrounding region [6, 7].

Hypoparathyroidism is a distressing complication of thyroid surgery, occurring transiently in approximately 20% of patients and definitively in 2 to 3% of patients, causing significant morbidity and representing an important reason for medical litigation [8–10]. The use of infrared light sources to induce autofluorescence in the parathyroid glands may be an

✉ Carlos Serra  
caaserra@netcabo.pt

<sup>1</sup> CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Hospital dos SAMS, Lisboa, Portugal

important tool for their identification, especially for less experienced surgeons [11]. Paras et al. at Vanderbilt University demonstrated the autofluorescence of the parathyroid glands when stimulated by a near-infrared radiation source (785 nm), thus allowing their discrimination from surrounding tissue [12]. Subsequent studies have confirmed these results, generating great interest in the potential of the technique [13–15].

As the original device described by Paras did not allow the direct visualization of parathyroid glands, we worked on the development of an optical device that could guide directly the surgeon's action.

Although near-infrared radiation does not have harmful ionizing effects on tissues, the use of a light source on secretory tissues, even at a low intensity, may trigger changes in the associated secretory pattern, the magnitude of which requires clarification [16]. Studies on the effects of light stimulation on the secretory pattern of the thyroid are scarce, and only one study has evaluated possible changes associated with exposure to 780 nm infrared light [17]. To the best of our knowledge, no studies have investigated the effects of infrared light stimulation on PTH secretion.

In a study in mice, Azevedo et al. found changes in the levels of the hormones triiodothyronine ( $T_3$ ) and thyroxine ( $T_4$ ) in the first 7 days after stimulation with a 780-nm diode laser ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) [17]. Mohammed et al. analyzed the effects of diode laser treatment ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) on the cervical region of rabbits on thyroid function and observed transient alterations, with decreased  $T_3$  and  $T_4$  and increased thyroid-stimulating hormone (TSH) levels. These changes normalized at 30 days [18]. Fronza et al. evaluated the effect of aluminum gallium arsenide (AlGaAs) laser therapy at  $\lambda = 830 \text{ nm}$  ( $120 \text{ J/cm}^2$ ) in rabbits and observed no changes in  $T_3$  or  $T_4$  levels [19]. Lerma et al. studied the effect of helium-neon (HeNe) laser radiation at 632.8 nm ( $5 \text{ J/cm}^2$ ) on Wistar rats and showed no significant changes in the patterns of hormone secretion [20]. In a study with rabbits exposed to AlGaAs radiation at 830 nm, Weber et al. found exposure-associated changes in  $T_3$ ,  $T_4$ , and calcium levels, although these levels remained within the normal ranges [21]. In these studies, the thyroid-parathyroid region was not directly exposed to the light source as the region was covered by the skin and muscle layers. Given that near-infrared radiation can penetrate tissue, its effects may not have been correctly evaluated [16, 22].

The present study evaluates the effects of direct exposure to a 780-nm LED source on the secretory patterns of thyroid and parathyroid tissues under conditions allowing identification of the parathyroid glands in an animal model [23, 24]. The null hypothesis was the calcium, PTH,  $T_3$ ,  $T_4$ , and TSH blood levels were the same in the 780-nm LED exposed rats and in the non-LED exposed rats (control group) for each time-point.

## Materials and methods

This study used 32 male Wistar rats aged 2–3 months produced in the vivarium of the School of Health Sciences of University of Beira Interior (Universidade da Beira Interior—UBI) (Fig. 1). The experimental protocol was approved by the Directorate General of Agriculture and Veterinary Science.

The rats were kept in individual ventilated cages (Seal safe Plus GR 900 Tecniplast S.p.A, Bugiggiatte, Italy) and provided with food (Standard Diet 4RF18, Mucedola srl, Settimo Millanese, Italy) and water ad libitum. On day 1, after weight measurement (Balance Tx2202L, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and physical examination (observation), 32 rats were subjected to general anesthesia via isoflurane inhalation and underwent cervical incision and venipuncture of the jugular vein for determination of calcium, PTH,  $T_3$ ,  $T_4$ , and TSH levels.

General anesthesia was induced with 5% isoflurane (IsoFlo, Zoetis Inc., Parsippany, NJ, USA) in Oxygen (2.4 Liters/min) and maintained with 2% isoflurane in oxygen (2.4 Liters/min) delivered by a Matrx VME 2N Anesthesia Machine (Matrx Inc., Orchard Road, New York, USA).

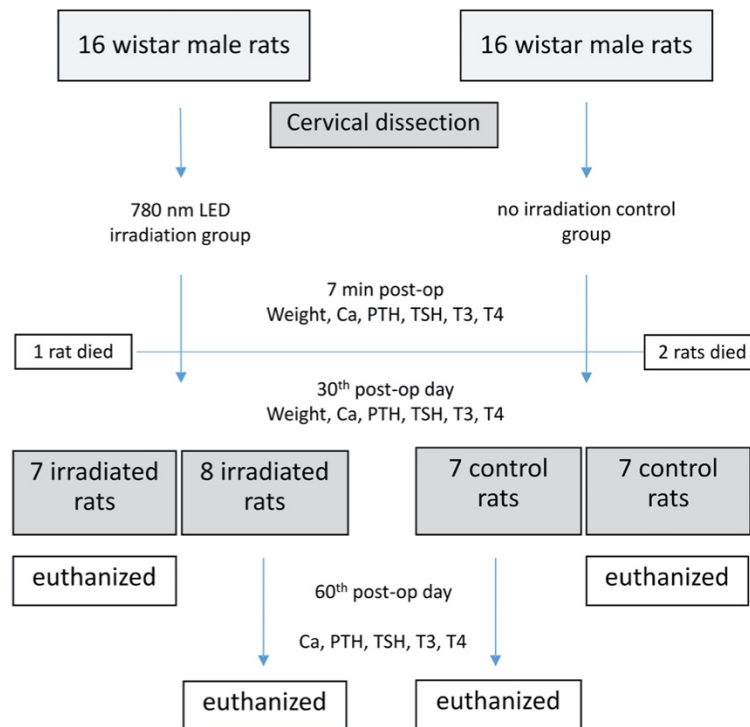
Measurements of calcium were made using Advia 1800 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, Camberley, United Kingdom) with calcium\_2 (CA\_2) reagent (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, United Kingdom).

Measurements of PTH,  $T_3$ ,  $T_4$ , and TSH were made using Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) with specific Advia Centaur reagents (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA).

The animals were divided into two groups:

- Group 1 (irradiated; 16 rats)—cervical dissection was performed to expose the thyroid gland, followed by irradiation of the region for 180 s with 780 nm light (dose:  $1.37 \text{ J/cm}^2$ ) emitted by a collimated light-emitting diode (LED) (M780 L3C1, Thorlabs, Newton, NJ, USA) with a 780-nm excitation bandpass filter (#84121, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA). The fluorescence emitted by the parathyroid and thyroid glands was visualized with a Nikon D70 DSLR camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) converted to infrared radiation capture and a Nikon Nikkor 50-mm f/1.8 AF M/A lens (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) with an 832-nm emission bandpass filter (#84123, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA). To ensure equal exposure distance for all animals, the LED was coupled to a retention device, with the focus placed approximately 20 cm from the cervical region. The exposure time was calculated based on times reported in

Fig. 1 Diagram of inclusion Wistar male rats and study groups



the literature for identification of the parathyroid glands using similar systems.

- Group 2 (control; 16 rats)—cervical dissection was performed to expose the thyroid gland similarly to group 1, but no cervical irradiation was administered.

After 7 min, venipuncture of the jugular vein was performed again to measure calcium, PTH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and TSH levels. After surgery, the rats in both groups were maintained under similar conditions and medicated with an analgesic agent (Meloxicam 1 mg/Kg SC, Maxican 0.2%, Ourofino Saúde Animal, Osasco, Brazil) on the first postoperative day. On the 30th postoperative day, under general anesthesia, blood was collected from all animals for determination of calcium, PTH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and TSH levels. Half of the animals from each group were then euthanized by cardiac puncture.

The surviving animals were euthanized by cardiac puncture under general anesthesia on the 60th postoperative day, after further blood collection for determination of the same parameters. Blood tests were performed by the Laboratório Afídea (Castelo Branco, Portugal) following the protocols in the laboratory's manual of good practices.

The data were analyzed statistically using IBM SPSS Statistics V.22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). Student's *t* test and ANOVA were used considering a significance level of 0.05, after assuring the normal distribution of data with Shapiro-Wilk test.

Due to the lack of previous studies, power was calculated for each individual comparison according to the sample size, calculated mean difference, and its variance. The power (1-β; being β the type II error) is presented as a range between the lowest and higher calculated power.

### Results

No objective variation in the behavior of the irradiated animals was observed compared with that of the animals in the control group. Three animals (one from the irradiated group and two from the control group) did not resist the second blood collection and died in the immediate postoperative period. The remaining animals exhibited full recovery of their vitality and behavioral patterns prior to the intervention.

**Table 1** The means and standard deviations of the weights (in grams) of the animals throughout the study

	Irradiated	Control	<i>p</i> value
Initial weight	308.30 (39.63)	307.33 (41.72)	0.948
Weight at 30 days	348.65 (28.42)	363.25 (44.59)	0.290
Weight at 60 days	387.25 (12.47)	391.71 (14.05)	0.815

Descriptive data of rats' weight, serum calcium, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and TSH for each group in each time-point are summarized in Tables 1, 2, 3, 4, and 5 (respectively).

Serum calcium at 30th postoperative day was higher in the irradiated group (11.156 ± 1.31 mg/dl) compared with controls (10.300 ± 0.30 mg/dl) *p* = 0.014 (df = 18.472—equal variances not assumed)—Table 2.

Pre cervical dissection serum T<sub>4</sub> and 7-min post cervical dissection serum T<sub>4</sub> was lower in irradiated rats (3.15 ± 0.55 vs 3.75 ± 0.78; df = 22; *p* = 0.037 and 2.55 ± 0.78 vs 3.57 ± 0.85; df = 20; *p* = 0.003, respectively)—Table 4.

There were no statistical significant differences in all the other measured parameters.

Figure 2 shows the mean weight variations at 30 and 60 days. Figures 3, 4, 5, and 6 show the mean variations of the analyzed parameters between the initial and immediate postexposure blood samples, between the initial samples and those collected at 30 days, and between the samples at 30 and 60 days, respectively.

Weight difference between 60th-day post cervical dissection and 30th-day post cervical dissection was higher in irradiated rats compared with control (39.13 ± 10.855 vs 17.00 ± 8.156; df = 8.59 *p* = 0.038—equal variances not assumed).

Difference between 30th-day post cervical dissection and pre cervical dissection was higher in irradiated rats (0.924 ± 0.29 vs 0.083 ± 0.14; df = 2.72 *p* = 0.016—equal variances not assumed).

All the other measured differences between time-points for rats' weight, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and TSH were not statistically different.

The PTH levels obtained were the same in all animals (irradiated and control groups) and were lower than the

**Table 2** The means and standard deviations of serum calcium values (in milligrams per deciliter) before irradiation, postirradiation, and at 30 and 60 days

	Irradiated	Control	<i>p</i> value
Initial calcium	10.260 (0.44)	10.217 (0.34)	0.380
Calcium postexposure	10.111 (0.34)	10.033 (0.32)	0.270
Calcium at 30 days	11.156 (1.31)	10.300 (0.30)	0.014
Calcium at 60 days	9.925 (0.23)	10.014 (0.18)	0.210

**Table 3** The means and standard deviations of T<sub>3</sub> values (in milligrams per deciliter) before irradiation, postirradiation, and at 30 and 60 days

	Irradiated	Control	<i>p</i> value
Initial T <sub>3</sub>	0.636 (0.07)	0.684 (0.11)	0.150
T <sub>3</sub> postexposure	0.646 (0.10)	0.689 (0.13)	0.280
T <sub>3</sub> at 30 days	0.634 (0.98)	0.639 (0.07)	0.340
T <sub>3</sub> at 60 days	0.346 (0.07)	0.310 (0.06)	0.150

lowest detectable value of the test; consequently, this parameter could not be analyzed. Therefore, parathyroid function was inferred from the variations in calcium levels.

Power calculation for comparison between two means with a sample size of *n* = 32 (1:1) at 30th postoperative day and *n* = 16 (1:1) for 60th postoperative day analysis varied between 1-β ∈ (0.069–0.3607).

### Discussion

The need to collect sufficient amounts of blood for the planned analyses led to a collected volume close to the maximum safety levels for the animals. For the three animals that died in the immediate postoperative period, both the blood volume collected and difficulty in hemostasis resulted in significant blood loss; therefore, the outcome was not related to irradiation exposure.

No previous studies have analyzed weight variations associated with light exposure. In the present study, the irradiated group gained less weight initially, although the difference was not statistically significant, and then a compensatory increase in weight occurred between 30 and 60 days, resulting in no differences in weight between the groups at the end of the study.

No studies have explored the effects of near-infrared irradiation on PTH secretion or in the calcium levels regulated by this hormone. The PTH values obtained, which were all below the lower detection threshold of the kit used, did not allow direct evaluation of parathyroid function; consequently, parathyroid function was evaluated

**Table 4** The means and standard deviations of T<sub>4</sub> values (in milligrams per deciliter) before irradiation, postirradiation, and at 30 and 60 days

	Irradiated	Control	<i>p</i> value
Initial T <sub>4</sub>	3.15 (0.55)	3.75 (0.78)	0.037
T <sub>4</sub> postexposure	2.55 (0.78)	3.57 (0.85)	0.003
T <sub>4</sub> at 30 days	3.95 (0.72)	4.04 (0.75)	0.760
T <sub>4</sub> at 60 days	4.11 (0.85)	4.64 (0.65)	0.200

**Table 5** The means and standard deviations of TSH values (in milligrams per deciliter) before irradiation, postirradiation, and at 30 and 60 days

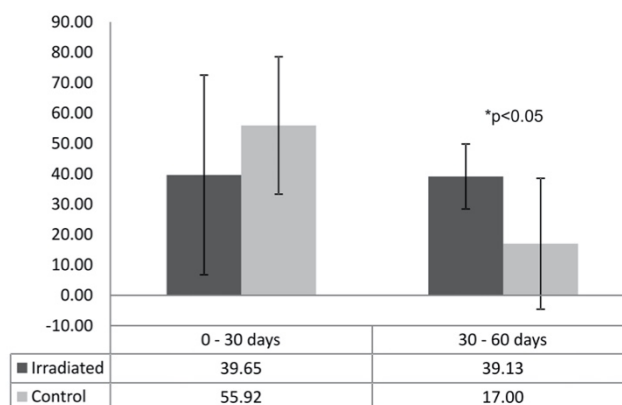
	Irradiated	Control	<i>p</i> value
Initial TSH	0.0046 (0.002)	0.0044 (0.001)	0.420
TSH postexposure	0.0037 (0.001)	0.0038 (0.001)	0.490
TSH at 30 days	0.0035 (0.002)	0.0029 (0.001)	0.160
TSH at 60 days	0.0026 (0.001)	0.0033 (0.002)	0.170

indirectly from calcium levels since they are regulated by PTH. Because the half-life of PTH is approximately 5 min, alterations in the secretion of this hormone would have already been reflected in the calcium levels measured 7 min after the end of exposure, but no such alter-

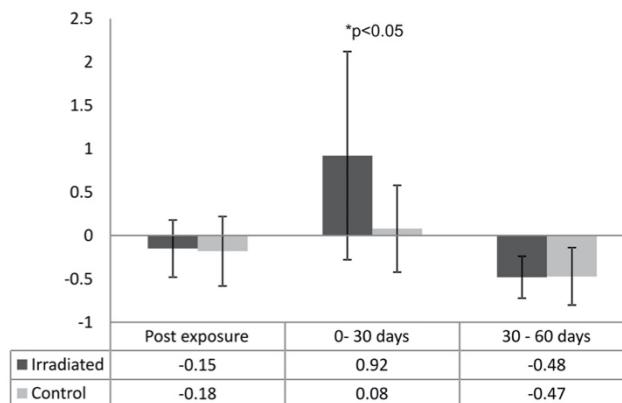
ations were observed. A transient effect on calcium levels was evident at 30 days, which were increased in the irradiated animals, but the levels normalized at 60 days.

The levels of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and TSH did not vary significantly contrary to the reports of Mohammed et al. [18] and Azevedo et al. [17] but consistent with the results of Lerma et al. [20], Fronza et al. [19], and Weber et al. [21]. The changes in T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> reported by Azevedo et al. [17] occurred between days 1 and 7 postexposure, and our study does not exclude the possibility that such changes may occur since we did not collect blood over this period. However, the absence of alterations immediately after exposure seems to reduce this possibility, and the absence of long-term changes, i.e., at 30 and 60 days suggests the safety of irradiation under the conditions tested. The decrease in T<sub>3</sub> levels in both groups at 60 days

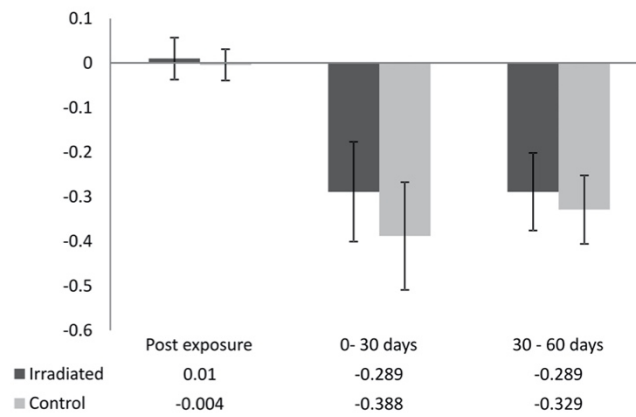
**Fig. 2** The mean weight variations (in grams) of the animals throughout the study



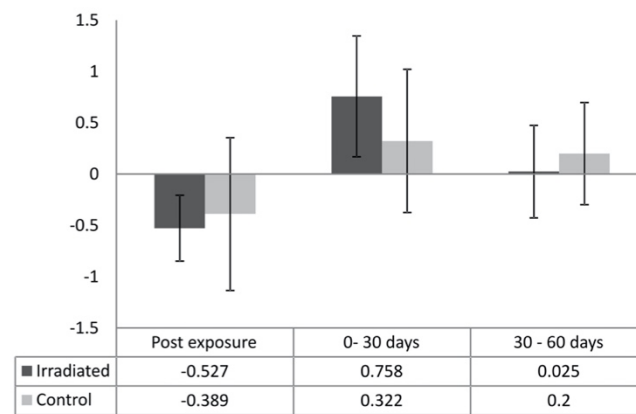
**Fig. 3** Calcium variations after exposure, between 0 and 30 days, and between 30 and 60 days



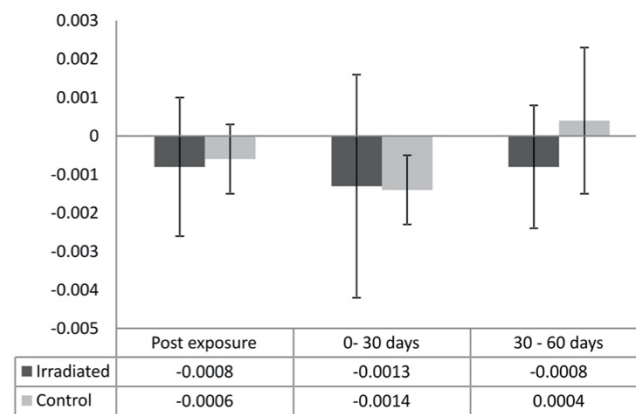
**Fig. 4** Variations in  $T_3$  values after exposure, between 0 and 30 days, and between 30 and 60 days



**Fig. 5** Variations in  $T_4$  values after exposure, between 0 and 30 days, and between 30 and 60 days



**Fig. 6** Variations in TSH values after exposure, between 0 and 30 days, and between 30 and 60 days



compared with the pre-exposure levels cannot be explained since the same variation was not observed in T<sub>4</sub> and TSH levels.

The lower power is frequently associated with animal studies where the sample size is usually lower than the needed to the standard 20% type II error. Sample size to achieve 80% power makes most animal studies unfeasible. Since there is no previous study in this field, this limitation should be seen as an opportunity to further investigations.

### Conclusion

Alterations in the hormone secretory patterns of the irradiated thyroid and parathyroid glands were minimal and transient, with normalization of all parameters at 60 days. No persistent clinically or statistically significant weight variations were observed. Therefore, the results of this study do not reject our null hypotheses and confirm the safety of directly exposing the thyroid and parathyroid glands to a near-infrared light source under conditions allowing parathyroid gland identification by autofluorescence.

**Acknowledgments** This study would not have been possible without the collaboration of Dr. Joaquim Machado Caetano, Dr. Sofia Jorge, and the technicians at Laboratório Affidea who conducted the laboratory analyses of all the animals. At the UBI vivarium, we received indispensable help from the technicians Maria João and Maria José with blood collection and surgery as well as with the care and maintenance of the animals.

We had also the collaboration of Professors Graça Baltazar and Manuel Lemos and Drs. Maria do Rosário Custódio, António Gomes and Sílvia Silva.

We express our gratitude to all who helped with this study.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The study was approved by the ethical commission of the Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior-Portugal (CE-FCS-2014-022) and by Direção-geral de Agricultura e Veterinária (0421/000/000/2018), and performed respecting the principles of European Directive 2010/63/EU.

### References

- McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT (2013) A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery* 154:1371–1377
- Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R (2016) Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *J Am Coll Surg* 223:374–380
- Ladurner R, Sommerer S, Arabi NA, Hallfeldt KKJ, Stepp H, Gallwas JKS (2017) Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surg Endosc* 31:3140–3145
- Kim SW, Lee HS, Ahn YC, Park CW, Jeon SW, Kim CH, Ko JB, Oak C, Kim Y, Lee KD (2018) Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 226:165–172
- Akerström G, Malmaeus J, Bergström R (1984) Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery* 95:14–21
- Policeni BA, Smoker WR, Reede DL (2012) Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Semin Ultrasound CT MR* 33:104–114
- Fancy T, Gallagher D 3rd, Hornig JD (2010) Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin N Am* 43: 221–227 vii
- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK, Hölzer S (2000) Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. U.S. and German thyroid cancer study group. An American College of Surgeons Commission on cancer patient care evaluation study. *Cancer* 89:202–217
- Pattou F, Combemale F, Fabre S, Carnaille B, Decoux M, Wemeau JL, Racadot A, Proye C (1998) Hypocalcemia following thyroid surgery: incidence and prediction of outcome. *World J Surg* 22: 718–724
- Rafferty MA, Goldstein DP, Rotstein L, Asa SL, Panzarella T, Gullane P, Gilbert RW, Brown DH, Irish JC (2007) Completion thyroidectomy versus total thyroidectomy: is there a difference in complication rates? An analysis of 350 patients. *J Am Coll Surg* 205:602–607
- Sosa JA, Bowman HM, Tielsch JM, Powe NR, Gordon TA, Udelsman R (1998) The importance of surgeon experience for clinical and economic outcomes from thyroidectomy. *Ann Surg* 228: 320–330
- Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A (2011) Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 16:067012
- McWade MA, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED, Galloway RL, McDonald WH, Broome JT (2016) Development of an intraoperative tool to detect parathyroid gland autofluorescence. Vanderbilt University, Tennessee
- De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben Lakhdar A, Laplace-Builhé C, Hartl D (2016) Intraoperative near-infrared imaging for parathyroid gland identification by auto-fluorescence: a feasibility study. *World J Surg* 40:2131–2138
- van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, Swijnenburg RJ, Tummers QR, Hutteman M, Hamming JF, Kievit J, Frangioni JV, van de Velde CJ, Vahrmeijer AL (2014) Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of parathyroid adenomas with use of low-dose methylene blue. *Head Neck* 36:853–858
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Berlin
- Azevedo LH, Aranha AC, Stolf SF, Eduardo Cde P, Vieira MM (2005) Evaluation of low intensity laser effects on the thyroid gland of male mice. *Photomed Laser Surg* 23:567–570
- Mohammed IFR, Al-Azawi TS, AL-Mustawfi NS (2011) Effect of laser treatment on thyroid gland hormones in female rabbits. *Iraqi J Vet Sci* 25:61–64
- Fronza B, Somacal T, Mayer L, de Moraes JF, de Oliveira MG, Weber JB (2013) Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLL) on thyroid hormone function in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42:26–30
- Lerma E, Hevia A, Rodrigo P, Gonzalez-Campora R, Armas JR, Galera H (1991) The effect of HeNe laser radiation on the thyroid gland of the rat. *Int J Exp Pathol* 72:379–385
- Weber JB, Mayer L, Cenci RA, Baraldi CE, Ponzoni D, Gerhardt de Oliveira M (2014) Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant

- 
- placement in an experimental rabbit model. *Photomed Laser Surg* 32:612–617
22. Stolik S, Delgado JA, Pérez A, Anasagasti L (2000) Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. *J Photochem Photobiol B* 57:90–93
23. Kim SW, Lee HS, Lee KD (2017) Intraoperative real-time localization of parathyroid gland with near infrared fluorescence imaging. *Gland Surg* 6:516–524
24. Kittel B, Ernst H, Kamino K (1996) Anatomy, histology, ultrastructure, parathyroid, rat, in endocrine system. Springer, Berlin Heidelberg, pp 330–333

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **4.2 Artigo II: Evaluation of structural and ultrastructural changes of parathyroid glands after near infrared irradiation - study on an animal model**

Publicado em PeerJ

Publicado online: 5 de Agosto de 2021

Licença CC-BY 4.0



# Evaluation of structural and ultrastructural changes in thyroid and parathyroid glands after near infrared irradiation: study on an animal model

Carlos Serra<sup>1,2</sup> Luis Silveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital do SAMS, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Universidade da Beira Interior, Faculdade de Ciências da Saúde, Covilhã, Portugal

## ABSTRACT

Intraoperative identification of parathyroid glands is a tough task for surgeons performing thyroid or parathyroid surgery, because the small size, color and shape of these glands hinder their discrimination from other cervical tissues. In 2011, Paras described the autofluorescence of parathyroid glands, a property that could facilitate their intraoperative identification. Parathyroid glands submitted to a 785 nm laser beam emit fluorescence in the near infrared range, with a peak at 822 nm. As the intrinsic properties of secretory tissues may be affected by the exposure to the near infrared light, a situation that could preclude their intraoperative utilization, the authors compared the structural and ultra-structural patterns of rat's thyroid and parathyroid glands submitted to irradiation replicating the conditions that allow their intraoperative identification, with those of non irradiated animals. Twenty-four Wistar rats were divided into six groups: animals of Groups 1, 3 and 5 were submitted under general anesthesia to direct irradiation of the cervical area with a 780 nm LED light for 3 minutes through a cervical incision, and animals of Groups 2, 4 and 6 were submitted to cervical dissection without irradiation. Animals of were euthanized immediately (Groups 1 and 2), at Day 30 (Groups 3 and 4) at and at Day 60 (Groups 5 and 6) and thyroid and parathyroid glands were removed: one lobe was prepared for conventional pathological examination and the other lobe for electron microscopy observed by three experienced pathological experts. Twenty-four samples were prepared for conventional histology and there were no alterations reported in any group. Due to technical problems, only 21 samples were observed by electron microscopy and there were no differences in the ultrastructure of parathyroid and thyroid glands, namely the nuclear pattern, mitochondria, endoplasmic reticulum or secretory granules, in any of the groups. These results confirm the innocuity of near infrared irradiation, allowing its intraoperative utilization.

**Subjects** Biochemistry, Drugs and Devices, Surgery and Surgical Specialties, Histology

**Keywords** Parathyroid, Thyroid, Near infrared irradiation, Structural alterations

## INTRODUCTION

Hypoparathyroidism is a frequent complication of thyroid surgery, occurring in up to 30% of total thyroidectomies, and is an important cause of morbidity and litigation.

Submitted 15 April 2021

Accepted 10 July 2021

Published 5 August 2021

Corresponding author

Carlos Serra, caaserra@netcabo.pt,  
caaserra@me.com

Academic editor

Nicholas Syn

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 9

DOI 10.7717/peerj.11891

© Copyright

2021 Serra and Silveira

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

**OPEN ACCESS**

**How to cite this article** Serra C, Silveira L. 2021. Evaluation of structural and ultrastructural changes in thyroid and parathyroid glands after near infrared irradiation: study on an animal model. *PeerJ* 9:e11891 <http://doi.org/10.7717/peerj.11891>

The parathyroid glands' small size, colour and resemblance to lymph nodes and fat tissue make their intraoperative identification difficult and highly dependent on the surgeon's experience (*Akerstrom, Malmaeus & Bergstrom, 1984; Bergenfelz et al., 2020; Edafe & Balasubramanian, 2017*). The development of an effective optical device to help surgeons in the identification of parathyroid glands in thyroid and parathyroid surgery could have a strong impact on the reduction of postoperative hypocalcaemia.

*Paras et al. (2011)* described the autofluorescence of parathyroid glands when exposed to a near-infrared light source, a property that allows their discrimination from other cervical tissues. Parathyroid glands submitted to a 785 nm laser beam emit fluorescence with a peak at 822 nm. Even though the thyroid gland also emitted fluorescence at the same wavelength, its inferior intensity allows easy discrimination.

Since that first description, other groups have confirmed these results (*DeLeeuw et al., 2016; Falco et al., 2016; Kim et al., 2016; McWade et al., 2013*). Near-infrared radiation is characterized by its capacity to penetrate up to five mm into biological tissues (*Lakowicz, 2006; Monici, 2005; Stolik et al., 2000*). Although the light intensity used for stimulation is small, it is not clear whether it is harmless for tissues; therefore, it is important to test the response of the secretory tissues to the irradiation by studying possible structural and ultrastructural changes as well as changes in the secretory pattern.

In the literature, works on the effects of utilization of near-infrared radiation for diagnostics and localization of thyroid and parathyroid glands are scarce; however, there are some publications on the effects of this radiation when used with therapeutic intention in dental medicine (*Azevedo et al., 2005; Fronza et al., 2013; Lerma et al., 1991; Mayer et al., 2013; Mohammed, Al-Azawi & AL-Mustawfi, 2011; Weber et al., 2014*).

In spite of the lack of information about possible effects on the structure or function of thyroid and parathyroid glands submitted to near-infrared irradiation, several works have stated its clinical application for intraoperative identification of parathyroid glands with relevant impact in clinical practice (*Dip et al., 2019; Kim et al., 2016; Ladurner et al., 2017; McWade et al., 2016*).

In a previous work, the authors studied the influence of near-infrared radiation emitted by a 780 nm LED light on the secretory pattern of thyroid and parathyroid glands, replicating the conditions that allow the identification of parathyroid glands by autofluorescence, and concluded that although some alterations occurred, they are transient and without great significance, thus confirming the safety of autofluorescence for this purpose (*Serra & Silveira, 2019*).

Weber showed that utilization of a low-intensity laser applied to dental alveola of rats after dental extraction and implant collocation could influence thyroid function and calcium levels, whereas Fronza did not find any changes in thyroid hormone levels in rabbits using GaAlAs lasers ( $\lambda = 830$  nm, 120 J/cm<sup>2</sup>) (*Fronza et al., 2013; Weber et al., 2014*).

Lerma studied structural and ultrastructural changes in thyroid glands of rats submitted to HeNe lasers ( $\lambda = 632$  nm, 75 J/cm<sup>2</sup>) and found mild degenerative changes on conventional histology that recover in less than 3 months. Some minor long-term lesions

were also identified using electron microscopy: an increased number of peroxisomes and crystalline structures (Lerma et al., 1991).

In all these studies, exposure of the thyroid and parathyroid area was not direct because irradiation was done via the skin and adjacent soft tissue and only one study analysed possible structural or ultrastructural modifications in the tissues submitted to near-infrared radiation. Furthermore, the different characteristics of the radiation used preclude comparisons.

The structural unit of the thyroid gland in rats, as in humans, is the follicle, which is filled with a secretory product called colloid. Follicles are irregularly spheroid and separated by a delicate fibrovascular stroma containing abundant capillaries, lymphatics and nerves (Asa & Mete, 2018).

Human parathyroid glands (usually four) are tiny yellow-brown glands of size  $6 \times 3$  mm localized posteriorly to the thyroid gland (Akerstrom, Malmaeus & Bergstrom, 1984; Policeni, Smoker & Reede, 2012). By contrast, rats only have one pair of parathyroid glands (originating from the third pharyngeal pouch, as with the human inferior parathyroid glands) that migrate caudally, accompanying the caudal migration of the thymus (Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996).

Parathyroid glands are surrounded by a thin fibrous capsule that covers a net of fat tissue, vessels and glandular parenchyma. A rich network of arterioles, venules and capillary vessels vascularize the glands (Chen, Emura & Kubo, 2013; Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996).

Normal human parathyroid glands present two types of cells:

- chief cells—small dark cells that produce and release parathyroid hormone (PTH) and turn clear when they release PTH;
- oxyphilic cells—with clear tonality and unknown function, whose number increases with age (Asa & Mete, 2018).

Rat parathyroid glands are composed only of chief cells. Different tones of chief cells (dark or lighter), which are associated with different functional status, can be seen in adult rats (Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996). Chief cells in rats are polygon shaped and organized in cordons or laminae surrounded by a thin stroma of connective tissue and a capillary net (Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996). Using conventional staining, the cytoplasm appears granular and is surrounded by an almost imperceptible cellular membrane. Nuclei are round or oval with a fine dispersion of chromatin (Kittel, Ernst & Kamino, 1996).

On transmission electron microscopy, the plasmatic membrane of chief cells in rats is smooth on the basal side; on the lateral sides, the cells are connected by desmosomes or tight junctions, whereas smooth areas or interdigitations between cells can be found in the internal portion of the cordons. Nuclei have a basal localization and are often indented, with medial electronic density (Kittel, Ernst & Kamino, 1996). The Golgi apparatus is well developed and located on the apical portion of the cell, as are the secretory granules (Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996).

Two types of secretory granules can be found (*Chen, Emura & Kubo, 2013; Isono, Shoumura & Emura, 1990; Kittel, Ernst & Kamino, 1996*):

- small granules with a large halo (100–400 nm);
- large granules with a smaller halo (500–700 nm).

Mitochondria, rough endoplasmic reticulum and free ribosomes can be found in the chief cells. Rat mitochondria are long and wavy structures (*Kittel, Ernst & Kamino, 1996*).

In this work we evaluate the structural and ultrastructural patterns of thyroid and parathyroid glands submitted to a 780 nm LED light—replicating the conditions that allow their identification by autofluorescence in an animal model—compared with those of non-irradiated animals.

## MATERIALS & METHODS

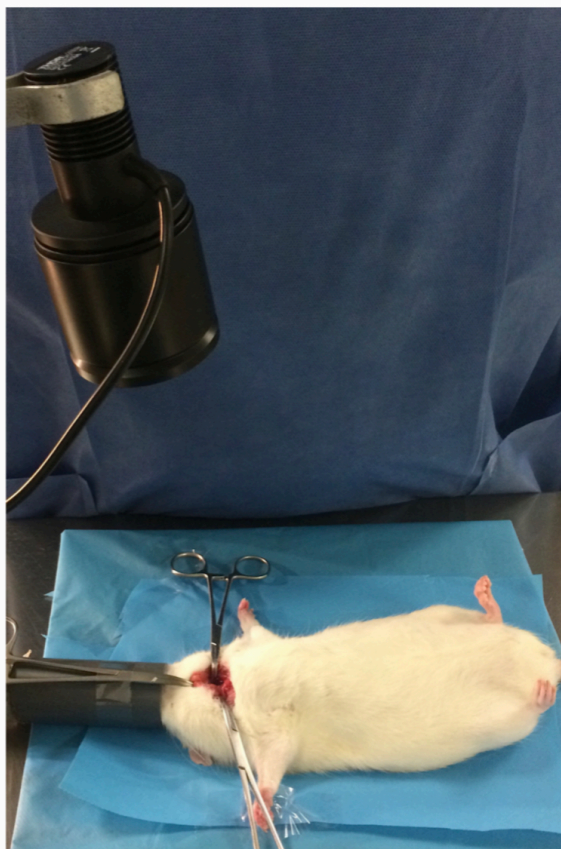
Twenty-four male Wistar rats aged 10–12 weeks, produced in the vivarium of the School of Health Sciences of the University of Beira Interior (UBI), were used in the study. The experimental protocol was approved by the General Directorate of Agriculture and Veterinary Science (Approval number 0421/000/000/2018).

Experiments were conducted according to the methodology described by the same authors in a previous work namely animal housing, anesthesia, surgical procedure and irradiation conditions (*Serra & Silveira, 2019*).

The rats were kept in individual ventilated cages (Sealsafe Plus GR 900; Tecniplast S.p.A., Buggiate, Italy) in an animal room under controlled conditions (temperature: 22–24 °C; relative humidity: 40–60%) and provided with food (Standard Diet 4RF18; Mucedola srl, Settimo Millanese, Italy) and water ad libitum.

Rats were divided into six groups (three experimental; three control) of four animals each and submitted to general anaesthesia via isoflurane inhalation. General anaesthesia was induced with 5% isoflurane (IsoFlo; Zoetis Inc., Parsippany, NJ, USA) in oxygen (2.4 l/min) and maintained with 2% isoflurane in oxygen (2.4 l/min) delivered by a Matrx VME 2N anaesthesia machine (Matrx Inc., Orchard Road, New York, USA). After a horizontal cervical incision, neck tissues were dissected to expose the trachea and identify the thyroid gland.

For animals in Groups 1, 3 and 5, a 780 nm light beam emitted by a collimated LED (M780 L3C1; Thorlabs, Newton, NJ, USA) with a 780 nm excitation bandpass filter (84121 Edmund Optics, Barrington, NJ, USA) was delivered to the cervical area for 180 s (dose: 1.37 J/cm<sup>2</sup>). The fluorescence emitted by the parathyroid and thyroid glands was visualized with a Nikon D70 DSLR camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) converted to infrared radiation capture and a Nikon Nikkor 50 mm f/1.8 AF M/A lens (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) with an 832 nm emission bandpass filter (84123 Edmund Optics, Barrington, NJ, USA). To ensure equal exposure distance for all animals, the LED was coupled to a retention device (*Fig. 1*), with the focus placed approximately 20 cm from the cervical region (irradiated area: 20 mm; power density: 0.067 W/cm<sup>2</sup>). The exposure time was calculated based on the times reported in the literature for identification of parathyroid



**Figure 1** Intraoperative image showing the LED source.

[Full-size](#) [DOI: 10.7717/peerj.11891/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.11891/fig-1)

glands using similar systems (*Kim et al., 2018*). For animals in Groups 2, 4 and 6, the procedure was done without neck infrared irradiation.

Rats in Groups 1 and 2 were euthanized immediately after surgery and a thyroparathyroidectomy was performed. Euthanasia was performed by cardiac puncture under general anaesthesia. Thyroparathyroid blocks were divided by the isthmus, with one half fixed in 10% formalin for conventional histological examination and the other half fixed in gluteraldehyde for transmission electron microscopy, both conserved at a temperature of 5 °C. Animals in Groups 3, 4, 5 and 6 were maintained in similar conditions after surgery, medicated with an analgesic agent (meloxicam 1 mg/kg sc, Maxicam 0.2%; Ourofino Saúde Animal, Osasco, Brazil) and submitted to the same procedure at Day 30 (Groups 3

and 4) and Day 60 (Groups 5 and 6) postoperatively. Collected tissues were prepared for conventional histological examination at the Centro de Diagnóstico Anatomopatológico (Lisbon, Portugal), stained with haematoxylin-eosin and lamel mounted.

Preparation for electron microscopy was done at the Pathology Department of the Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca (Amadora, Portugal) using the following procedure: after collection, samples were fixed in gluteraldehyde and buffered in 0.1 M sodium cacodylate with sucrose (primary fixer), 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate with sucrose (secondary fixer) and 0.5% uranyl acetate in 0.1 M acetate acetic acid. Samples were then dehydrated with crescent concentrations of ethyl alcohol, transitioned with propylene oxide and then embedded in epoxy resin (araldite). Ultrathin cuts were made with a Leica EM UC7 RT ultramicrotome in copper grills (200 mesh, 79 nm) and contrasted using Reynolds lead citrate.

Three experienced pathologists examined the samples using optical microscopy, searching for morphological changes in the thyroid or parathyroid glands without knowing about the exposure to near-infrared radiation. A brief report was given of each observation. Observations with transmission electron microscopy were made with a Hitachi H-7650 120 kV transmission electron microscope in the Laboratório de Microscopia Electrónica, Instituto Gulbenkian de Ciência. Selected images were observed by the same pathologists who carried out the histological examination.

## RESULTS

Table 1 shows the results of optical microscopy of samples collected immediately, 30 days and 60 days after exposure, respectively. Pathological examination of the samples did not find significant alterations to the usual follicular structure of thyroid cells in any of the groups. Structural changes also were not identified in the parathyroid glands, with the chief cells in all the groups having the same characteristics.

Technical problems occurred during processing of the tissues so that only 21 samples were amenable to observation using electron microscopy. Table 2 shows the electron microscopy results for samples collected immediately, 30 days and 60 days after exposure. No qualitative ultrastructural alterations were observed using electron microscopy in either the exposed or control groups, suggesting that there was no degeneration of any organelles: mitochondria, rough endoplasmic reticulum, secretory granules and nucleus of both groups had the same characteristics.

The presence of peroxisomes or crystalline structures was not observed in any sample. As with conventional histology, no ultrastructural features allowed the distinction between irradiated and non-irradiated tissues using electron microscopy. Figures 2 and 3 show the optical microscopy and electron microscopy images acquired for samples of Groups 1 and 2.

## DISCUSSION

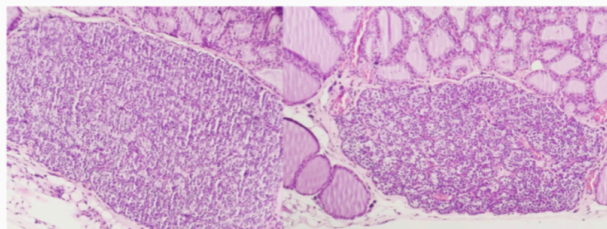
The possibility that irradiation of the thyroid and parathyroid area could promote structural or ultrastructural changes in targeted tissues must be considered when facing

**Table 1** Results of optical microscopy of samples collected immediately after exposure, 30 and 60 days after exposure.

	<i>n</i>	Thyroid identified	Morphological alterations on thyroid	Parathyroid identified	Morphological alterations on parathyroid
<b>After exposure</b>					
Exposed (group 1)	4	4	0	4	0
Control (group 2)	4	4	0	3	0
<b>30 days after exposure</b>					
Exposed (group 3)	4	4	0	4	0
Control (group 4)	4	4	0	3	0
<b>60 days after exposure</b>					
Exposed (group 5)	4	4	0	4	0
Control (group 6)	4	4	0	3	0

**Table 2** Results of electron microscopy of samples collected immediately after exposure, 30 and 60 days after exposure.

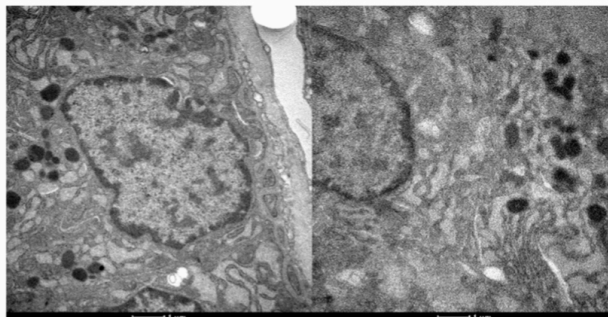
	<i>N</i>	Ultrastructural alterations	
		Thyroid	Parathyroid
<b>After exposure</b>			
Exposed (group 1)	4	0	0
Control (group 2)	3	0	0
<b>30 days after exposure</b>			
Exposed (group 3)	4	0	0
Control (group 4)	3	0	0
<b>60 days after exposure</b>			
Exposed (group 5)	4	0	0
Control (group 6)	3	0	0



**Figure 2** Optical microscopy of parathyroid samples of groups 1 (left) and 2 (right) HE X100.

[Full-size](#) [DOI: 10.7717/peerj.11891/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.11891/fig-2)

the known tissue penetration capacity of near-infrared radiation allied to intrinsic features of endocrine tissues (Stolik et al., 2000). As the magnitude of these changes could preclude the clinical application of near-infrared autofluorescence for intraoperative identification



**Figure 3** Electron microscopy of parathyroid samples of groups 1 (left) and 2 (right). X 25600.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.11891/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.11891/fig-3)

of parathyroid glands, this work reinforces the safety of exposure in a controlled setting, as suggested in a previous study by the same authors directed to changes in secretory pattern and weight variation, thus allowing its utilization (Serra & Silveira, 2019).

As the doses used were above the maximum necessary for intraoperative identification of parathyroid glands in the rat model, these results can be extrapolated for utilization of this technique in human surgery, in spite of the absence of oxyphilic cells in rats. In our sample no degenerative changes were found in the thyroid gland's conventional histology and no significant difference was documented regarding the presence of peroxisomes or crystalline structures on electron microscopy. Special attention was paid to the features in parathyroid mitochondria and secretory granules but no differences were found between irradiated and non-irradiated tissues. Furthermore, no alterations were found in the nuclei or rough endoplasmic reticulum.

Our results are aligned with the work of Lerma, where no significant structural or ultrastructural changes could be found in the thyroid glands of rats submitted to a 635 nm laser beam (Lerma et al., 1991). More important and persistent alterations could be associated with excessive exposure to light for consecutive days, as shown by Parrado (Parrado et al., 1999), who found a direct relationship between the severity of the injury and the energy of the applied irradiation. This excessive exposure may also explain the significant alteration in hormonal level but no change in the histological structure of the tissues found by Azevedo between the first and seventh day after the last irradiation (Azevedo et al., 2005). The deeper penetration of the laser compared with the LED for the same wavelength could also help to explain the alterations found.

In spite of the absence of structural or ultrastructural alterations in the parathyroid and thyroid glands provoked by exposure to near-infrared irradiation, this study did not evaluate possible changes in the secretory pattern of the glands, which is a major limitation. However, in a previous work the authors showed, in another set of animals, that mild and transient alterations can occur without any clinical impact (Serra & Silveira, 2019).

## CONCLUSIONS

The absence of morphological changes in thyroid and parathyroid glands coupled with the mild and transient alterations in secretory pattern of the glands submitted to near-infrared irradiation reinforces the hypothesis that the utilization of near-infrared light for intraoperative identification of parathyroid glands is harmless for the tissues and can be used safely in clinical practice. However, further investigation should be performed to give robustness to this study.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito from the Pathology Department of Hospital dos Sams, for their invaluable help on both optical and electron microscopy observations. We are also grateful to Professor Erin Tranfield from Instituto Gulbenkian de Ciência that made preliminary electron microscopy of the samples and select the images and to Dra. Rita Manso from Hospital Fernando Fonseca that prepared the samples for observation. For the performance of animal surgeries, we had the invaluable collaboration of technicians Maria José and Maria João from Universidade da Beira Interior and Dra. Maria do Rosário Custódio, Master on animal behavior.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

The authors received no funding for this work.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Carlos Serra and Luis Silveira conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

### Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

Direcção Geral de Agricultura e Veterinária provided full approval for this research (0421/000/000/2018).

### Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The summary reports of the optic microscopy are available in the [Supplementary File](#). The number of analysed samples and occurrence of pathological changes, without use of any scores are available in [Tables 1](#) and [2](#).

### Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11891#supplemental-information>.

### REFERENCES

- Akerstrom G, Malmaeus J, Bergstrom R. 1984. Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery* 95(1):14–21.
- Asa SL, Mete O. 2018. Endocrine pathology: past, present and future. *Pathology* 50(1):111–118 DOI 10.1016/j.pathol.2017.09.003.
- Azevedo LH, Correaaraha AC, Stolf SF, Eduardo CDP, Ferreira Vieira MM. 2005. Evaluation of low intensity laser effects on the thyroid gland of male mice. *Photomedicine and Laser Surgery* 23(6):567–570 DOI 10.1089/pho.2005.23.567.
- Bergenzfelz A, Nordenström E, Almquist M. 2020. Morbidity in patients with permanent hypoparathyroidism after total thyroidectomy. *Surgery* 167(1):124–128 DOI 10.1016/j.surg.2019.06.056.
- Chen HS, Emura S, Kubo K. 2013. An update on the structure of the parathyroid gland. *The Open Anatomy Journal* 5:1–9 DOI 10.2174/1877609401305010001.
- De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben Lakhdar A, Hartl D. 2016. Intraoperative near-infrared imaging for parathyroid gland identification by auto-fluorescence: a feasibility study. *World Journal of Surgery* 40(9):2131–2138 DOI 10.1007/s00268-016-3571-5.
- Dip F, Falco J, Verna S, Prunello M, Loccisano M, Quadri P, White K, Rosenthal R. 2019. Randomized controlled trial comparing white light with near-infrared autofluorescence for parathyroid gland identification during total thyroidectomy. *Journal of the American College of Surgeons* 228(5):744–751 DOI 10.1016/j.jamcollsurg.2018.12.044.
- Edafe O, Balasubramanian SP. 2017. Incidence, prevalence and risk factors for post-surgical hypocalcaemia and hypoparathyroidism. *Gland Surgery* 6(Suppl 1):S59–S68 DOI 10.21037/gs.2017.09.03.
- Falco J, Dip F, Quadri P, De la Fuente M, Rosenthal R. 2016. Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *Journal of the American College of Surgeons* 223(2):374–380 DOI 10.1016/j.jamcollsurg.2016.04.049.
- Fronza B, Somacal T, Mayer L, De Moraes MG, De Oliveira JF, Weber JB. 2013. Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLL) on thyroid hormone function in a rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 42(1):26–30 DOI 10.1016/j.ijom.2012.06.017.
- Isono H, Shoumura S, Emura S. 1990. Ultrastructure of the parathyroid gland. *Histology and Histopathology* 5(1):95–112.
- Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, Ko CH, Ko JB, Oak C, Kim Y, Lee KD. 2018. Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *Journal of the American College of Surgeons* 226(2):165–172 DOI 10.1016/j.jamcollsurg.2017.10.015.

- Kim SW, Song SH, Lee HS, Noh WJ, Oak C, Ahn YC, Lee KD. 2016.** Intraoperative real-time localization of normal parathyroid glands with autofluorescence imaging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101**(12):4646–4652 DOI [10.1210/jc.2016-2558](https://doi.org/10.1210/jc.2016-2558).
- Kittel B, Ernst H, Kamino K. 1996.** Anatomy, Histology, and Ultrastructure, Parathyroid, Mouse. In: Jones TC, Capen CC, Mohr U, eds. *Endocrine System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals*. Berlin, Heidelberg: Springer, 330–333 DOI [10.1007/978-3-642-60996-1\\_35](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60996-1_35).
- Ladurner R, Sommerey S, Arabi NAI, Hallfeldt KK, Stepp H, Gallwas JK. 2017.** Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surgical Endoscopy* **31**(8):3140–3145 DOI [10.1007/s00464-016-5338-3](https://doi.org/10.1007/s00464-016-5338-3).
- Lakowicz JR. 2006.** *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd Edition. Berlin: Springer, 954 DOI [10.1007/978-0-387-46312-4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4).
- Lerma E, Hevia A, Rodrigo P, Gonzalez-Campora R, JR Armas, Galera H. 1991.** The effect of HeNe laser radiation on the thyroid gland of the rat. *International Journal of Experimental Pathology* **72**(4):379–385.
- Mayer L, Gomes FV, Baraldi CE, Weber JoBB, Oliveira MIGd. 2013.** Assessment of LLLT systemic effects on thyroid hormones function after dental titanium implant installation: an experimental rabbit model. *Natural Science* **05**(08):933–940 DOI [10.4236/ns.2013.58113](https://doi.org/10.4236/ns.2013.58113).
- McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT. 2013.** A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery* **154**(6):1371–1377 DOI [10.1016/j.surg.2013.06.046](https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.06.046).
- McWade MA, Sanders ME, Broome JT, Solorzano CC, Mahadevan-Jansen A. 2016.** Establishing the clinical utility of autofluorescence spectroscopy for parathyroid detection. *Surgery* **159**(1):193–202 DOI [10.1016/j.surg.2015.06.047](https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.06.047).
- Mohammed I, Al-Azawi T, AL-Mustawfi N. 2011.** Effect of laser treatment on thyroid gland hormones in female rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* **25**(2):61–64 DOI [10.33899/ijvs.2011.5644](https://doi.org/10.33899/ijvs.2011.5644).
- Monici M. 2005.** Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review* **11**:227–256 DOI [10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2).
- Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A. 2011.** Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *Journal of Biomedical Optics* **16**(6):067012 DOI [10.1117/1.3583571](https://doi.org/10.1117/1.3583571).
- Parrado C, Carrillo De Albornoz F, Vidal L, Pérez de Vargas I. 1999.** A quantitative investigation of microvascular changes in the thyroid gland after infrared (IR) laser radiation. *Histology and Histopathology* **14**(4):1067–1071 DOI [10.14670/hh-14.1067](https://doi.org/10.14670/hh-14.1067).
- Policeni BA, Smoker WR, Reede DL. 2012.** Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Seminars in Ultrasound CT and MR* **33**(2):104–114 DOI [10.1053/j.sult.2011.12.005](https://doi.org/10.1053/j.sult.2011.12.005).
- Serra C, Silveira L. 2019.** Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns. *Lasers in Medical Science* **35**:107–114 DOI [10.1007/s10103-019-02800-w](https://doi.org/10.1007/s10103-019-02800-w).

**Stolik S, Delgado J, Perez A, Anasagasti L. 2000.** Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57(2–3):90–93 DOI [10.1016/S1011-1344\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00082-8).

**Weber JB, Mayer L, Cenci RA, Baraldi CE, Ponzoni D, Gerhardt de Oliveira M. 2014.** Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. *Photomedicine and Laser Surgery* 32(11):612–617 DOI [10.1089/pho.2014.3756](https://doi.org/10.1089/pho.2014.3756).

### **4.3 Artigo III: Development of a low-cost portable device for identification of parathyroid glands using autofluorescence.**

Publicado em Indian Journal of Surgery, 2020, 82, páginas 1126-1130

Publicado online: 23 de Abril de 2020

Reproduzido sob autorização Springer



## Development of a Low-Cost Portable Device for Identification of Parathyroid Glands Using Autofluorescence

Carlos Serra<sup>1,2</sup> · Luís Silveira<sup>3</sup> · António Canudo<sup>1</sup>

Received: 23 September 2019 / Accepted: 9 April 2020  
 © Association of Surgeons of India 2020

### Abstract

Intraoperative identification of parathyroid glands, which depends almost exclusively upon the surgeon's visual acuity and experience is often a challenge in thyroid and parathyroid surgery; thus, developing a device capable of assisting the surgeon in this task will be highly useful. Demonstration of parathyroid glands' autofluorescence when subjected to an infrared light beam of 785 nm, by Paras et al. in 2011, was followed by a few studies that confirmed the method's value in identifying the parathyroid glands. Given the expensive nature of devices capable of inducing and detecting autofluorescence, the authors attempted to develop a low-cost, easily replicable device, based on commercially available accessories commonly used for other purposes, presented in this work, showing that autofluorescence can also be detected with inexpensive devices allowing its utilization even in hospitals with scarce economical resources.

**Keywords** Parathyroid · Surgery · Autofluorescence · Thyroid

### Introduction

Intraoperative identification of the parathyroid glands constitutes a challenge for surgeons involved in thyroid and parathyroid surgery.

The parathyroid glands, usually four, are small glands located near the thyroid, with which they share their blood supply, meant to regulate the calcium metabolism by secreting the parathyroid hormone.

Their small size (5–8 mm), shape, and color make them difficult to differentiate from other cervical tissues, such as fat and lymph nodes, a condition that is further aggravated by their widely variable location [1–4].

Its intraoperative identification has depended almost exclusively on the surgeon's visual acuity, since the currently available imaging techniques are either not suitable for real-time use or involves injecting exogenous substances with its inherent toxicity risks [5–7].

Provided that hypocalcemia is a fearsome complication of thyroid surgery, occurring temporarily in 2–30% of patients and permanently in 0.5–13% [8], developing a device that allowed an easy identification of parathyroid glands would be highly useful, especially for less experienced surgeons, whom perform the majority of these procedures [9], in surgeries involving cervical lymph nodes removal, and in hyperparathyroidism surgery.

In 2011, Paras et al. showed that parathyroid glands subjected to a 785-nm infrared source emitted autofluorescence in the near-infrared range (822-nm peak). Even though the thyroid also emits fluorescence, its lower intensity allows the distinction between the two tissues to be made [10].

This was confirmed by other studies, which demonstrated the usefulness of resorting to autofluorescence in identifying the parathyroid glands [11–13].

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12262-020-02205-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carlos Serra  
[caaserra@me.com](mailto:caaserra@me.com); [caaserra@netcabo.pt](mailto:caaserra@netcabo.pt)

Luís Silveira  
[Luis.silveira.0@gmail.com](mailto:Luis.silveira.0@gmail.com)

António Canudo  
[antonio.canudo@sams.sbsi.pt](mailto:antonio.canudo@sams.sbsi.pt)

<sup>1</sup> Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> CICS – UBI, Centro de Investigação em ciências da saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

In the absence of data regarding infrared light stimulation influence on the hormonal secretion pattern of thyroid and parathyroid glands, the authors developed a preliminary study with rats demonstrating this irradiation is harmless [14].

Since the existing devices capable of induction and visualization of autofluorescence depend on relatively high-cost technology, the authors worked in the development of a low-cost device for intraoperative use, based on easily available accessories [15], which is presented in this work, hoping that these findings will motivate others to its utilization and improvement.

## Material and Methods

The present study was approved by the Internal Review Board of our institution.

The device consists of a stimulating light source in the near-infrared range and of an image acquisition system.

The light source used is a 780-nm light-emitting diode, Thorlabs model M780L3-C1 (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) with a 769-nm  $\pm$  41-nm bandpass excitation filter (Edmund Optics 84123 – Edmund Optics – Barrington, NJ, USA), powered by a 1200-mA LED driver T-cube (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany).

Initially, a Nikon D70 DSLR camera (Nikon Corporation – Tokyo, Japan) converted to capture infrared light was used for capturing images, with the Nikon NIKKOR 50-mm f/1.8 AF M/A lens (Nikon Corporation – Tokyo, Japan) and 832-nm bandpass emission filter (#84123, Edmund optics, Barrington, NJ, USA).

Figure 1 shows the initial tests with thyroid, parathyroid, and cervical adipose tissue samples, captured with an infrared camera, subjected to illumination using a LED source (visible light) on the right and on the left the same tissues irradiated with a 780-nm LED, showing a clear difference between them, although the adipose tissue is not viewed, since it does not emit detectable fluorescence at this range.

Provided that this system could not be used for dynamic direct image viewing, a goggle-based image acquisition

system was tested for intraoperative utilization and used in all the experiments described below. The actual system is composed by an iGen nightviewer 20/20 nightOwl (Night Owl optics, El Paso, Texas USA), which uses a CCD Sony ICX254AL image detector, with a 832-nm bandpass emission filter coupled (Fig. 2a).

To record the images, the acquisition system was connected to an ASUS PC through the VideoGrabber SVG 2.0 A3 Silvercrest USB video recording board (TARGA GmbH Soest, Germany) using the Cyberlink PowerDirector 12 software (Cyberlink, New Taipei City, Taiwan).

Recorded images were analyzed with ImageJ software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

For statistical analysis of data, we used IBM SPSS Statistics V.22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp).

The total cost of the used components did not exceed Eur 3200.

A flowchart with the sequence of experiments is shown in Fig. 3.

Initial *in vitro* studies were performed with samples provided by the Pathology Department of Hospital dos SAMS, immediately after parathyroid and thyroid resection surgeries. For comparison purposes and authorized by the patients, a small sample of healthy cervical fat was collected in six surgeries and validated with pathological exam.

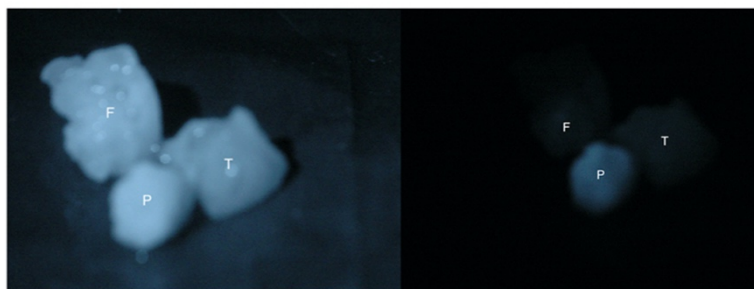
As a second step, the system came to be applied after thyroid gland resection, to verify the presence of inadvertently resected parathyroid glands, enabling its eventual autotransplantation. (Fig. 2b).

The next step was the utilization of the device *in vivo* during parathyroid glands resection surgery, as auxiliary tool for identification of the glands.

At the present time, we are initiating its use in thyroid gland resection surgery, identifying parathyroid glands *in situ* to support their preservation.

Intraoperative utilization of the device revealed some difficulties that need further improvement. Focusing the image in the narrow space of a thyroidectomy or parathyroidectomy is

**Fig. 1** Initial tests using a NIR modified camera. On the left, tissues captured with illumination with visible light. On the right, the same tissues exposed to 780-nm LED light (T, thyroid; P, parathyroid; F, fat)



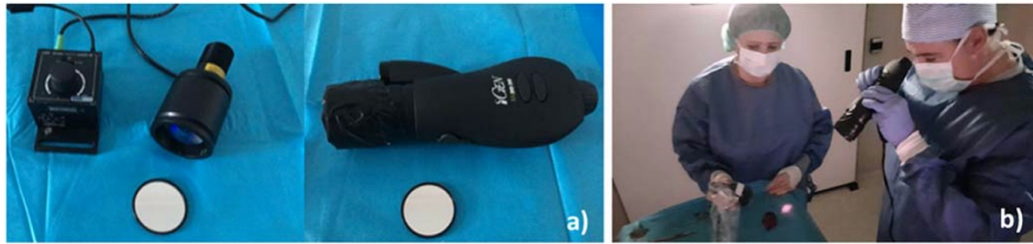


Fig. 2 a 780-nm LED with power supply and acquisition system. b Examination of specimen

difficult and time-consuming without a member of the surgical team assigned for the function. Utilization of a tripod or another stabilization device may be useful for improving quality of the image.

- Visualization of autofluorescence needs operative room light turned off
- The penetration of near-infrared light in tissues does not exceed 5 mm, so the system might not be adequate on identifying intrathyroidal parathyroid glands.
- Presence of blood could affect the image, so a pristine surgical field is necessary when collecting images.

**Results**

**In Vitro Studies**

We analyzed 20 thyroid, 6 parathyroid, and 6 cervical fat pieces immediately after excision.

Pathological examination of thyroid samples showed 12 multinodular goiters, 3 papillary carcinomas, 2 lymphocytic thyroiditis, 1 follicular adenoma, 1 Hurthle cells adenoma, and 1 normal thyroid. All the parathyroid samples were adenoma, and all the cervical fat tissue were normal fat.

As usual for thyroid and parathyroid surgery, there was a strong predominance of feminine sex: thyroid, 16 women, 4 men; parathyroid, 4 women, 2 men; Fat, 5 women, 1 man; overall, 25 women (78%) 7 men (22%).

Ages varied between 30 and 79 years (thyroid), mean 54.05; 26 and 76 (parathyroid), mean 59.50; and 46 to 79 (cervical fat), mean 59.83.

As the acquisition system allows adjusting the amplification of the acquired image, we compared the fluorescence obtained with four levels of intensity (image gain), Levels 6, 8, 10, and 12 to verify the most appropriate level for discriminating the tissues. For visual direct identification, level 10 provided the best discrimination.

Since variables did not have a normal distribution, a non-parametric test, Kruskal-Wallis, was used for statistical analysis, followed by multiple comparison of ranks.

A probability of type I error of 0.05 was accepted (*p* value 0.05).

For all the studied intensities of image acquisition, there was a statistically significant difference between groups with *p* values of 0.000011 (Level 6), 0.000011 (Level 8), 0.00010 (Level 10), and 0.00010 (Level 12).

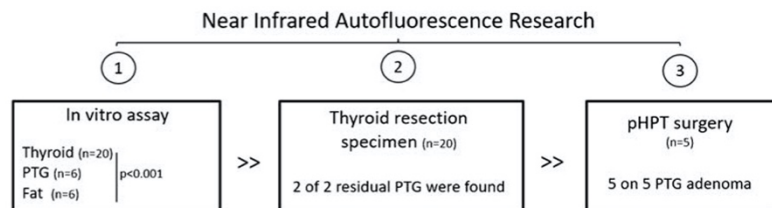
Multiple comparison of ranks using Tukey HSD showed for all levels a statistically significant difference between fluorescence emission of parathyroid, thyroid, and fat (*p* < 0.000001).

Figure 4 shows the boxplot for the means of fluorescence. There is an obvious difference between the detected fluorescence of the tissues.

Subgroup analysis could not demonstrate a correlation between age and intensity of fluorescence for any the tested tissues.

We also could not find a correlation between the intensity of fluorescence of thyroid and the pathological exam.

Fig. 3 Flowchart of the sequence of experiments



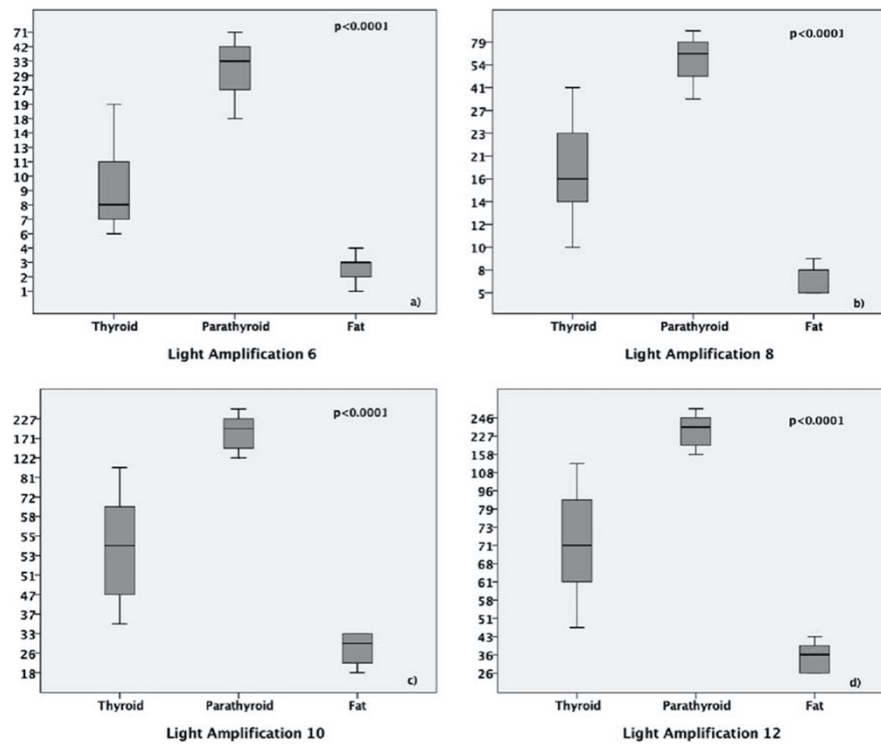


Fig. 4 Boxplot representation of mean fluorescence

### Postoperative Study

In 20 cases of thyroid surgery, we examined the excised specimens for the presence of inadvertent removed parathyroid glands (Fig. 2b).

After, the specimen was submitted to the usual pathological examination.

In 2 cases, we could identify residual parathyroid tissue embedded in the thyroid specimen, with significant higher fluorescence rates, confirmed by pathological examination.

In both cases, we decided not to transplant the tissues since its volume was small. Both had uneventful recovery from surgery, without postoperative hypocalcemia.

### Parathyroid Surgery

In five cases of non-concordance echography/scintigraphy, the identification of the hyperfunctioning gland was provided by detecting its fluorescence (Fig. 5). The decrease in intraoperative PTH, fulfilling Miami's criteria, confirmed that gland

as responsible for the hyperparathyroidism. Histological diagnosis of all the excised glands was parathyroid adenoma.

Independent studies on parathyroid and thyroid surgery are currently being carried out, aiming to clarify if the systematic identification of parathyroid glands leads to a decrease in cases of postsurgical hypoparathyroidism.

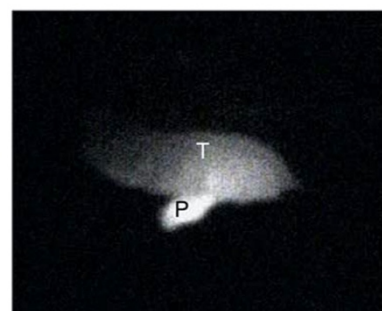


Fig. 5 Intraoperative image during parathyroid surgery (T, thyroid; P, parathyroid)

## Discussion/Conclusion

Intraoperative identification of the parathyroid glands with the aid of autofluorescence is a promising technique, with increased usefulness for less experienced surgeons in thyroid and parathyroid surgery, and in cases where lymph node removal is required.

The device presented in this work, characterized by low-cost and easy reproducibility, provides a quick and precise mean for identifying the glands.

Our in vitro studies showed the tissue discriminatory capacity of the device, and the experience gathered from hyperparathyroidism surgery [16] allowed the confirmation of its usefulness for this intervention, improving the confidence of the surgeon in detecting parathyroid glands and potentially shortening the learning curve of less experienced surgeons.

In thyroid surgery, the identification of parathyroid glands is essential for their preservation, which may not have impact on reducing postoperative hypocalcemia, since the mandatory manipulation of the thyroid gland can lead to changes in parathyroid glands' secretion (which shares the blood supply with the thyroid), regardless of in situ maintenance [17].

This issue will only be definitively settled by multicentric studies involving large numbers of patients and surgeries performed by surgeons with different levels of experience as current studies have different conclusions [18–20].

The present device can also be very useful for in-table examination of the excised thyroid specimens for the presence of parathyroid tissue, allowing their immediate autotransplant. That capacity could in the future replace frozen section exams for that purpose, avoiding its costs. However, the ability of the method for identification of the rare true intrathyroid parathyroid glands needs further investigation.

The low-cost and easy to use features of this system may contribute to a broad adoption of the technique thus enabling its improvement and definitive validation.

It may also be useful in hospitals with scarce resources, namely, in developing countries allowing access to an otherwise inaccessible surgical tool.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest

## References

- Akerstrom G, Malmaeus J, Bergstrom R (1984) Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery* 95(1):14–21
- Fancy T, Gallagher D 3rd, Homig JD (2010) Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin N Am* 43(2):221–227
- Policeni BA, Smoker WR, Reede DL (2012) Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Semin Ultrasound CT MR* 33(2):104–114
- Lappas D, Noussios G, Anagnostis P, Adamidou F, Chatzigeorgiou A, Skandalakis P (2012) Location, number and morphology of parathyroid glands: results from a large anatomical series. *Anat Sci Int* 87(3):160–164
- Takeuchi S, Shimizu K, Shimizu K Jr, Akasu H, Okamura R (2014) Identification of pathological and normal parathyroid tissue by fluorescent labeling with 5-aminolevulinic acid during endocrine neck surgery. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* 81(2):84–93
- Rubello D, Casara D, Pelizzo MR (2003) Optimization of preoperative procedures. *Nucl Med Commun* 24(2):133–140
- Maguire CA, Sharma A, Alarcon L, Ffolkes L, Kurzepa M, Ostlere L, Samarasinghe V, Singh M (2017) Histological features of methylene blue-induced phototoxicity administered in the context of parathyroid surgery. *Am J Dermatopathol* 39(8):e110–e115
- Seo ST, Chang JW, Jin J, Lim YC, Rha KS, Koo BS (2015) Transient and permanent hypocalcemia after total thyroidectomy: early predictive factors and long-term follow-up results. *Surgery* 158(6):1492–1499
- Sosa JA, Bowman HM, Tielsch JM, Powe NR, Gordon TA, Udelsman R (1998) The importance of surgeon experience for clinical and economic outcomes from thyroidectomy. *Ann Surg* 228(3):320–330
- Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A (2011) Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 16(6):067012
- McWade MA, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED, Galloway RL Jr, WH MD, Broome JT (2016) Development of an Intraoperative Tool to Detect Parathyroid Gland Autofluorescence. Vanderbilt University, Nashville
- Ladurner R, Sommerer S, Al Arabi N, Hallfeldt KK, Stepp H, Gallwas JK (2017) Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surg Endosc* 31(8):3140–3145
- Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, Ko JB, Oak C, Kim Y, Lee KD (2018) Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 226(2):165–172
- Serra C, Silveira L (2019) Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns. *Lasers Med Sci*
- Liu Y, Bauer AQ, Akers WJ, Sudlow G, Liang K, Shen D, Berezin MY, Culver JP, Achilefu S (2011) Hands-free, wireless goggles for near-infrared fluorescence and real-time image-guided surgery. *Surgery* 149(5):689–698
- Serra C, Silveira L, Canudo A, Lemos MC (2019) Parathyroid identification by autofluorescence - preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism. *BMC Surg* 19(1):120
- Chang YK, Lang BHH (2017) To identify or not to identify parathyroid glands during total thyroidectomy. *Gland Surg* 6(Suppl 1):S20–s29
- DiMarco A, Chotalia R, Bloxham R, McIntyre C, Tolley N, Palazzo FF (2019) Does fluoroscopy prevent inadvertent parathyroidectomy in thyroid surgery? *Ann R Coll Surg Engl* 101(7):508–513
- Benmiloud F, Rebaudet S, Varoquaux A, Penaranda G, Bannier M, Denizot A (2018) Impact of autofluorescence-based identification of parathyroids during total thyroidectomy on postoperative hypocalcemia: a before and after controlled study. *Surgery* 163(1):23–30
- Ladurner R, Al Arabi N, Guendogar U, Hallfeldt K, Stepp H, Gallwas J (2018) Near-infrared autofluorescence imaging to detect parathyroid glands in thyroid surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 100(1):33–36

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### **4.4 Artigo IV: Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device**

Publicado em ANZ Journal of Surgery, 2020, Volume 90, Nº 7-8, Páginas 1509-1511

Publicado online: 28 de Novembro de 2019

Reproduzido sob autorização John Wiley and Sons



## Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device

Identification of the parathyroid glands is always a challenge for surgeons during thyroid and parathyroid surgeries and cervical lymph node dissection. Their colour, size and shape make them difficult to distinguish from cervical fat, lymph nodes and even some thyroid nodules.

In 2011, investigators from Vanderbilt University described for the first time the autofluorescence of parathyroid glands when irradiated by a 785-nm source.<sup>1</sup> Although thyroid and other cervical tissues emit fluorescence at the same wavelength, their inferior fluorescence intensity allows them to be differentiated from the parathyroid.

The existing devices capable of detecting autofluorescence require expensive technology, ranging from 40 000 to 125 000 euros in our country.<sup>2,3</sup> Therefore, we worked on developing a low-cost system with easily achievable components, combining the light source described by Kim *et al.* with the night vision goggles used by Liu *et al.* for sentinel node biopsy and image-guided surgery.<sup>4,5</sup>

The wavelengths of the stimulating light and the autofluorescence emission are similar (780 and 822 nm, respectively); therefore, the main difficulty was achieving adequate filtering of light so that the emitting light does not saturate the image, meaning that the fluorescence cannot be visualized.

After testing the system *in vitro* with samples provided by the pathology department of our hospital, we implemented the system during thyroid and parathyroid resection surgeries.

The system consists of an emission source and an acquisition device.

The emission source is a 780-nm light-emitting device (LED; Model M780 L-C1; Thorlabs GmbH, Dachau, Germany) coupled to a bandpass excitation filter (769 ± 41 nm; Model 84 123; Edmund Optics, Barrington, NJ, USA), powered by a LED driver T-cube (1200 mA; Thorlabs GmbH, Dachau, Germany).

For image acquisition, we use night vision goggles (iGen Nightviewer 20/20; Night Owl Optics, El Paso, TX, USA) coupled to a

**Fig. 1.** Acquisition and captation systems with filters (top). Examination of excised specimen (bottom).



bandpass acquisition filter ( $832 \pm 28$  nm; Model 84 123; Edmund Optics, Barrington, NJ, USA). The device can be connected to a personal computer, allowing on-screen visualization of the images by the entire surgical team.

To examine the surgical field, one member of the team operates the goggle device (non-sterile) at a minimal focal distance of 40 cm, while another team member directs the LED stimulating light (protected by a sterile drape) to the field (Fig. 1).

Images of thyroid and parathyroid fragments (of different patients) recorded *in vitro* are shown in Figure 2, while use of device for imaging of the parathyroid during surgery for primary hyperparathyroidism is shown in Figure 3.

Although it has not been definitely confirmed that identification of the parathyroid glands using autofluorescence reduces post-operative rates of hypocalcaemia,<sup>6,7</sup> this system can be extremely helpful, especially for less experienced surgeons, who are responsible for the majority of thyroid surgeries performed worldwide.

Use of the system for in-table inspection of the thyroid specimen may also be useful as it enables immediate recognition and auto-transplantation of any inadvertently removed parathyroid gland (Fig. 1).

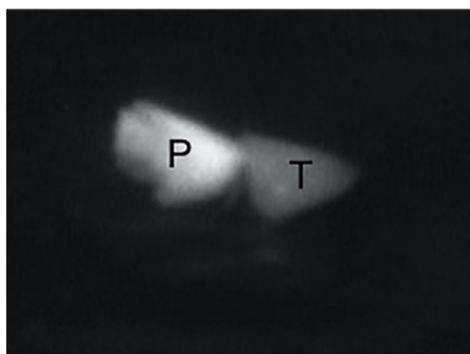



Fig. 2. Ex vivo images of parathyroid (P) and thyroid (T).

There are still some limitations that hinder the widespread implementation of this system, such as the need to turn-off all operative room lights to capture the autofluorescence and the difficulty in focusing and stabilizing the image with the current device. Thus, research in this area should be continued. Nevertheless, the affordable price of the components (less than 3000 euros) and ease of use are strong advantages, enabling its use even when economic resources are scarce.

## References

1. Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J. Biomed. Opt.* 2011; **16**: 067012.
2. Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R. Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *J. Am. Coll. Surg.* 2016; **223**: 374–80.
3. MeWade MA, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED, Galloway RL Jr, WH MD, Broome JT. *Development of an Intraoperative Tool to Detect Parathyroid Gland Autofluorescence*. Nashville, TN: Vanderbilt University, 2016.
4. Liu Y, Bauer AQ, Akers WJ *et al.* Hands-free, wireless goggles for near-infrared fluorescence and real-time image-guided surgery. *Surgery* 2011; **149**: 689–98.
5. Kim SW, Song SH, Lee HS *et al.* Intraoperative real-time localization of normal parathyroid glands with autofluorescence imaging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016; **101**: 4646–52.
6. DiMarco A, Chotalia R, Bloxham R, McIntyre C, Tolley N, Palazzo FF. Autofluorescence in parathyroidectomy: signal intensity correlates with serum calcium and parathyroid hormone but routine clinical use is not justified. *World J. Surg.* 2019; **43**: 1532–7.
7. Kahramangil B, Dip F, Benmiloud F *et al.* Detection of parathyroid autofluorescence using near-infrared imaging: a multicenter analysis of concordance between different surgeons. *Ann. Surg. Oncol.* 2018; **25**: 957–62.

Carlos Serra,\*† MD, FACS 

Luís Silveira,† MD, PhD

\*Department of Surgery, Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal and

†Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

doi: 10.1111/ans.15597

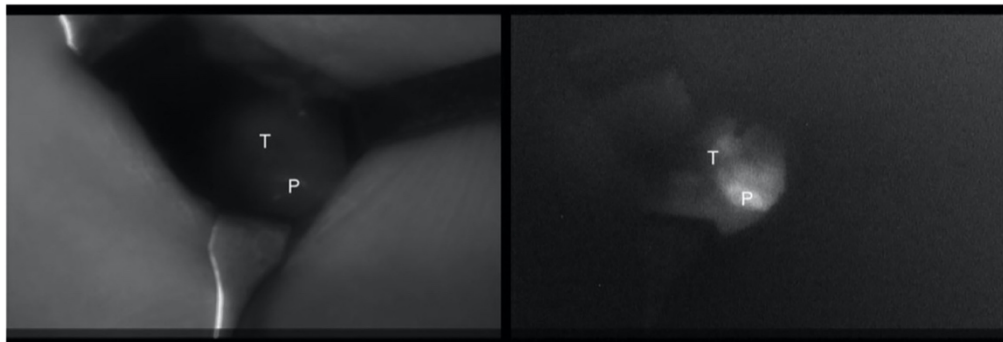


Fig. 3. Intra-operative image, showing parathyroid autofluorescence on the right (brighter area). On the left, the same image under natural light.

**4.5 Artigo V: Identification of inadvertently removed parathyroid glands during thyroid surgery using autofluorescence.**

Publicado em Gland Surgery, 2020, Volume 9, Nº4, páginas 893-898

Publicado online: 2 de Setembro de 2020

Licença CC-BY-NC-ND 4.0

Original Article

## Identification of inadvertently removed parathyroid glands during thyroid surgery using autofluorescence

Carlos Serra<sup>1,2^</sup>, Luís Silveira<sup>3</sup>, António Canudo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, SAMS Hospital, Lisbon, Portugal; <sup>2</sup>Health Sciences Research Centre (CICS-UBI), <sup>3</sup>Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

**Contributions:** (I) Conception and design: All authors; (II) Administrative support: C Serra, A Canudo; (III) Provision of study materials or patients: C Serra, A Canudo; (IV) Collection and assembly of data: C Serra, A Canudo; (V) Data analysis and interpretation: C Serra, L Silveira; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

**Correspondence to:** Carlos Serra. Department of Surgery, SAMS Hospital, Rua Cidade de Gabela, 1, 1800-052 Lisbon, Portugal.

Email: caaserra@me.com.

**Background:** Incidental excision of parathyroid glands is a common event during thyroid surgery and in spite the divergent results that can be obtained from the literature about its clinical significance, all efforts must be used to their preservation. Due to the autofluorescence emitted by parathyroid glands, authors began to use a custom device to inspect thyroidectomy specimens for incidentally removed parathyroid tissue; the results of using this device are presented in this manuscript.

**Methods:** Specimens of 40 consecutive thyroid surgeries were inspected. Localization of suspect high-fluorescence spots were recorded for confirmation with a pathological exam. Determinations of calcium and parathyroid hormone (PTH) were completed prior to surgery and at 24 hours and 15 days after the operation.

**Results:** Patient age ranged from 36 to 83 years and were predominantly female (82.5%). Calcium values at 24 hours post-operation varied between 7.1 and 9.5. The PTH values ranged between 3 and 77. Thirteen patients (32.5%) presented with biochemical hypocalcemia at 24 hours. At 15 days after the operation, only one patient presented with a calcium value below 8 (PTH: 10.9) with complete normalization 6 months after the surgery. Pathological examination identified eight parathyroid fragments in seven patients. There was no correlation between the presence of parathyroid tissue in the specimen and post-operative hypocalcemia ( $P=0.254$ ). Eight suspicious areas of augmented fluorescence were detected; seven were coincident with the pathological examination and one was a false positive. One intrathyroidal gland was not identified, resulting a sensitivity of 87.5% and specificity 96.2%.

**Conclusions:** Although no correlation between incidental parathyroidectomy and hypocalcemia was demonstrated, autofluorescence may be a useful tool for in-table identification of incidentally-removed glands.

**Keywords:** Autofluorescence; incidental parathyroidectomy; parathyroid; thyroid surgery

Submitted Jan 27, 2020. Accepted for publication May 27, 2020.

doi: 10.21037/gs-20-163

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>

### Introduction

In 2011, Paras was the first to describe autofluorescence of the parathyroid glands, a property that could be useful for their discrimination from other cervical tissues including

lymph nodes and fat (1). Since that publication, other authors confirmed the utility of autofluorescence of the parathyroid during thyroid and parathyroid surgeries (2-4). Parathyroid glands exposed to a near infrared light

^ORCID: 0000-0003-3320-3464.

© Gland Surgery. All rights reserved.

Gland Surg 2020 | <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>

(700–800 nm) also emit autofluorescence in the infrared spectra (822 nm). Thyroid glands also emit autofluorescence but at lower intensity, allowing the discrimination between the tissues (1).

Although promising, the method only allows identification of parathyroid glands without providing information about the functional status of the glands. Nevertheless, improved capacity for identifying the parathyroid glands could be the first step for the preservation of the tissue and thus their function.

The systematic search for parathyroid glands during thyroid surgery could increase the operative time and in some cases endanger the glands that are outside the direct operative field. This identification may force an unnecessary, extended dissection (5). The autofluorescent nature of the parathyroid glands could also be useful for identification of inadvertently removed glands during thyroid surgery or cervical lymph node dissection, allowing their immediate or delayed auto-transplant.

Incidental parathyroidectomy is a frequent event during thyroid surgery, occurring in 6.4% to 31.1% of cases (6). Those rates have the potential to be decreased with a meticulous surgical technique, but complete elimination of inadvertent removal of parathyroid tissue will depend of the development of a system capable of identifying all the glands, including rare intrathyroidal tissues. The clinical significance of the incidental removal of single gland is not obvious; the traditional idea that the presence of one well-perfused parathyroid gland may be sufficient for maintaining calcium homeostasis has not been rebutted (5).

However, surgeons generally treat every parathyroid gland as if it is the patient's last, so that all efforts to minimize their incidental removal are emphasized (7,8). Due to the high cost of commercially available devices for detecting autofluorescence, we developed a goggle-based, easily reproducible system using common gadgets that we have used in our daily practice (9). In this manuscript, we present results of using this system for inspection of the removed thyroid specimen for detecting inadvertently removed parathyroid glands under conditions that could allow for subsequent auto-transplant.

We present the following article in accordance with the STROBE reporting checklist (available at <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>).

## Methods

All procedures were performed in accordance with the

ethical standards of the institutional review board (approval from Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, 002/2018) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Forty patients (33 females, 7 males) with ages ranging from 36 to 83 (mean: 59.5, SD: 12.59) years were submitted for thyroid resection surgery. A total of 34 total thyroidectomies (seven with a thoracic component), four lobectomies, and two completion thyroidectomies were performed by the same surgeon, a general surgeon with particular interest in endocrine surgery and a practice of 50 thyroidectomies per year on average.

Removed specimens were inspected in a sterile environment for the presence of inadvertently excised parathyroid glands using our device composed of an emission light emitting diode (LED) and an image acquisition system.

With the room lights turned off, the specimen was submitted to a 780 nm light beam, emitted by a LED Thorlabs Model M780L-C1 (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany) with a bandpass excitation filter of 769 ( $\pm 41$ ) nm Edmund Optics 84123 (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA), powered by a LED driver T-cube 1,200 mA (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany). Simultaneously, the irradiated area was visualized through the image acquisition system composed of a iGEN Night Viewer 20/20 Night Owl night vision goggle device (Night Owl Optics, El Paso, TX, USA), with an Edmund Optics 84123 bandpass acquisition filter of 832 ( $\pm 28$ ) nm (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA), seeking high fluorescence areas that could represent parathyroid tissue (Figures 1,2).

Localization of suspect high fluorescent areas was recorded for confirmation with the results of the regular pathological exam.

Determinations of serum calcium and parathyroid hormone (PTH) were performed prior to surgery and were measured 24 hours and 15 days after surgery. For statistical analysis of data, IBM SPSS Statistics V.22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp) software with Student's *t*-test and chi-square tests were used. A level of significance of 0.05 was used.

## Results

Demographic, pathological, and operative data are shown



Figure 1 Inspection of thyroidectomy specimen.



Figure 2 Parathyroid fragment (bright spot) on a heterogeneous thyroid lobe.

in Table 1. Pre-operative values calcium ranged from 8.6 to 10.2 (mean: 9.45, SD: 0.35) mg/dL. Preoperative PTH ranged from 22.9 to 103.0 (mean: 53.38, SD: 23.63) pg/mL. If only complete thyroidectomies were considered, preoperative calcium and PTH means and SD were 9.36 (0.12) mg/dL and 56.55 (24.60) pg/mL respectively.

Values of calcium at 24 hours after surgery varied between 7.1 and 9.5 (mean: 8.23, SD: 0.51) mg/dL for the all samples. For total and complete thyroidectomies, calcium values held a mean and SD 8.23 and 0.52, respectively. PTH values at 24 hours post-operation varied between 3 and 77.0 (mean: 33.41, SD: 22.30) pg/mL. Total thyroidectomies and completion thyroidectomies had a mean PTH of 33.33 and a SD of 22.83. The incidence of biochemical hypocalcemia at 24 hours was 32.5% (12 on total or completion thyroidectomies, 1 on lobectomy, P=0.608).

The study was however underpowered to detect hypocalcemia ( $\pi=0.085$ ).

Post-operative day 15 calcium values were between 7.9 and 10.4 mg/dL (mean: 9.9, SD: 0.50 for all samples and

Table 1 Demographic, pathological and operative data

Variables	Number of patients (%)	Number of patients (%) with IPS	P value	Test value
<b>Sex</b>				
Male	7 (17.5)	2 (28.5)	0.408	0.415
Female	33 (82.5)	5 (15.2)		
<b>Surgery</b>				
Total/completion	36 (90.0)	7 (18.4)	0.448	0.943
Hemithyroidectomy	4 (10.0)	0		
<b>Thoracic goiter</b>				
Yes	5 (12.5)	0	0.283	0.174
No	35 (87.5)	7 (20.0)		
<b>Malignancy</b>				
Yes	7 (17.5)	2 (28.5)	0.355	0.720
No	33 (82.5)	5 (15.2)		
<b>Thyroiditis</b>				
Yes	6 (15.0)	1 (16.7)	0.721	0.003
No	34 (85.0)	5 (14.7)		
<b>24 h hypocalcemia</b>				
Yes	13 (32.5)	1 (7.6)	0.254	1.283
No	27 (67.5)	6 (22.2)		

IPS, incidental parathyroid tissue on specimen.

mean: 9.21, SD: 0.09 when excluding lobectomies). At day 15 after surgery, PTH ranged between 7.1 and 156 pg/mL (mean: 49.149, SD: 33.45). Mean and SD when excluding lobectomies were 51.97 and 34.05, respectively.

At day 15, one patient had a calcium level below 8.0 mg/dL, with a PTH of 10.9 pg/mL. At day 180 those values were normal, with a calcium score of 8.9 ng/dL and a PTH of 24.0 pg/mL.

Pathological examination revealed a malignancy in seven samples, including six papillary carcinoma and one medullary carcinoma.

Medium weight of specimens was 55.17 (SD: 32.56) g for total thyroidectomies and 21.75 (SD: 6.946) g for lobectomies. In 6 samples (15%) there were features of lymphocytic thyroiditis.

Pathological examination of the resection specimen identified parathyroid tissue in eight samples from seven patients, all of which were submitted for total

Table 2 Parathyroid glands on sample

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Pt S	Pt AF	C/P	Loc	Suspicion	Hypocalcemia
1	M	79	Multinodular goiter	1	1	P	EC	No	No
2	F	70	Multinodular goiter	1	1	P	EC	No	No
3	M	73	Normal thyroid (totalization)	1	1	P	EC	No	No
4	F	62	Multinodular goiter	2	1	P; C	IC; IT	No; no	No
5	F	66	Papillary carcinoma	1	1	P	IC	No	No
6	F	36	Multinodular goiter	1	1	P	IC	No	No
7	F	38	Multinodular goiter	1	1	P	EC	Yes	Yes

M, male; F, female; Pt S, number of parathyroid glands found on pathological exam; Pt AF, number of parathyroid glands found by autofluorescence; C, complete gland; P, fragment of gland; Loc, localization regarding thyroid gland; EC, extracapsular; IC, Intracapsular; IT, intrathyroidal (surrounded by parenquima).

thyroidectomies. One specimen had two intrathyroidal parathyroid glands.

Only one patient with incidental parathyroidectomy had 24-hour post-operative hypocalcemia, with PTH in the normal range, and normalization of calcium on postoperative day 15. There was no correlation between the presence of parathyroid tissue in the sample and 24-hour post-operative hypocalcemia ( $P=0.254$ ). There was also no correlation between the presence of parathyroid tissue and the type of surgery ( $P=0.344$ ), pathological diagnosis ( $P=0.409$ ), presence of lymphocytic thyroiditis ( $P=0.955$ ), or substernal goiter ( $P=0.283$ ).

Across the whole sample there were eight suspicious areas with a significant increase in fluorescence but only one was considered suspicious by the surgeon. Subsequent pathological examination confirmed seven of these tissues as parathyroid tissue. There was one false positive (colloid nodule). In spite of maintaining conditions for auto-transplantation of parathyroid glands, the small volume of parathyroid tissue detected in the samples prevented transplantation.

Table 2 summarizes the characteristics of the patients with incidentally removed parathyroid tissue.

The system failed to identify one of the two intrathyroidal parathyroid glands present in a patient, identifying only the most superficial one (intracapsular) missing the deep situated one, localized 3 mm into the parenchyma.

Sensitivity and positive predictive value of the assay was 87.5% and specificity and negative predictive value were 97.1%.

## Discussion

Although intraoperative identification of all the parathyroid glands would be desirable, some parathyroid glands lay outside the thyroidectomy dissection field, resulting in a search that may cause an unnecessary extended dissection that can harm the blood supply of the glands (5). The visualization and maintenance of parathyroid glands *in situ* also doesn't provide information about the functional status of the glands, and post-operative hypocalcemia is still possible. Utilization of indocyanine green (ICG) can assess the vascularization of parathyroid glands, but doesn't completely predict post-operative hypocalcemia (10).

Visual inspection of the surgical specimen in search of inadvertently removed parathyroid glands is usually performed for the majority of the surgeons, allowing for immediate auto-transplantation.

The utilization of the device described by our study could identify all the extra-capsular glands and one of the two intrathyroidal glands. The inability to identify one of the intrathyroidal glands may be related to its deep anomalous localization and could represent a limitation of the system.

If compared with the FDA approved devices for parathyroid identification our system has the advantage of the low cost (less than 3,200 euros), making it affordable even for hospitals with scarce financial resources, and is easier to assemble than other custom-build devices that need significant technical intervention (11).

We considered the presence of parathyroid tissue in the thyroid specimen as inadvertent parathyroidectomy, although it may only represent partial or minimal tissue removal with maintenance of the remaining gland, as our

usual extra-capsular thyroidectomy technique is particularly prone to parathyroid preservation. This may explain the limited impact we found on postoperative hypocalcemia in patients with parathyroid tissue in the specimen.

There are divergent results concerning the relation of incidental parathyroidectomy and occurrence of hypocalcemia. In a study of 158 patients, Sakorafas *et al.* did not observe this association (12), as McGoldrick did in a study of 230 cases (13). In this study, the presence of malignancy was found to increase the risk of inadvertent parathyroidectomy; we did not observe this with our smaller sample. Sitges-Serra *et al.* found greater rates of post-operative hypocalcemia in the inadvertent parathyroidectomy group in 170 cases of total thyroidectomies and central neck dissections for papillary thyroid carcinoma, suggesting that extended resections are a risk factor (14). A systematic meta-analysis including 35 studies conducted by Bai *et al.* concluded that malignancy, central neck dissection, and reoperation were significant risk factors for incidental parathyroidectomy and that incidental parathyroidectomy increases the risk of post-operative hypocalcemia after thyroidectomy (15).

Despite our results failing to show any relationship between the occurrence of incidental parathyroidectomy and post-operative hypocalcemia, decreasing the necessity of auto-transplant of incidentally removed glands, there is an evident advantage in knowing if there is any parathyroid tissue in thyroidectomy specimen. Presence of more than one fragment of parathyroid tissue might become an indication for auto-transplant.

The high sensitivity and specificity rates obtained with the utilization of autofluorescence showed the utility of the system that may function as an “optical biopsy” after proper validation.

For this preliminary study, we could not use the device for identification of parathyroid glands *in situ* during surgery, as the ethical committee approval did not include that utilization. In spite of not providing information about the vascularization of the parathyroid glands, an early awareness of their localization may help the surgeon to avoid their manipulation and to prevent devascularization. Thus the integration of intraoperative visualization of parathyroid glands with auto-fluorescence followed by in table inspection of the specimen could decrease rates of post-operative hypocalcemia as shown by the works of Kim *et al.* and the randomized controlled trials conducted by Dip *et al.* and Benmiloud *et al.* (16-18).

Further studies with larger sample sizes will help improve

our understanding of this issue.

A relevant limitation of this study is the fact that all the surgeries were performed by the same surgeon, an experienced thyroid surgeon although not a high-volume surgeon, whose experience could be related to the little volume of the parathyroid fragments found.

As the majority of thyroid surgeries all-over the world are performed by low-volume surgeons, whom may benefit more of the assistance of autofluorescence for the identification of parathyroid glands, a study evolving surgeons with different levels of expertise would be useful, evaluating not only the results of postoperative hypocalcemia but also the effects on the learning curve.

### Conclusions

Although in this study we could not demonstrate a relationship between incidental parathyroidectomy and postoperative hypocalcemia, the high sensitivity and specificity rates make autofluorescence of parathyroid glands an useful tool for identification of incidentally removed glands during thyroidectomy.

### Acknowledgments

The authors want to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito of the Department of Pathology of Hospital dos SAMS for their contribution in this study.

*Funding:* None.

### Footnote

*Reporting Checklist:* The authors have completed the STROBE reporting checklist. Available at <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>

*Data Sharing Statement:* Available at <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>

*Peer Review file:* Available at <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>

*Conflicts of Interest:* All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form (available at <http://dx.doi.org/10.21037/gs-20-163>). The authors have no conflicts of interest to declare.

*Ethical Statement:* The authors are accountable for all

aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All procedures were performed in accordance with the ethical standards of the institutional review board (Approval from Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, 002/2018) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This study is part of a PhD project and has been registered in a national (Portuguese) public database: <https://renates2.dgeec.mec.pt> (Project ID: 101602375), thus complying with the Declaration of Helsinki requirement for the registration of research.

*Open Access Statement:* This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0), which permits the non-commercial replication and distribution of the article with the strict proviso that no changes or edits are made and the original work is properly cited (including links to both the formal publication through the relevant DOI and the license). See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

#### References

- Paras C, Keller M, White L, et al. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 2011;16:067012.
- McWade MA, Paras C, White LM, et al. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgury* 2013;154:1371-7.
- Falco J, Dip F, Quadri P, et al. Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *J Am Coll Surg* 2016;223:374-80.
- Ladurner R, Sommerer S, Arabi NA, et al. Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surg Endosc* 2017;31:3140-5.
- Chang YK, Lang BHH. To identify or not to identify parathyroid glands during total thyroidectomy. *Gland Surg* 2017;6:S20-9.
- Vasileiadis I, Charitoudis G, Vasileiadis D, et al. Clinicopathological characteristics of incidental parathyroidectomy after total thyroidectomy: the effect on hypocalcemia. A retrospective cohort study. *Int J Surg* 2018;55:167-74.
- Rogers-Stevane J, Kauffman GL Jr. A historical perspective on surgery of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin North Am* 2008;41:1059-vii.
- Halsted WS, Evans HM. I. The parathyroid glandules. Their blood supply and their preservation in operation upon the thyroid gland. *Ann Surg* 1907;46:489-506.
- Serra C, Silveira L, Canudo A, et al. Parathyroid identification by autofluorescence - preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism. *BMC Surg* 2019;19:120.
- Razavi AC, Ibraheem K, Haddad A, et al. Efficacy of indocyanine green fluorescence in predicting parathyroid vascularization during thyroid surgery. *Head Neck* 2019;41:3276-81.
- Kim SW, Song SH, Lee HS, et al. Intraoperative real-time localization of normal parathyroid glands with autofluorescence imaging. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:4646-52.
- Sakorafas GH, Stafyla V, Bramis C, et al. Incidental parathyroidectomy during thyroid surgery: an underappreciated complication of thyroidectomy. *World J Surg* 2005;29:1539-43.
- McGoldrick DM, Majeed M, Achakzai AA, et al. Inadvertent parathyroidectomy during thyroid surgery. *Ir J Med Sci* 2017;186:1019-22.
- Sitges-Serra A, Gallego-Otaegui L, Suárez S, et al. Inadvertent parathyroidectomy during total thyroidectomy and central neck dissection for papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2017;161:712-9.
- Bai B, Chen Z, Chen W. Risk factors and outcomes of incidental parathyroidectomy in thyroidectomy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018;13:e0207088.
- Kim SW, Lee HS, Ahn YC, et al. Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 2018;226:165-72.
- Dip F, Falco J, Verna S, et al. Randomized controlled trial comparing white light with near-infrared autofluorescence for parathyroid gland identification during total thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 2019;228:744-51.
- Benmiloud F, Godiris-Petit G, Gras R, et al. Association of autofluorescence-based detection of the parathyroid glands during total thyroidectomy with postoperative hypocalcemia risk: results of the PARAFUO multicenter randomized clinical trial. *JAMA Surg* 2019;155:106-12.

**Cite this article as:** Serra C, Silveira L, Canudo A. Identification of inadvertently removed parathyroid glands during thyroid surgery using autofluorescence. *Gland Surg* 2020. doi: 10.21037/gs-20-163

**4.6 Artigo VI: Parathyroid identification by autofluorescence - preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism.**

Publicado em BMC Surgery, 2019, 19:120

Publicado online: 28 de Agosto de 2019

Licença CC BY

## CASE REPORT

## Open Access

# Parathyroid identification by autofluorescence – preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism



Carlos Serra<sup>1,2\*</sup>, Luís Silveira<sup>3</sup>, António Canudo<sup>4</sup> and Manuel C. Lemos<sup>2,3</sup>

## Abstract

**Background:** Intra-operative identification of parathyroid glands is often a challenge for surgeons performing parathyroid or thyroid surgery. Parathyroid glands stimulated by near-infrared light emit autofluorescence, which allows their discrimination from all other tissues in the region, and this may be of value during thyroid and parathyroid surgery. In this study, we present the results of the utilization of a low-cost device developed for the identification of parathyroid glands in surgery for primary hyperparathyroidism.

**Case presentation:** In 5 patients operated in our hospital with the diagnosis of primary hyperparathyroidism and non-concordant ultrasonography and Sestamibi scan, we used a 780 nm Light Emitting Diode (LED) to stimulate the cervical area. The resulting autofluorescence was visualized with night vision goggles with a 832 nm filter assembled. In all the five patients, an easily distinguishable nodule was identified and excised, and confirmed as parathyroid adenoma by histological exam. Intra-operative PTH assay showed significant decrease compared with basal values, fulfilling the Miami Criteria for surgical success in use in our institution.

**Conclusion:** The utilization of autofluorescence for intra-operative identification of parathyroid glands may have a clinical application in surgery for primary hyperparathyroidism, being of special utility when ultrasonography and Sestamibi Scan are non concordant.

**Keywords:** Autofluorescence, Parathyroid, Surgery, Near infrared

## Background

Intra-operative identification of parathyroid glands is often a challenge for surgeons performing parathyroid or thyroid surgery. Their small size, shape and color makes them difficult to differentiate from other cervical tissues such as lymph nodes, fat and even small thyroid nodules [1, 2].

Since the beginning of parathyroid surgery, the identification of these glands has depended mainly on the surgeons' visual acuity and experience. Almost all the available techniques that could help surgeons for this purpose are dependent of the injection of exogenous substances with associated toxicity risks [3, 4].

In 2011, Paras et al. [5] reported for the first time the autofluorescence properties of parathyroid glands when stimulated with a laser beam of 795 nm, which allowed their differentiation from other tissues in the area [5]. Subsequently, other authors confirmed this property, with applications in thyroid and parathyroid surgery [6–9].

The non ionizing nature of near infrared light (700–2500 nm) and its capacity of penetration in biological tissues makes it a promising tool for image-guided surgery [10, 11].

Current devices capable of detecting intraoperative autofluorescence are generally expensive. Therefore, the authors developed a low-cost device, assembled with easily obtained components, and report its use in a group of patients with primary hyperparathyroidism that had discordant imaging localization tests.

\* Correspondence: [caaserra@netcabo.pt](mailto:caaserra@netcabo.pt)

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup>CICS – UBI, Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

### Case presentation

This study was conducted from June to October 2018 in Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal after approval by the Institutional Ethics Committee.

Following the almost universally accepted practice for the surgery of primary hyperparathyroidism, in Hospital dos SAMS we favour the focused lateral approach, based on the pre-operative localization of the pathological parathyroid gland by two concordant tests (cervical ultrasonography and Sestamibi Scan), controlled by intraoperative PTH analysis using Miami criteria [12–14].

In case of non concordant tests, a bilateral cervical exploration is usually performed through a collar incision, with identification of four glands. If localization tests point to the same side of the neck, an unilateral exploration with identification of the two glands on that side could be undertaken.

Five patients (1 male, 4 females, median age 57 years, range 26–72 years) with clinical and laboratorial diagnosis of primary hyperparathyroidism, but with non-concordant localization tests, were referred for surgical treatment and were included in the study (Table 1). Two patients also had indication for homolateral thyroid lobectomy, which was performed in the same surgical time.

Patients were submitted to a cervical exploration through a collar incision. After opening the median raphe, we proceeded with visual inspection of the area, starting by the side where Sestamibi Scan showed hyperfixation of the radiotracer, or by the side where ultrasonography showed a suspected nodule if Sestamibi scan was negative.

After visual inspection and with the operative room lights turned off, the area was stimulated with a 780 nm light beam, emitted by a LED (Light Emitting Diode) Thorlabs Model M780 L-C1 (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany) with a bandpass excitation filter of 769 nm (+/- 41 nm) Edmund Optics 84,123 (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA), powered by a LED driver T-cube 1200 mA (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany).

Simultaneously the stimulated area was visualized through an image acquisition system composed by a night vision goggle device iGen Nightviewer 20/20 nightOwl (Night Owl Optics, El Paso, Texas, USA) with a bandpass acquisition filter of 832 nm (+/- 28 nm).

In the last two cases, the acquisition system was connected to a Personal Computer through an USB acquisition board Video Grabber SVG 2.0 A3 Silvercrest (Targa GmbH Soest, Germany) using the Cyberlink PowerDirector 12 software (Cyberlink, New Taipei City, Taiwan), which allowed the recording of images and their analysis with Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

After visual identification of the parathyroid glands, confirmed with autofluorescence, the decision of which gland to excise was made by the surgeon based on the appearance and size of the identified glands.

The excised glands were immediately sent for frozen section examination. Venous blood samples were collected for Parathyroid hormone (PTH) determination at four different times: 1- after anaesthetic induction (baseline) 2- Pre-excision 3 – five minutes after excision 4 – ten minutes after excision.

The procedure was completed when Miami Criteria [14] were fulfilled. Determinations of serum calcium and PTH were done before hospital discharge (24 h after surgery) and 15 days after surgery in all patients.

In all five patients it was possible to identify the two autofluorescent parathyroid glands that had been previously visually identified (Table 2).

Operative times varied between 25 and 65 min (average 48 min).

Quantification of fluorescence intensity by Image J software undertaken in the two last patients showed a marked difference between thyroid and parathyroid autofluorescence, with parathyroid intensity being almost 2 times higher (Fig. 1).

Obtained values of intensity (arbitrary units) and ratios are presented on Table 3.

**Table 1** Characteristics of patients

Patient	Sex	Age (years)	Diagnosis	Non Concordance
1	F	51	Primary Hyperparathyroidism	Sestamibi -Hyperfixation on PIII right Ultrasound – PIII left
2	F	72	Primary Hyperparathyroidism	Sestamibi - negative Ultrasound- PIII right
3	F	68	Primary Hyperparathyroidism Nodule on right lobe of thyroid	Sestamibi - negative Ultrasound– intrathyroid nodularity
4	F	69	Primary Hyperparathyroidism Nodule on right lobe of thyroid	Sestamibi- PIV left Ultrasound- PIV right
5	M	26	Primary Hyperparathyroidism	Sestamibi- PIII right Ultrasound - negative

Abbreviations: PIII inferior parathyroid, PIV superior parathyroid

**Table 2** Surgery data

Patient	Surgery	Pt identified/sought	Duration of surgery (minutes)	Pathological diagnosis
1	Excision of right inferior parathyroid	2/2	45	Oxyphilic cells adenoma
2	Excision of right superior parathyroid	2/2	50	Principal cells adenoma
3	Excision of right superior parathyroid Right thyroid lobectomy	2/2	65	Principal cells adenoma
4	Excision of right superior parathyroid Right thyroid lobectomy	2/2	45	Oxyphilic cells adenoma
5	Excision of right superior parathyroid	2/2	35	Principal cells adenoma

Abbreviation: Pt parathyroid glands

No statistical comparison was done due to the small sample size.

Visually there was no relevant difference between the perceived intensity of fluorescence of normal and pathological parathyroid glands.

Frozen section examination of the excised glands showed in all five cases the presence of a parathyroid adenoma, which was further confirmed by conventional pathological examination.

No parathyroid tissue was found within the lobectomy specimens.

Determinations of intra-operative PTH were performed in four patients (Table 4), showing a decrease of the PTH levels fulfilling Miami Criteria in use in Hospital dos SAMS [14].

In one patient these determinations were not performed due to technical problems with the analysis system. Results of calcium and PTH (pre-operative, intra-operative, 24 h and 15 days) are presented in Table 4.

During the six month follow-up period there were no cases of persistent hyperparathyroidism.

**Discussion and conclusions**

Autofluorescence of parathyroid glands, when submitted to a near infrared light, allows their discrimination from other cervical tissues and may be useful in an operative setting.

Although the initial work of Paras et al. [5] had been directed to surgery of the thyroid gland, the autofluorescence of pathological parathyroid glands, namely adenomas and hyperplasia allows its utilization in surgery of hyperparathyroidism, helping in the localization of the glands [15].

The results of the surgery for primary hyperparathyroidism have always been highly dependent of surgeons' experience [16].

As this surgery is less frequent than thyroid surgery, experience is not easily acquired outside reference centres. In addition, there are not many useful intra-operative tools for helping less experienced surgeons [17]. Furthermore, pre-operative localization tools are sometimes discordant, and in these cases, a bilateral neck exploration may be necessary to identify the affected glands [17].

In our series of five consecutive patients with non-concordant cervical ultrasonography and sestamibi scan, the utilization of the developed device facilitated the identification of the parathyroid glands although it could not differentiate normal from pathological glands, as there was no visually significant difference in fluorescence intensity. Nevertheless, the confidence of the surgeon in the identification of parathyroid glands was greatly improved with its use.

**Table 3** Quantification of autofluorescence with Image J software

	Patient 4	Patient 5
AF parathyroid adenoma	228	243
AF normal parathyroid	225	248
AF thyroid	110	125
Ratio AF adenoma/ Normal Pt	1.013	0.980
Ratio AF Adenoma/Thyroid	2.072	1.944
Ratio AF Normal Pt/ Thyroid	2.045	1.984

Abbreviations: AF autofluorescence, Pt parathyroid gland  
Units: arbitrary units (imageJ software)



**Fig. 1** Autofluorescence of thyroid (T) and parathyroid (Pt) captured at exploration of the superior pole of thyroid (right side). We can see that thyroid gland also emits autofluorescence but with considerably less intensity than parathyroid

**Table 4** Calcium and PTH determinations

Patient	Pre-op Calcium	Pre-op PTH	Io PTH max	Io PTH min	Variation Io PTH	Calcium 24 h	PTH 24 h	Calcium 15 days	PTH 15 days
1	12	267	388	31.8	-90%	8.4	8.9	9.0	32
2	11.4	102	171	19	-88%	8.5	26	9.9	44
3	10.6	139	*	*	*	8.6	50	9.7	91
4	10.8	142	114	18.9	-83%	9.4	3	8.5	52
5	11.8	209	100	4	-96%	8.9	3	8.8	86

Abbreviations: *Pre-op* pre-operative, *PTH* parathyroid hormone, *Io* intra-operative. \*Intra-operative PTH not measured (failure of the equipment)  
Units: Calcium: mg/dl, PTH: pg/ml  
Normal values: Calcium 8.5–10.4 mg/dl PTH 11–65 pg/ml

The small size of our sample doesn't allow conclusions about the intensity of autofluorescence of normal and abnormal parathyroid glands, an issue that needs further evaluation.

Whereas the results of Falco et al. [9] showed higher intensity of autofluorescence of parathyroid adenomas than normal parathyroid glands, the results of Kose et al. [18] showed higher intensity of autofluorescence of normal glands. Ladurner et al. [7] and Squires et al. [19] didn't find significant difference between normal and abnormal glands.

Larger studies with equivalent methodologies will be necessary to completely clarify the problem.

We also did not observe relevant differences in fluorescence intensity between adenomas with predominance of either principal cells or oxyphilic cells.

As the differences of fluorescence intensity between normal and pathological glands are non-significant, it seems unlikely that this measurement could be useful for the discrimination of affected glands.

The decision about which gland to excise remained dependent of the surgeons evaluation supported by frozen section examination and intraoperative PTH determinations.

However, this device could be useful for less experienced surgeons, with less visual training on identifying parathyroid glands.

As the current device used in this work is still in the process of improvement, it has some important limitations, namely the low image quality and the need to switch off the operative lights when in use.

Although near infrared light has some capacity of penetration into tissues (less than 5 mm), some dissection might still be necessary for parathyroid identification.

The ability of this technique for the identification of the rare true intrathyroid parathyroid glands remains uncertain [7].

Regardless of these limitations, our results suggest that the utilization of autofluorescence could be of great value for helping surgeons operating patients with primary hyperparathyroidism and even contribute to shorten the operative time.

The identification of parathyroid glands with autofluorescence could minimize the lesser experience of the surgeon performing parathyroid surgery, possibly reducing the need of a substantial visual training and improving the confidence of the surgeon and the speed of the procedure, namely in cases of non concordant ultrasonography and sestamibi scans, for which it is necessary to identify more than one gland.

Although these results need validation with studies enrolling a greater number of patients, the potential benefits in surgical practice, the ease of assemblage and use of our device, and the fact that it costs only a fraction of the devices recently launched in the market, may ultimately allow a more widespread use of this technique.

#### Abbreviations

LED: Light emitting Diode; PTH: Parathyroid hormone

#### Acknowledgements

The authors want to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito of the Department of Pathology of Hospital dos SAMS for their contribution in this study.

#### Authors' contributions

Study conception and design: CS, LS, AC, ML. Acquisition of data: CS, AC. Analysis and interpretation of data: CS, LS. Drafting of the manuscript: CS, LS. Critical revision of the manuscript: AC, ML. All authors read and approved this manuscript.

#### Funding

Not applicable (no funding was received).

#### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

#### Ethics approval and consent to participate

Ethics approval: All procedures were performed in accordance with the ethical standards of the institutional review board (Approval from Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, 002/2018) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This study is part of a PhD project and has been registered in a national (Portuguese) public database: <https://renates2.dgeec.mec.pt> (Project id 101602375), thus complying with the Declaration of Helsinki requirement for the registration of research.

Informed consent: Written informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

#### Consent for publication

Written consent for publication was obtained from all individual participants included in the study for data and recorded images and is available for review by the editor.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal. <sup>2</sup>CICS – UBI, Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal. <sup>3</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal. <sup>4</sup>Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Lisbon, Portugal.

Received: 11 June 2019 Accepted: 19 August 2019

Published online: 28 August 2019

**References**

- Akerstrom G, Malmaeus J, Bergstrom R. Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery*. 1984;95(1):14–21.
- Fancy T, Gallagher D 3rd, Hornig JD. Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin N Am*. 2010;43(2):221–7 vii.
- Lee WJ, Ruda J, Stack BC Jr. Minimally invasive radioguided parathyroidectomy using intraoperative sestamibi localization. *Otolaryngol Clin N Am*. 2004;37(4):789–98 ix.
- Maguire CA, Sharma A, Alarcon L, Ffolkes L, Kurzepa M, Ostlere L, et al. Histological features of methylene blue-induced Phototoxicity administered in the context of parathyroid surgery. *Am J Dermatopathol*. 2017;39(8):e110–e5.
- Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt*. 2011;16(6):067012.
- McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery*. 2013;154(6):1371–7.
- Ladurner R, Sommerer S, Al Arabi N, Hallfeldt KK, Stepp H, Gallwas JK. Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surg Endosc*. 2017;31(8):3140–5.
- Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, et al. Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *J Am Coll Surg*. 2018;226(2):165–72.
- Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R. Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *J Am Coll Surg*. 2016;223(2):374–80.
- Smith AM, Mancini MC, Bioimaging NS. Second window for in vivo imaging. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(11):710–1.
- Gioux S, Choi HS, Frangioni JV. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging*. 2010;9(5):237–55.
- Kunzman JW, Kirsch JD, Mahajan A, review URC. Parathyroid localization and implications for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(3):902–12.
- Carneiro-Pla D. Contemporary and practical uses of intraoperative parathyroid hormone monitoring. *Endocr Pract*. 2011;17(Supplement 1):44–53.
- Barczynski M, Konturek A, Hubalewska-Dydejczyk A, Cichon S, Nowak W. Evaluation of Halle, Miami, Rome, and Vienna intraoperative iPTH assay criteria in guiding minimally invasive parathyroidectomy. *Langenbeck's Arch Surg*. 2009;394(5):843–9.
- Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Prunello M, Rosenthal RJ. Increased identification of parathyroid glands using near infrared light during thyroid and parathyroid surgery. *Surg Endosc*. 2017;31(9):3737–42.
- Stavrakis AI, Ituarte PH, Ko CY, Yeh MW. Surgeon volume as a predictor of outcomes in inpatient and outpatient endocrine surgery. *Surgery*. 2007; 142(6):887–99 discussion -99.
- Harrison BJ, Triponez F. Intraoperative adjuncts in surgery for primary hyperparathyroidism. *Langenbeck's Arch Surg*. 2009;394(5):799–809.
- Kose E, Kahramangil B, Aydin H, Donmez M, Berber E. Heterogeneous and low-intensity parathyroid autofluorescence: patterns suggesting hyperfunction at parathyroid exploration. *Surgery*. 2019;165(2):431–7.
- Squires MH, Jarvis R, Shirley LA, Phay JE. Intraoperative parathyroid autofluorescence detection in patients with primary hyperparathyroidism. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(4):1142–8.

**Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



#### **4.7 Artigo VII: Intraoperative identification of parathyroid glands by autofluorescence on total thyroidectomy - Does it really reduces post-operative hypocalcemia?**

Publicado em Surgery in Practice and Science, 2020, Volume 2, 100011

Publicado online: 5 de Agosto de 2020

Licença CC-BY-NC-ND



Contents lists available at ScienceDirect

Surgery in Practice and Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sipas](http://www.elsevier.com/locate/sipas)



## Intraoperative identification of parathyroid glands by autofluorescence on total thyroidectomy – Does it really reduces post-operative hypocalcemia?



Carlos Serra<sup>a,b,\*</sup>, António Canudo<sup>a</sup>, Luís Silveira<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Rua Cidade de Gabela 1, 1849-017 Lisboa, Portugal

<sup>b</sup> CIGS – UBI, Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>c</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Parathyroid  
Autofluorescence  
Thyroid  
Hypocalcemia

### ABSTRACT

**Background:** Intraoperative identification of parathyroid glands which remains largely dependent on the surgeon's expertise, is a major challenge in endocrine surgery and the most efficient way to reduce postoperative hypocalcemia and its important morbidity.

Since the description on autofluorescence of parathyroid glands by Paras et al. in 2011, other works had confirmed the utility of this property in the identification of the glands but its efficacy in reducing hypocalcemia is not completely stated.

In this study we evaluate the utilization of a low-cost device in total thyroidectomy.

**Methods:** In a before and after controlled study we compared patients submitted to total thyroidectomy by the same surgeon in two periods: From January 2017 to February 2018 (visual identification of parathyroid glands) and from February 2018 to December 2019 (with utilization of the near infrared system).

Main outcomes included postoperative hypocalcemia and hypoparathyroidism, parathyroid identification and incidental resection.

**Results:** Patients in the study group displayed significantly lower postoperative hypoparathyroidism ( $p = 0.044$ ). In spite of the reduction observed in study group absolute values of calcium and number of hypocalcemic patients didn't achieve statistical significance. There were no patients with permanent hypocalcemia in study group comparing with 3 in the control group.

Number of parathyroid glands identified was significantly higher in study group ( $p < 0.001$ ).

Near infrared autofluorescence device was able to identify accurately inadvertently removed parathyroid glands, with a sensitivity of 100% and a specificity of 87.5%.

**Conclusions:** Event though we couldn't demonstrate significant improvement in transient postoperative hypocalcemia, the reduction of permanent hypocalcemia and the improvement in surgeon's ability and confidence in the identification of parathyroid glands could make near infrared autofluorescence an useful tool in surgery of thyroid gland.

### 1. Introduction

Intraoperative identification of parathyroid glands remains a challenge to surgeons during thyroid and parathyroid surgeries even in this era of technological advances as it still depends mainly on the surgeon's visual acuity and expertise [1,2].

Parathyroids small size, shape and color made them easily confounded with lymphatic nodes or fat nodules [3-5].

The systematic identification and preservation of well vascularized parathyroid glands is the only way of reducing postoperative hypocalcemia, one of the most fearsome complications of thyroid surgery, that

occurs transiently in 20–65% of patients and permanently in 1–7.9% [6-12].

Paras et al. in 2011 described autofluorescence of parathyroid glands, a property that could allow their discrimination from other cervical tissues [13].

Those initial works were followed by studies from other groups confirming the utility of autofluorescence for intraoperative identification of parathyroid glands [14-19] and motivated us to try to visualize these glands with an affordable device using easily achievable components [17,20].

\* Corresponding author at: Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS, Rua Cidade de Gabela 1, 1849-017 Lisboa, Portugal.

E-mail addresses: [caaserra@netcabo.pt](mailto:caaserra@netcabo.pt) (C. Serra), [antonio.canudo@sams.sbsi.pt](mailto:antonio.canudo@sams.sbsi.pt) (A. Canudo), [luis.silveira.0@gmail.com](mailto:luis.silveira.0@gmail.com) (L. Silveira).

<https://doi.org/10.1016/j.sipas.2020.100011>

Received 5 June 2020; Received in revised form 29 July 2020; Accepted 29 July 2020

2666-2620/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license.

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Fig. 1. Light source (785 nm LED) with power supply, night vision goggles and bandpass filters.

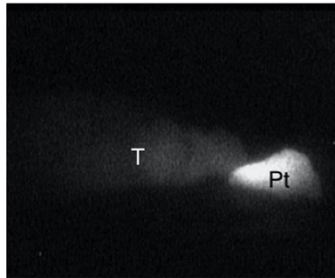


Fig. 2. Intraoperative image showing autofluorescence of thyroid (T) and parathyroid gland (Pt).

The system is composed by a light source - 780 nm LED (Light emission diode) and an image acquisition device - night vision goggle - both coupled with bandpass filter lens [21] (Fig. 1).

After testing the system in vitro, with samples provided by the pathological department of our hospital we started its utilization in an operative setting on thyroid and parathyroid surgery.

Although the accuracy of autofluorescence to identify parathyroid glands is well established the repercussions of that identification in reducing hypocalcemia still needs to be proved [22-28].

In this study we compare the outcomes of patients submitted to total thyroidectomies before and after the utilization of the system, regarding postoperative hypocalcemia and hypoparathyroidism.

2. Material and methods

The present study was approved by the Ethics Committee of our hospital.

From January 2017 to December 2019, 105 patients were submitted to total thyroidectomies by the same surgeons, in the institution.

After March 2018 near infrared autofluorescence was used systematically in all but 4 total thyroidectomies, in which the system wasn't available for technical reasons.

After initial mobilization of the thyroid lobe and visual inspection of the region the operative room lights were turned off and the operative field inspected through the device for the presence of parathyroid glands (Fig. 2). The localization of the suspected glands was compared with the results of the visual inspection.

The system is composed by a light source - 780 nm LED (Light emission diode) Thorlabs model M780L3-C1 (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) with a 769 nm +/- 41 nm bandpass excitation filter (Edmond Optics 84,123 - Edmond Optics - Barrington, NJ, USA), powered by a 1200 mA LED driver T-cube (Thorlabs GmbH, Dachau, Germany)

and an image acquisition device - night vision goggle iGen nightviewer 20/20 nightOwl (Night Owl optics, El Paso, Texas USA) - which uses a CCD Sony ICX254AL image detector, with a 832 nm bandpass emission filter coupled.

After resection the thyroid specimen was carefully inspected with the device, for the presence of incidentally removed parathyroid tissue. The localization of the suspect fluorescent areas was annotated for confrontation with pathological exam.

In all patients determinations of calcium and Parathyroid hormone (PTH) were done 24 h and 15 days after surgery.

In our practice all patients with 24-h calcium levels below 8.0 start calcium supplementation with or without calcitriol supplementation: patients with calcium below 7.5 or symptomatic start intravenous supplementation of calcium gluconate and oral calcitriol and are discharged asymptomatic (usually next day) with oral calcium and calcitriol supplementation. Patients with calcium levels between 7.5 and 8.0 start oral supplementation. If PTH values are also below normal range oral calcitriol is added.

Patients with hypocalcemia at day 15 were periodically evaluated by their assistant endocrinologist and determinations of calcium and PTH at day 180 were considered in this work.

Statistical analysis of data was done with the software SPSS 25 for Macintosh (IBM corp Armonk US) using t-student, chi-square and fisher exact's tests. A p-value of 0,05 was considered significant.

3. Results

Overall 105 patients were enrolled in this study, 45 with utilization of the described system (study group) and 60 without (control group).

There were no significant variations on preoperative characteristics of the two groups regarding sex ratio, age, preoperative calcium, preoperative PTH or initial diagnosis (Table 1).

As usual in thyroid surgery there was a strong predominance of female sex.

Mean weight of specimens of study group was higher than control groups with a little significance. (P = 0.048).

Pathological exam of the excised specimens is shown in Table 2, with predominance of nodular hyperplasia (nodular goiter).

There were no statistically significant variations between the groups regarding malignancy, thyroiditis or thoracic goiter.

In control group the mean of parathyroid glands visually identified by the surgeon with high level of confidence was 2.33 (sd 0.968). In the study group the mean of glands identified was 3.47 (sd 0.625), which represents a significant difference between groups (p < 0.001).

One patient in control group developed a neck hematoma 3 h being reoperated 3 h after the initial surgery. Post-operative period was uneventful after, with calcium and PTH in normal range.

In the whole sample 2 patients (1 in control and 1 in study group) had transient lesions of recurrent laryngeal nerve. One patient in the study group had a permanent recurrent laryngeal nerve lesion.

**Table 1**  
Characteristics of the patients, preoperative laboratorial values and diagnosis, postoperative diagnosis and weight of the sample.

		AF-N = 60	AF+N = 45	P value
Preoperative	Sex ratio: M/F	0.20	0.36	
	Age (mean ±SD)	61.4 ± 15.5	61.6 ± 12.1	0.942
	Calcium mean (±SD)	9.37 ± 0.46	9.48 ± 0.43	0.294
	PTH mean (± SD)	54.01 ± 8.03	58.17 ± 8.36	0.840
	Initial diagnosis			0.462
	Cancer	3 (5%)	1 (2.2%)	
	Suspicion of malignancy	8 (12.3%)	2 (4.4%)	
	AUS/FLUS	5 (8.3%)	3 (6.7%)	
	MNG	37 (61.7%)	31 (68.9%)	
	Toxic Graves	2 (3.3%)	4 (8.9%)	
Postoperative	Follicular Tumor	0	1 (2.2%)	
	Weight	52.46 ± 57.71	58.98 ± 33.07	0.048
	Final diagnosis			
	Benign	40 (66.7%)	37 (82.2%)	0.081
	Malignant	20 (33.3%)	8 (17.8%)	

Abbreviations: M male F female PTH parathyroid hormone SD Standard deviation AUS/FLUS Atypia of undetermined significance/ Follicular lesion of undetermined significance MNG multinodular goiter  
Units: Calcium: mg/dl, PTH: pg/ml Age: years Weight +: grams  
Normal values: Calcium 8.5–10.4 mg/dl PTH 11–65 pg/ml.

**Table 2**  
Pathological diagnosis.

	AF- n = 60	AF+ n = 45
Nodular hyperplasia	37 (61.7%)	36 (80%)
Papillary Carcinoma	18 (30.0%)	6 (13.3%)
Follicular Carcinoma	2 (3.3%)	1 (2.2%)
Lymphocytic Thyroiditis	2 (3.3%)	0
Follicular Adenoma	0	1 (2.2%)
Medullary Carcinoma	0	1 (2.2%)
Normal Thyroid	1 (1.7%)	0
		p = 0.072

Values of calcium 24 h after surgery varied between 7.1 and 9.0 (mean 8.172 Sd 0.424) for the control group and between 7.1 and 10.4 (mean 8.336 Sd 0.603) in the study group (Table 3)

In spite the lower mean values observed in control group the difference between groups wasn't statistically significant (p = 0.325).

We couldn't also demonstrate significant differences between groups when comparing different grades of hypocalcemia (Table 4a) neither when comparing different levels of PTH (Table 4b) although the number of patients with PTH below normal range were inferior when autofluorescence was used (8 patients – 17.8% versus 21 patients – 35% - p = 0.077)

Mean drop off of calcium and PTH values although slightly greater in control group didn't achieve significant relevance.

**Table 4a**  
Comparison of Calcium levels between groups.

Calcium	AF - (n = 60)	AF+ (n = 45)	p-value
>8.0	42 (70%)	33 (73.3%)	0.468
7.7–7.9	11 (18.3%)	8 (17.8%)	0.568
7.4–7.6	5 (8.3%)	3 (6.7%)	0.526
7.1–7.4	2 (3.3%)	1 (2.2%)	0.606

Abbreviations: AF autofluorescence Units: Calcium: mg/dl.

**Table 4b**  
Comparison of PTH levels between groups.

PTH	AF - (n = 60)	AF+ (n = 45)	p-value
>11	39 (65.0%)	37 (82.2%)	0.077
4 – 11	8 (13.3%)	4 (8.9%)	0.350
< 4	13 (21.7%)	4 (8.9%)	0.079

Abbreviations: AF autofluorescence Units: PTH: pg/ml.

Determinations of PTH 24 h after surgery showed a statistically significant difference favoring the study group — mean 31.047 (Sd 21.158) versus 23.325 (Sd 20.040) – p = 0.044.

**Table 3**  
Post operative determinations of calcium and PTH – mean (standard deviation).

	AF- (n = 60)	AF+ (n = 45)	p-value	
Calcium 24 h	8.172 (0.424)	8.336 (0.603)	0.325	
PTH 24 h	23.325 (20.040)	31.047 (21.158)	0.044	
Calcium 15 d	9.050 (0.689)	9.147 (0.482)	0.913	
PTH 15 d	36.891 (24.165)	49.331 (32.238)	0.043	
Calcium 180 d	9.104 (0.392)	9.173 (0.400)	0.781	
PTH 180 d	36.327 (24.003)	50.100 (18.351)	0.406	
Drop off 24 h	Calcium	1.170 (0.555)	1.050 (0.738)	0.444
	PTH	33.121 (26.460)	19.052 (22.775)	0.102

Abbreviations: PTH parathyroid hormone AF autofluorescence h hours d days  
Units: Calcium: mg/dl PTH: pg/ml  
Normal values: Calcium 8.5–10.4 mg/dl PTH 11–65 pg/ml.

**Table 5**  
Comparison of hypocalcemic events by associated features between groups.

	N	Hypocalcemia		Normocalcemia		p-value
		AF-	AF+	AF-	AF+	
Malignancy	28	6 (30%)	2 (25%)	14 (70%)	6 (75%)	0.589
Thyroiditis	14	3 (37.5%)	2 (33%)	5 (62.5%)	4 (67%)	0.657
Thoracic	16	1 (14.3%)	2 (22.2%)	6 (85.7%)	7 (77.8%)	0.600

Abbreviations: AF autofluorescence.

Determinations of calcium at postoperative day 15 and calcium and PTH six month after surgeries also had no significant differences between groups.

At postoperative day 15, mean PTH values were significantly higher in study group – mean 49.332 (Sd 32.238) versus 36.891 (Sd 24.165) –  $P = 0.043$ .

In study group 11 patients (24.4%) presented 24-h post-operative hypocalcemia, condition that occurred in 18 patients (30%) of the control group ( $p = 0.343$ ).

We couldn't find differences between the groups concerning hypocalcemia when individual factors (presence of thyroiditis, thoracic goiter or malignancy) were analyzed (Table 5).

Twenty-four hours after surgery 8 patients in study group had PTH levels below normal range, condition that occurred in 21 patients in the control group ( $p = 0.047$ ).

At post-operative day 15 in spite of calcium and vitamin D supplementation, 3 patients in the control group still had hypocalcemia (calcium 7.6, 7.2 and 6.4; PTH 19.5, 11.0, 7.9) whereas only 1 patient in study group had calcium values below normal range (7.9, PTH 10.9).

Six months after surgery three patients in control group had permanent hypoparathyroidism, remaining with therapeutics. In the study group no patient needed calcium supplementation for more than 15 days after surgery.

Pathological examination of the thyroid specimens detected parathyroid fragments in 7 patients of the study group (15.6%) and in 15 patients in control group (25%). This difference has no statistical significance ( $p = 0.175$ ) and also there was no correlation between the presence of parathyroid fragments in the sample and the occurrence of temporary or permanent hypocalcemia ( $p = 0.399$ ). The number of fragments found also had no correlation with the occurrence of hypocalcemia ( $p = 0.272$ ).

The specimens of the study group were also inspected for the presence of parathyroid tissue by autofluorescence, with high concordance with the pathological exam: all the seven fragments were correctly identified, with only a false positive case (colloid nodule). This represents a sensitivity of 100% and specificity of 97.8% and a positive predictive value of 87.5% and a negative predictive value of 100%.

#### 4. Discussion

Utilization of near infrared autofluorescence for intraoperative identification of parathyroid glands may have a strong impact on thyroid and parathyroid surgeries, providing surgeons with a helpful tool, that could minimize the impacts of post-operative hypocalcemia.

In our study there was a significant increase on the number of parathyroid glands identified with the utilization of the device comparing with the visual perception of the surgeon, results comparable with the results of Falco et al. [22] and Squires et al. [29].

All these results have however a strong bias since no biopsy of the perceived parathyroid glands was done. This bias is recurrent in all the works in the area, as ethical reasons strongly forbid the pathological examination of healthy tissues.

Event thought the utilization of near infrared autofluorescence increased the confidence of the surgeon in the identification of parathyroid glands and potentially could decrease the learning curve for that

identification in less experimented surgeons, allowing low-volume surgeons which worldwide assure most of thyroid surgery to improve their results [30,31].

In our sample we couldn't find statistically significant difference in 24-h post-operative calcium values or in the drop-off of calcium values although the better results achieved in the study group.

There was however a statistically significant improvement in the values of PTH at 24 h.

This results are consistent with the results of Di Marco et al. [32], Dip et al. [33] and Ladurner et al. [34].

Until now only Benmiloud et al. [35,36] showed a statistically significant improvement in postoperative hypocalcemia. The utilization of a broad definition of hypocalcemia by this author may in part explain those results as the temporal window considered (24 or 48 h) could led to different values.

Although there was a reduction of the percentage of patients with 24-h hypocalcemia in the study groups, that also couldn't achieve statistical significance.

The absence of permanent hypocalcemia cases in the study group, consistent with other reports [33,35] is perhaps the most important finding of this work, even if a statistically significant result is difficult to achieve because of the large sample it would be necessary to assure the power of the study, and is an important motivation for continuation of the research.

The potentiality of near infrared autofluorescence in the inspection of the excised specimens for the presence of incidentally removed parathyroid glands was already stated by other authors [23,37,38] and was confirmed in this work, with high sensitivity and specificity.

Also, the percentage of patients with incidentally removed fragments of parathyroid was inferior in the study group which can indicate the value of the system to guide the dissection.

In our work we couldn't however demonstrate clinical advantage, since there was no correlation between the presence of parathyroid tissue in the sample and the occurrence of postoperative hypocalcemia. As we considered the presence of any amount of parathyroid tissue detected in pathological examination, that small amount of tissue may be equivalent to a biopsy, leaving in place most of the gland, situation also reported by De Leeuw et al. [15], explaining the absence of repercussion on calcium values.

The consolidation of the technique might allow it to replace frozen section examination of doubtful parathyroid glands incidentally removed, reducing the increased operative time and costs associated with this exam [39,40].

In this study we didn't include any case of central neck compartment dissection, as our annual casuistic is scarce for that procedure in which we believe the utilization on autofluorescence could decrease the rates of hypocalcemia allowing better preservation of parathyroid glands and their easier discrimination from lymph nodes.

As reported by De Leeuw et al. [15] we also had a false positive colloid nodule.

Colloid nodules, brown fat and even lymphatic nodes had been associated with few cases of false positivity [40] and that awareness must always be present and taken in consideration namely in surgery for malignancy.

#### 5. Conclusions

Although in this work we couldn't demonstrate significant statistical improvement in postoperative transitory hypocalcemia, near infrared autofluorescence may become a useful tool for identification of parathyroid glands in thyroid surgery, increasing surgeons' confidence, contributing to the preservation of the glands in situ and allowing an easy "optical biopsy" of suspect parathyroid tissue, that could overwhelm its main limitation: the absence of information about the irrigation status of the glands.

# Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

C. Serra, A. Canudo and L. Silveira

*Surgery in Practice and Science 2 (2020) 100011*

## Registry

This study is part of a PhD project, has been registered in a national (Portuguese) public database: <https://renates2.dgeec.mec.pt> (Project id 101602375), and thus complies with the Declaration of Helsinki requirement for the registration of research.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors

## Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study

## Human rights

All procedures were performed in accordance with the ethical standards of the institutional review board (Approval from Comissão de Ética do Hospital dos SAMS, 002/2018) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors want to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito from Pathology Department of Hospital dos SAMS for their contribution with pathological examination of the samples.

We also thank Dr. António Gomes for his contribution.

## References

- [1] Sethi MN, England MRJA. Parathyroid surgery: from inception to the modern day. *Br J Hosp Med* 2017;78(6):333–7. doi:10.12968/hmed.2017.78.6.333.
- [2] Lappas D, Noustos G, Anagnostis P, Adamidou F, Chatzigeorgiou A, Skandalakis P. Location, number and morphology of parathyroid glands: results from a large anatomical series. *Anat Sci Int* 2012;87(3):160–4. doi:10.1007/s12565-012-0142-1.
- [3] Mohebbati A, Shaha AR. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clin Anat* 2012;25(1):19–31. doi:10.1002/ca.21220.
- [4] Akerstrom G, Malmhaus J, Bergstrom R. Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery* 1984;95(1):14–21.
- [5] Fancy T, Gallagher D, 3rd Hornig JD. Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin N Am* 2010;43(2):221–7. doi:10.1016/j.otc.2010.01.001.
- [6] Almqvist M, Ivarsson K, Nordenstrom E, Bergenfelz A. Mortality in patients with permanent hypoparathyroidism after total thyroidectomy. *Br J Surg* 2018;105(10):1313–18. doi:10.1002/bjs.10843.
- [7] Bergenfelz A, Nordenstrom E, Almqvist M. Morbidity in patients with permanent hypoparathyroidism after total thyroidectomy. *Surgery* 2020;167(1):124–8. doi:10.1016/j.surg.2019.06.056.
- [8] Edfate O, Balasubramanian SP. Incidence, prevalence and risk factors for post-surgical hypocalcaemia and hypoparathyroidism. *Gland Surg* 2017;6(Suppl 1):S59–68. doi:10.21037/gs.2017.09.03.
- [9] Pattou F, Combemale F, Fabre S, Carnaille B, Decoux M, Wemeau JL, et al. Hypocalcaemia following thyroid surgery: incidence and prediction of outcome. *World J Surg* 1998;22(7):718–24.
- [10] Ritter K, Eifenbein D, Schneider DF, Chen H, Sippel RS. Hypoparathyroidism after total thyroidectomy: incidence and resolution. *J Surg Res* 2015;197(2):348–53. doi:10.1016/j.jss.2015.04.059.
- [11] Chadwick DR. Hypocalcaemia and permanent hypoparathyroidism after total/bilateral thyroidectomy in the BAETS Registry. *Gland Surg* 2017;6(Suppl 1):S69–74. doi:10.21037/gs.2017.09.14.
- [12] Wilson RB, Erskine C, Crowe PJ. Hypomagnesaemia and hypocalcaemia after thyroidectomy: prospective study. *World J Surg* 2000;24(6):722–6. doi:10.1007/s002689910116.
- [13] Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 2011;16(6):067012. doi:10.1117/1.3583571.
- [14] McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surgery* 2013;154(6):1371–7. doi:10.1016/j.surg.2013.06.046.
- [15] De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Lakhdar AB, et al. Intraoperative near-infrared imaging for parathyroid gland identification by autofluorescence: a feasibility study. *World J Surg* 2016;40(9):2131–8.
- [16] Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R. Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. *J Am Coll Surg* 2016;223(2):374–80.
- [17] Kim SW, Song SH, Lee HS, Noh WJ, Oak C, Ahn YC, et al. Intraoperative real-time localization of normal parathyroid glands with autofluorescence imaging. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101(12):4646–52. doi:10.1210/jc.2016-2558.
- [18] Ladurner R, Sommerer S, Al Arabi N, Hallfeldt KK, Stepp H, Gallwas JK. Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands. *Surg Endosc* 2017;31(8):3140–5.
- [19] Alesina PF, Meier B, Hinrichs J, Mohmand W, Walz MK. Enhanced visualization of parathyroid glands during video-assisted neck surgery. *Langenbecks Arch Surg* 2018;403(3):395–401. doi:10.1007/s00423-018-1665-2.
- [20] Liu Y, Bauer AQ, Akers WJ, Sudlow G, Liang K, Shen D, et al. Hands-free, wireless goggles for near-infrared fluorescence and real-time image-guided surgery. *Surgery* 2011;149(5):689–98. doi:10.1016/j.surg.2011.02.007.
- [21] Serra C, Silveira L. Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device. *ANZ J Surg* 2019. doi:10.1111/ans.15597.
- [22] Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Prunello M, Rosenthal RJ. Increased identification of parathyroid glands using near infrared light during thyroid and parathyroid surgery. *Surg Endosc* 2017;31(9):3737–42. doi:10.1007/s00464-017-5424-1.
- [23] Kahramangil B, Berber E. The use of near-infrared fluorescence imaging in endocrine surgical procedures. *J Surg Oncol* 2017;115(7):848–55. doi:10.1002/jso.24583.
- [24] Kahramangil B, Dip F, Benmiloud F, Falco J, de la Fuente M, Verna S, et al. Detection of parathyroid autofluorescence using near-infrared imaging: a multicenter analysis of concordance between different surgeons. *Ann Surg Oncol* 2018;25(4):957–62. doi:10.1245/s10434-018-6364-2.
- [25] Abbaci M, De Leeuw F, Breuskin I, Casiraghi O, Lakhdar AB, Ghanem W, et al. Parathyroid gland management using optical technologies during thyroidectomy or parathyroidectomy: a systematic review. *Oral Oncol* 2018;87:186–96. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.11.011.
- [26] Ladurner R, Al Arabi N, Guendogar U, Hallfeldt K, Stepp H, Gallwas J. Near-infrared autofluorescence imaging to detect parathyroid glands in thyroid surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2018;100(1):33–6. doi:10.1308/rcsann.2017.0102.
- [27] McWade MA, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED, Galloway RL Jr, McDonald WH, Broome JT. Development of an intraoperative tool to detect parathyroid gland autofluorescence. *Vanderbilt University*; 2016.
- [28] Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, et al. Near-infrared autofluorescence image-guided parathyroid gland mapping in thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 2018;226(2):165–72.
- [29] Squires MH, Jarvis R, Shirley LA, Phay JE. Intraoperative parathyroid autofluorescence detection in patients with primary hyperparathyroidism. *Ann Surg Oncol* 2019;26(4):1142–8. doi:10.1245/s10434-019-07161-w.
- [30] Aspinall S, Oweis D, Chadwick D. Effect of surgeons' annual operative volume on the risk of permanent Hypoparathyroidism, recurrent laryngeal nerve palsy and Haematoma following thyroidectomy: analysis of United Kingdom registry of endocrine and thyroid surgery (UKRETS). *Langenbecks Arch Surg* 2019;404(4):421–30. doi:10.1007/s00423-019-01798-7.
- [31] Thomas G, McWade MA, Paras C, Mannoh EA, Sanders ME, White LM, et al. Developing a clinical prototype to guide surgeons for intraoperative label-free identification of parathyroid glands in real time. *Thyroid* 2018;28(11):1517–31. doi:10.1089/thy.2017.0716.
- [32] DiMarco A, Chotalia R, Bloxham R, McIntyre C, Tolley N, Palazzo FF. Does fluorescence prevent inadvertent parathyroidectomy in thyroid surgery? *Ann R Coll Surg Engl* 2019;101(7):508–13. doi:10.1308/rcsann.2019.0065.
- [33] Dip F, Falco J, Verna S, Prunello M, Loccisano M, Quadri P, et al. Randomized controlled trial comparing white light with near-infrared autofluorescence for parathyroid gland identification during total thyroidectomy. *J Am Coll Surg* 2019;228(5):744–51. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.12.044.
- [34] Ladurner R, Lerchenberger M, Al Arabi N, Gallwas JK, Stepp H, Hallfeldt KKJ. Parathyroid autofluorescence-how does it affect parathyroid and thyroid surgery? A 5 year experience. *Molecules* 2019;24(14). doi:10.3390/molecules24142560.
- [35] Benmiloud F, Rebaudet S, Varoquaux A, Penaranda G, Bannier M, Denizot A. Impact of autofluorescence-based identification of parathyroids during total thyroidectomy on postoperative hypocalcaemia: a before and after controlled study. *Surgery* 2018;163(1):23–30. doi:10.1016/j.surg.2017.06.022.
- [36] Benmiloud F, Godiris-Petit G, Gras R, Gillot JC, Turrin N, Penaranda G, et al. Association of autofluorescence-based detection of the parathyroid glands during total thyroidectomy with postoperative hypocalcaemia risk: results of the PARAFUO multicenter randomized clinical trial. *JAMA Surg* 2019. doi:10.1001/jamasurg.2019.4613.
- [37] McWade MA, Sanders ME, Broome JT, Solorzano CC, Mahadevan-Jansen A. Establishing the clinical utility of autofluorescence spectroscopy for parathyroid detection. *Surgery* 2016;159(1):193–202. doi:10.1016/j.surg.2015.06.047.
- [38] Kose E, Kahramangil B, Aydin H, Donmez M, Berber E. Heterogeneous and low-intensity parathyroid autofluorescence: patterns suggesting hyperfunction at parathyroid exploration. *Surgery* 2019;165(2):431–7. doi:10.1016/j.surg.2018.08.006.
- [39] Iacobone M, Scarpa M, Lumachi F, Favia G. Are frozen sections useful and cost-effective in the era of intraoperative qPTH assays? *Surgery* 2005;138(6):1159–64 discussion 64–5. doi:10.1016/j.surg.2005.05.026.
- [40] Solorzano CC, Thomas G, Baregamian N, Mahadevan-Jansen A. Detecting the near infrared autofluorescence of the human parathyroid: hype or opportunity? *Ann Surg* 2019. doi:10.1097/SLA.0000000000003700.

#### **4.8 Artigo VIII: Persistence of autofluorescence of parathyroid glands submitted to heat, freeze and formalin.**

Publicado em Archives of Clinical and experimental Surgery, 2020, Volume 9, Nº1, Páginas 18-21

Publicado online: 8 de Outubro de 2020

Licença CC-BY-NC-SA 4.0



## SHORT COMMUNICATION

Open Access

**Persistence of Autofluorescence of parathyroid glands submitted to heat, freeze and formalin**

Carlos Serra\*

Hospital do Sams, Lisboa, Portugal Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

**ABSTRACT**

Autofluorescence of parathyroid glands is a physical phenomenon of unknown cause that could have clinical impact for intraoperative identification of the glands. Persistence of Autofluorescence after cryopreservation and fixation in formalin was reported by other authors suggesting the robustness of the event. Information about persistence of Autofluorescence after heating, with the consequent protein denaturation is less documented in literature. In this work we analyze the intensity of Autofluorescence of five parathyroid samples submitted to heat, freeze and fixation in formalin. There was no significant difference on the intensity of Autofluorescence of parathyroid glands submitted to neither condition with p-values of 0.82 (heating), 0.075 (freezing) and 0.314 (fixation). Those results exclude the necessity of a chemical reaction as well as the need of the integrity of the secondary and tertiary protein structure for the occurrence of auto luorescence of parathyroid glands. The persistence of Autofluorescence after fixation in formalin facilitates further research in the area, avoiding the need for fresh samples, difficult to obtain and maintain.

**ARTICLE HISTORY**

Received: September 17, 2020

Accepted: October 1, 2020

Published: October 8, 2020

**KEYWORDS**Autofluorescence; Parathyroid;  
Near infrared**Introduction**

Autofluorescence of parathyroid glands when submitted to a 785 nm laser was described for the first time in 2011 by a group of investigators from Vanderbilt University emerging as a potential tool for helping surgeons on the identification of those glands [1]. Parathyroid glands (usually four) are localized in close proximity with the thyroid and their small size (5 mm to 7 mm) and color makes them difficult to distinguish from other cervical tissues like fat nodules, lymph nodes or even small thyroid nodules [2,3]. As the available tools for intraoperative identification of parathyroid glands are limited it still depends mainly of the experience and visual acuity of the surgeon. The initial study of Paras et al. demonstrated that after stimulation with a laser source of 785 nm parathyroid glands emit fluorescence with a peak on the 822 nm wavelength. Thyroid glands also emit fluorescence at the same wavelength, but its lower intensity allows an easy

discrimination from parathyroid. Fat and lymph nodes don't emit fluorescence [1]. Autofluorescence of parathyroid glands is a curious phenomenon as there were no known intrinsic fluorophores emitting at this wavelength [4,5]. The responsible fluorophore must exist in both parathyroid and thyroid, but in higher concentration on parathyroid, and be absent in other cervical tissue still remains unknown. Even though unknowing the source of Autofluorescence was not an obstacle to its clinical utilization, that knowledge could expand the applications of the phenomenon. Previous works stated that parathyroid Autofluorescence remains even after fixation of the tissue in formalin so excluding the need of a chemical reaction in vivo for the occurrence [6,7]. The persistence of Autofluorescence of a cryopreserved parathyroid was also reported by Moore et al. in a single case report [8]. These data suggest that Autofluorescence is a robust occurrence, persisting even after exposition to adverse conditions. The

Contact: Carlos Serra ✉ [caaserra@netcabo.pt](mailto:caaserra@netcabo.pt) 📍 Hospital do Sams, Lisboa, Portugal Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Copyrights: © 2020 The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial ShareAlike 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

Carlos Serra

possibility of Autofluorescence being caused by an enzymatic reaction may be excluded by its persistence after submission to a heat source. Heat causes protein denaturation disrupting hydrogen bonds and non-polar hydrophobic interactions thus affecting secondary and tertiary structures. The denaturation process is not strong enough to break peptic bonds so doesn't affect the primary structure (amino acid sequence) [9-14]. The persistence of Autofluorescence after freezing could have application for verification of cryopreserved tissue amenable to auto transplantation in cases of secondary hyperparathyroidism submitted to parathyroidectomy.

Formalin fixation is used for tissue preservation helping to maintain cellular architecture and composition of cells and allowing subsequent processing. Fixation also preserves the proteins, carbohydrate and other bio-active molecules in their spatial relationship to the cell, so that they can be studied [15,16]. In this work we analyze the persistence of Autofluorescence in fresh parathyroid samples submitted to heat, frozen and fixation with formalin. Being a preliminary work, the main objective was to confirm the persistence of Autofluorescence after extreme conditions without using the usual techniques for cryopreservation of tissues.

#### Methods

Five fresh samples of parathyroid adenomas were divided in 3 fragments (fragments A, B, C). After division all samples were observed through a night vision goggles coupled with 822 nm band pass filter while irradiated with a 780 nm LED with a 780 nm band pass filter and submitted to Heat (A), freeze (B) or fixation with 10% formalin (C). The system was coupled with a laptop personal computer through a USB video recording board and image software was used to record the images. Recorded Images were analyzed with Image J software U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Statistical analysis of data was made with IBM SPSS Statistics V.25 (IBM Corp. Released 2017. IBM Statistics for MacIntosh, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). For data with a normal distribution evaluated with Kolmogorov-Smirnov and Shapiro Wilk tests a parametric test was used (Student's t test and ANOVA). When normality was violated non-parametric tests were used (Kruskall Wallis

and Friedman). A level of significance of 0.05 was considered significant.

#### Heating

Fragments of group A were submitted to a temperature of 80° for 30 minutes through a Bio-Optica WB-100 I (Bio-Optica Sp, Milan, Italy) water bath and immediately observed with the near infrared device. 24 hours and 48 hours after heating tissues were observed again.

#### Freezing

Fragments of group B were frozen at 50° in an ultra-low temperature freezer Herafreeze HFU (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA) and observed with the device. They were defrosted after 30 days and observed. 24 hours after defrosting another observation was done.

#### Fixation

Fragments of group C were emerged in a solution of 10% neutral buffered formalin and observed after 48 hours and 180 days.

#### Results

##### Heating

Intensity of fluorescence (arbitrary values) measured by Image software are shown in (Table 1).

As normality conditions were not achieved ( $p < 0.05$  on Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-wilk tests) for values collected 24 hours after heating Friedman test was used. There were no significant differences between groups (Friedman Test value 1.125)  $p = 0.818$ .

##### Freezing

Intensity of fluorescence (arbitrary values) measured by image J software are shown in (Table 2).

The normal distribution of data allowed the utilization of a parametric test (ANOVA for repeated measures).

No significant difference was obtained between groups ( $F = 2.959$ )  $P = 0.075$

**Fixation**

Intensity of fluorescence (arbitrary values) measured by image J software are shown in (Table 3). Data had a normal distribution allowing utilization of ANOVA test for repeated measures. There was also no significant difference between groups (F=1.345) p=0.314. No Post Hoc comparisons were done were done since there were no differences between groups.

	Before heating	After heating	24 hours	48 hours
1	247	249	247	249
2	246	253	247	247
3	246	245	249	247
4	247	246	248	246
5	249	247	249	249
Mean (sd)	247,6 (1.34)	248 (3.16)	248.2 (1.10)	247.6 (1.34)

**Table 1.** Intensity of Autofluorescence of Heated Parathyroid Glands

	Before freezing	After freezing	After Defrost	48 Hours
1	247	213	247	247
2	246	243	246	247
3	247	249	249	245
4	246	238	245	245
5	248	237	248	248
Mean (Sd)	246.8 (0.84)	236.0 (13.71)	247.0 (1.58)	246.0 (1.34)

**Table 2.** Intensity of Autofluorescence of Frozen Parathyroid Glands

	Before fixation	48 Hours after	180 days
1	247	246	245
2	246	246	247
3	247	247	248
4	248	243	246
5	248	247	245
Mean (sd)	246.2 (0.84)	245.8 (1.64)	246.2 (1.30)

**Table 3.** Intensity of Autofluorescence of Parathyroid glands Fixed in Formalin

**Discussion**

The results of this work reinforce the robustness of parathyroid glands Autofluorescence. In fact, persistence of Autofluorescence after exposition to extreme conditions excludes the need for any kind of chemical reaction for its occurrence as it would have been affected by the heat. The phenomenon is also independent of the maintenance of the aeroespacial arrangement of the proteins since modification of the secondary and tertiary structure doesn't affect it. Those results confirmed that the probable responsibility initially assigned to the Calcium Sensing receptors or to Vitamin D receptors can almost be excluded [4]. The values obtained after freezing and defrosting also confirmed the results of Moore et al. that described the persistence of Autofluorescence in a case of cryopreserved gland [8]. Even though we hadn't used the methodology of cryopreservation, the preservation of Autofluorescence for a long period of time was well documented. The small size of and the nature of sample, composed only of parathyroid adenoma fragments, don't analyzing normal parathyroid tissue, unavailable for ethical reasons, is a strong bias of this study in spite of being almost consensual that the intensity of Autofluorescence of normal parathyroid is higher than the Autofluorescence of abnormal tissue [17]. The persistence of Autofluorescence after cryopreservation opens a field of research on the relation of the intensity of the fluorescence and the viability of the transplanted glands that could have clinical application. That research is however very difficult to build since few surgical centers all over the world have significant auto transplantation casuistic. Our study could also confirm the initial observation of Kim et al. of the persistence of Autofluorescence after fixation in formalin [7]. That observation, although without clinical impact, could be important for the development of new devices decreasing the dependence of fresh parathyroid tissue that is always difficult to obtain and maintain allowing research with conserved tissues, easier to achieve, with the same accuracy.

**Acknowledgments**

The author wants to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito from the Department of Pathology of Hospital do SAMS for their collaboration in the collection of the samples.

**References**

1. Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen

Carlos Serra

- A. Near-infrared Autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 2011;16(6).
2. Policeni BA, Smoker WRK, Reede DL. Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Sem Ultr sou CT MR* 2012;33(2):104-14.
  3. Melo C, Pinheiro S, Carvalho L, Bernardes A. Identification of parathyroid glands: anatomical study and surgical implications. *Surg Radiol Anat* 2015;37(2):161-5.
  4. McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surg* 2013;154(6):1371-7.
  5. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. In Springer 2006;954.
  6. De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Lakhdar AB, et al. Intraoperative near-infrared imaging for parathyroid gland identification by auto-fluorescence: a feasibility study. *World J surg* 2016;40(9):2131-8.
  7. Kim SW, Lee HS, Lee KD. Intraoperative real-time localization of parathyroid gland with near infrared fluorescence imaging. *Gland surg* 2017;6(5):516-524.
  8. Moore EC, Rudin A, Alameh A, Berber E. Near-infrared imaging in re-operative parathyroid surgery: first description of Autofluorescence from cryopreserved parathyroid glands. *Gland Surg* 2019;8(3):283-6.
  9. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Lehninger principles of biochemistry. Seventh edn. New York, NY Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education; 2017.
  10. Daniel RM, Dines M, Petach HH. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem J* 1996;317(1):1-11.
  11. Tanford C. Protein Denaturation. In: Anfinsen CB, Anson ML, Edsall JT, Richards FM, editors. *Adv Pro Chem*. Academic Press 1968;121-282.
  12. Tanford C. Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv ProChem* 1970;24:1-95.
  13. Fágáin CO. Understanding and increasing protein stability. *Biochi biophys act*. 1995;1252(1):1-14.
  14. Bensaude O, Bellier S, Dubois MF, Giannoni F, Nguyen VT. Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. *Exs* 1996;77:199-219.
  15. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Max Pathol* 2012;16(3):400-5.
  16. Hewitson TD, Wigg B, Becker GJ. Tissue preparation for histochemistry: Fixation, embedding, and antigen retrieval for light microscopy. *Methods Mol Biol* 2010;611:3-18.
  17. Solorzano CC, Thomas G, Baregamian N, Mahadevan-Jansen A. Detecting the Near Infrared Autofluorescence of the Human Parathyroid: Hype or Opportunity? *Ann Surg* 2019.

**4.9 Artigo IX: Spectroscopic analysis of parathyroid and thyroid tissues by Ground-State diffuse reflectance and Laser Induced Luminescence: A preliminary report.**

Publicado em Journal of Fluorescence , 2021, Volume 31, páginas 1235-1239

Publicado online: 20 de Julho de 2021

Reproduzido sob autorização Springer Nature



## Spectroscopic Analysis of Parathyroid and Thyroid Tissues by Ground-State diffuse Reflectance and Laser Induced Luminescence: a Preliminary Report

Carlos Serra<sup>1,2</sup> · João Serra<sup>3,4</sup> · Isabel L. Ferreira Machado<sup>5,6</sup> · Luís F. Vieira Ferreira<sup>6</sup>

Received: 23 March 2021 / Accepted: 13 July 2021 / Published online: 20 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Intraoperative discrimination of thyroid and parathyroid tissues is fundamental in thyroid surgery. Recent fluorescence studies have shown stronger NIR emission in parathyroid tissue than in thyroid tissue, presenting a potential avenue for the development of a tool for surgical assistance. However, the fluorophore responsible for this emission has not yet been identified. In this work, spectroscopic analysis was performed to ascertain the origin of the emission peaks in parathyroid tissue. Ground-state diffuse reflectance (GSDR) absorption spectroscopy and laser-induced luminescence (LIL) emission spectroscopy were performed in parathyroid, thyroid, and fatty tissue samples and the resulting spectra were compared with the peaks of known fluorophores to identify the origin of each peak. The spectra of the different tissue types were also compared in order to evaluate the wavelength which presents the highest parathyroid emission relative to the emission of the surrounding tissues, representing the ideal wavelength for parathyroid detection. An emission peak in these conditions was observed for both thyroid and parathyroid tissue at 711 nm, with a higher intensity in parathyroid sample, making it suitable for detection applications. These results show a potential avenue for the development of a system allowing parathyroid detection in a surgical setting.

**Keywords** Parathyroid · Thyroid · Autofluorescence · Ground-state diffuse reflectance · Laser induced luminescence

### Introduction

Intraoperative identification of parathyroid glands during thyroid or parathyroid surgery is always a complex task for surgeons, as the small size, color and shape of these glands

makes difficult their discrimination from lymph nodes and cervical fat, and highly dependent on the surgeon's experience [1].

In 2011 investigators from Vanderbilt University [2] described autofluorescence of parathyroid glands with maximum emission at 822 nm when submitted to a 795 nm laser beam. Even though thyroid gland also emits fluorescence at the same wavelength, its lower intensity allows their discrimination from parathyroid. That revelation was received with expectations by endocrine surgeons since it could be used for the development of devices for intraoperative utilization. Other authors confirmed the initial findings of Paras et al., and several devices were described [1, 3–7].

The origin of parathyroid glands near infrared autofluorescence at 822 nm is still unknown. No natural fluorophores are known at that wavelength. The responsible fluorophore must exist in thyroid and parathyroid, with higher concentration in parathyroid and be absent in other cervical tissues. Some possible responsible fluorophores that fit the conditions, such as the Calcium Sensing receptors and the Vitamin D receptors, were discarded by previous works [8].

✉ Carlos Serra  
caaserra@me.com

<sup>1</sup> Hospital Dos Sams, 1849-017 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores – Microsistemas e Nanotecnologias (INESC MN), Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-0011 Lisboa, Portugal

<sup>5</sup> Polytechnic Institute of Portalegre, 7300-110 Portalegre, Portugal

<sup>6</sup> BSIRG, Biospectroscopy and Interfaces Research Group From IBB-Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal

In this work, thyroid and parathyroid tissues were analyzed by ground-state diffuse reflectance (GSDR) absorption spectroscopy and laser-induced luminescence (LIL) emission spectroscopy, in order to obtain experimental information leading to the responsible fluorophore. The absorption and emission spectra of parathyroid and thyroid tissue were also compared to identify other wavelengths that can allow better discrimination between tissues.

## Materials and Methods

Thyroid, parathyroid and fat tissue samples were acquired from clinical patients during surgeries for multinodular goiter (thyroid) and parathyroid adenoma (parathyroid and fat). Tissues were conserved in formaldehyde to prevent tissue degradation.

GSDR and LIL spectra were acquired at the Surface Photochemistry Laboratory, from the Surface Photochemistry Group from BSIRG, at Instituto Superior Técnico.

Ground-state absorption spectra of solid opaque samples can experimentally be obtained using a procedure similar to the one used to perform absorption spectra from transparent samples. In the latter case one has to use Beer Lambert's law to determine absorbance as a function of wavelength and in the case of the solid samples the reflectance ( $R$ ) should be determined as a function of the wavelength, following an initial calibration of the apparatus with an ideal diffuser. Typically, Spectralon, pure barium sulphate or magnesium oxide can be used as ideal diffusers since these compounds exhibit  $R \sim 0.98$  in the wavelength range from 200 to 900 nm.

The ground state diffuse reflectance technique allows the determination of the solid samples reflectance as a function of the wavelength. The Kubelka and Munk theory established that, for an ideal diffuser and optically thick samples, (all those where a further increase in thickness does change the reflectance of the sample),  $R$  is related to  $K$  and  $S$  ( $K$  is the absorption coefficient, and  $S$  the dispersion coefficient) by the remission function,  $F(R)$ .

$$F(R) = (1 - R)^2 \cdot / (2R) = K/S.$$

and.

$$K(\lambda) = 2 \cdot \varepsilon \cdot (\lambda) \cdot C.$$

In the last equation  $\varepsilon$  is the naperian coefficient for absorption and  $C$  is the concentration of the absorbing species and the factor two takes into account the average increase of distance travelled by the excitation light inside the ideal diffuser. The remission function varies linearly with the number of absorbing chromophores in the solid sample, which are considered as being uniformly distributed.

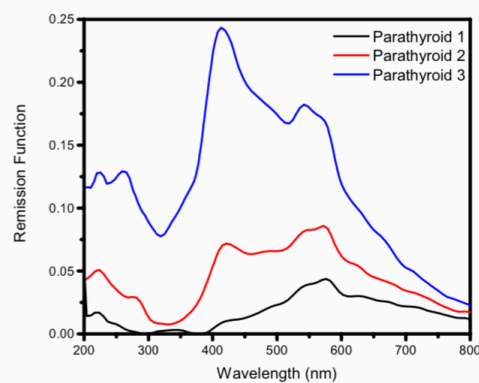
GSDR was performed using a homemade setup containing a 250 W W-Hal lamp as monitoring lamp. A fixed monochromator (Oriel, FICS 77,441) coupled to an ICCD detector (Andor, i-Star 720) with time gate capabilities, in accumulation mode, was used to detect the reflectance signals. The signals were collected by a collimating beam probe coupled to an optical fibre (fused silica) in this way assuring the connection to the monochromator entrance. The reflectance  $R$  is obtained for each sample and the remission function is calculated using the Kubelka–Munk equation for optically thick samples,  $F(R) = (1 - R)^2 / 2R$ .

Further details of the use of this absorption spectroscopic technique can be found in [9–12]. The absorption spectra of parathyroid, thyroid and fatty tissue from human subjects have been acquired in the range between 200 and 800 nm with the use of this technique.

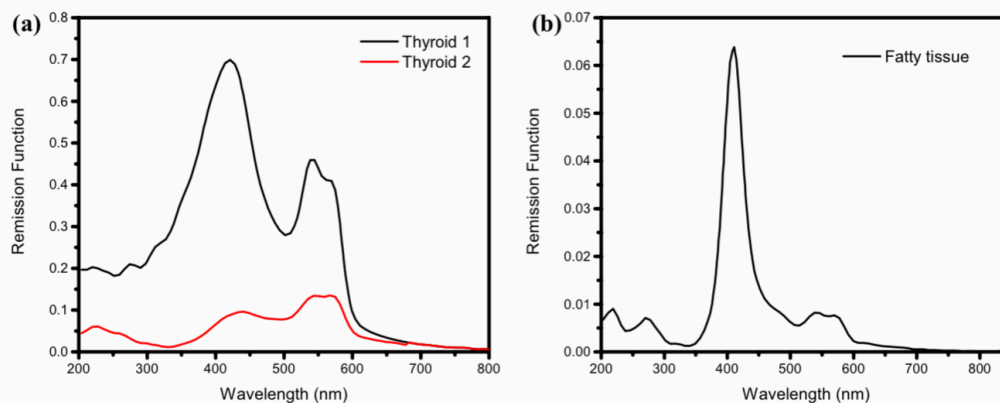
LIL studies were performed using again the i-Star 720 ICCD (with a minimum temporal gate of 2.2 ns), with  $1024 \times 128$  pixels in a maximum spectral range of 200 to about 900 nm and also with a Andor i-Dus in the near infrared (NIR) spectral range (700 to 1700 nm). Cut-off filters at 695 nm and 850 nm were used to attenuate the signal from the excitation wavelength. Laser sources with wavelengths of 650 nm and 785 nm were used to excite the sample. The acquisition setups are fully described in [9–12].

## Results

Figure 1 shows the absorption spectra of 3 parathyroid samples acquired using GSDR between 200 and 800 nm. The main absorption peaks are visible at 220 nm, 275 nm, 411 nm, 545 nm and 580 nm. All three samples show peaks in the same wavelengths, with the only significant difference



**Fig. 1** Absorption spectrum of parathyroid samples acquired using GSDR



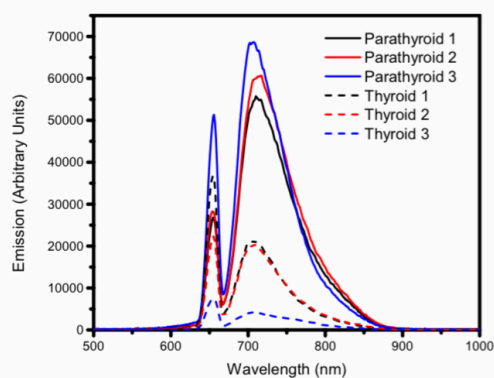
**Fig. 2** Absorption spectra of different tissues acquired using GSDR. (a) Thyroid; (b) Fatty tissue

being the relative amplitude of each peak between different samples. Spectra of thyroid, and fatty tissue samples have also been acquired between 200 and 800 nm (Fig. 2).

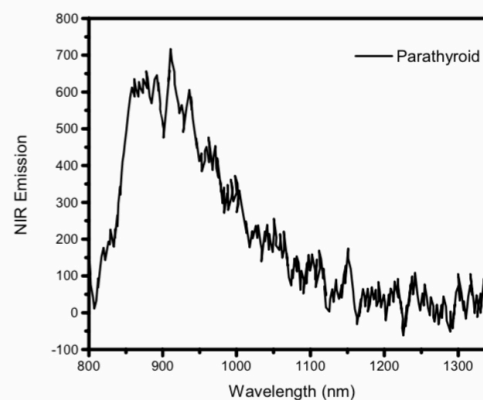
Clearly, the absorption spectrum of the 3 parathyroid samples also evidence absorption of the fatty tissue (maximum absorption at 411 nm). The main point to stress is the absorption tail that exists in the 600 nm to 850 nm spectral range which is clearly absent in the thyroid and fatty tissue samples, where a cut-off of exists at about 600 nm. This important absorption that reaches the NIR spectral range is assigned by us as a characteristic absorption of the parathyroid tissue.

The emission spectra of thyroid and parathyroid tissue were also acquired with an excitation wavelength of 650 nm and a cut-off filter at 695 nm, in order to identify

other fluorescent peaks that can provide a better contrast between the two types of tissue. By choosing an excitation of 650 nm, located after the cut-off of the thyroid or fatty tissue, we excite predominantly the parathyroid tissue, aiming to observe the specific emission spectra of this tissue. All these spectra are represented in Fig. 3. Both thyroid and parathyroid spectra show a single peak at 711 nm. Taking into the account the average of the 3 thyroid acquisitions and the 3 parathyroid acquisitions, the peak intensity was found to be  $2.77 \pm 0.21$  times higher in the parathyroid samples than in thyroid samples. This significantly higher emission in parathyroid tissue can be potentially used in a surgical setting for tissue discrimination.



**Fig 3** Emission spectra of thyroid and parathyroid samples with excitation at 650 nm. The peak at 650 nm corresponds to the incident laser, which was not fully attenuated by the cut-off filter at 695 nm



**Fig 4** NIR emission spectrum of parathyroid samples acquired by LIL. Excitation at 785 nm with a cut-off filter at 850 nm

The NIR emission of the parathyroid sample was also acquired using the i-Dus detector, now with an excitation wavelength of 785 nm and a cut-off filter of 850 nm (spectrum presented in Fig. 4). A long tail in the NIR spectral region could now be observed, due the high sensitivity of this detector in the NIR range. This tail is obviously not detected with the use of the i-Star ICCD, because this one only operates until about 850 nm.

## Discussion

Parathyroid shows absorption peaks at 220 nm, 275 nm, 411 nm, 545 nm and 580 nm (Fig. 1). In literature, peaks at 545 nm and 580 nm have only been observed in malignant tissue [13].

The absorption peak at 275 nm has been theorized to originate due to the presence of collagen, elastin and tryptophan [14, 15].

The absorption band between 400 and 600 nm, present in all tissue types, has been attributed to the presence of hemoglobin in the analysed tissue [16], with the most intense peak at 411 nm also being in the emission range of several chromophores, such as protoporphyrin and FAD (flavin adenine dinucleotide) [13], which are present in all types of analysed tissue.

The NIR emission of parathyroid tissue (Fig. 4) with excitation at 785 nm is dominated by a peak at 910 nm, which is simply due to the used cut-off filter. References to a very intense peak at around 825 nm are found in literature [1–3], which also may be may accounted for the acquired peak after attenuation by the cut-off filters under use. The emission peak observed by us at 711 nm is present in both thyroid and parathyroid tissue. However, a significant higher intensity was observed in the case of the parathyroid tissue, hinting that a single chromophore present in both types of tissue with a higher concentration in parathyroid tissue is responsible for this peak [1], as Fig. 3 clearly shows.

With excitation at 650 nm (Fig. 3), a single peak is observed in the emission spectra of both thyroid and parathyroid tissue (at 711 nm), which has previously been attributed to the presence of protoporphyrin [15]. The significantly higher intensity of this peak in the parathyroid tissue presents a potential avenue for a future technique for optical distinction between the different types of tissue in surgery.

## Conclusions

The origin of the NIR emission of parathyroid tissue reported in literature has not been identified fully, although experimental data point to a protoporphyrin luminescence. The experiments performed using both LIL and GSDR

in the considered ranges have not been sufficient to fully determine the chromophore responsible for increased emission in parathyroid tissue when compared to thyroid samples. The presence of collagen, elastin and tryptophan in higher concentrations in parathyroid tissue may also be an evidence of the contribution of these chromophores to the higher emission intensity in parathyroid.

An emission peak at 711 nm was obtained when using an excitation wavelength of 650 nm, with a stronger intensity for parathyroid tissue than thyroid tissue. These results provide an alternative wavelength to be used for surgical guidance with excitation in the visible range. If adapted to a surgical setting, this would allow the surgeon to visualize and aim the excitation light source during surgery with only the operator's vision, with complex imaging equipment being required only for the visualization of the induced fluorescence and not to visualize the excitation beam.

**Acknowledgements** The authors want to thank Drs. Paula Guerra Marques, Sara Turpin and Delfina Brito from the Pathology Department of Hospital dos Sams for their collaboration on the collection of samples.

João Serra acknowledges financial support from FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia ( grant SFRH/BD/145160/2019)

**Authors Contributions** Study conception and design: CS, JS, ILFM, LFVF. Acquisition of data: CS, JS, ILFM, LFVF. Analysis and interpretation of data: CS, JS, ILFM, LFVF. Drafting of the manuscript: CS, JS. Critical revision of the manuscript: ILFM, LFVF. All authors read and approved this manuscript.

**Funding** No funding was received for this work.

**Data Availability** Data available on request.

## Declarations

**Ethics Approval** Collection of samples was authorized by Ethics Committee of Hospital dos SAMS (approval 002/2018).

**Conflicts of Interest** Nothing to declare.

## References

1. McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT (2013) A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. *Surg* 154(6):1371–1377
2. Paras C, Keller M, Mahadevan-Jansen A, White L, Phay J (2011) Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. *J Biomed Opt* 16(6):067012
3. Petersson P (2015) Tissue identification for thyroid and parathyroid surgery: using optical coherence tomography and fluorescence spectroscopy. Linköping University
4. Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R (2016) Cutting Edge in Thyroid Surgery: Autofluorescence of Parathyroid Glands. *J Am Coll Surg* 223:374

5. Kim SW, Song SH, Lee HS, Noh WJ, Oak C, Ahn YC, Lee KD (2016) Intraoperative Real-Time Localization of Normal Parathyroid Glands with Autofluorescence Imaging. *J Clin Endocrinol Metab* 101:4646
6. Ladurner, R, Al Arabi N, Guendogar U, Hallfeldt KK J, Stepp H, Gallwas JKS (2017) Near-infrared autofluorescence imaging to detect parathyroid glands in thyroid surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 100(1):33-36
7. De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Lakhdar AB, Hartl D (2016) Intraoperative near-infrared imaging for parathyroid gland identification by auto-fluorescence: A feasibility study. *World J Surg* 40(9):2131–2138
8. Thomas G, McWade MA, Sanders ME, Solórzano CC, McDonald WH, Mahadevan-Jansen A (2016) Identifying the novel endogenous near-infrared fluorophore within parathyroid and other endocrine tissues. In *Optics* (pp. PTu3A-5). Optical Society of America
9. Ferreira DP, Conceição DS, Fernandes F, Sousa T, Calhelha RC, Ferreira IC, Vieira Ferreira, LF (2016). Characterization of a squaraine/chitosan system for photodynamic therapy of cancer. *J Phys Chem B* 120(7):1212–1220
10. Vieira Ferreira LF, Ferreira Machado IL (2007) Surface photochemistry: Organic molecules within nanocavities of calixarenes. *Curr Drug Technol* 4(4):229–245
11. Vieira Ferreira LF, Ferreira Machado IL, Gama A, Lochte F, Socoteanu RP, Boscencu R (2020) Surface photochemical studies of nano-hybrids of A3B porphyrins and Fe3O4 silica-coated nanoparticles. *J Photochem Photobiol A Chem* 387:112152
12. Boscencu R, Socoteanu RP, Manda G, Radulea N, Anastasescu M, Gama A, Ferreira Machado IL, Vieira Ferreira LF (2019) New A3B porphyrins as potential candidates for theranostic. Synthesis and photochemical behaviour. *Dyes Pigment* 160:410–417
13. Brandao MP, Iwakura R, Honorato-Sobrinho AA, Haleplian K, Ito AS, De Freitas LCC, Bachmann L (2016) Optical Characterization of Parathyroid Tissues. *Appl Spectrosc* 70:1709
14. Bachmann L, Zezell DM, Ribeiro ADC, Gomes L, Ito AS (2006) Fluorescence spectroscopy of biological tissues - a review. *Appl Spectrosc Rev* 41(6):575–590
15. Brandao MP, Iwakura R, Basilio FS, Haleplian K, Ito AS, De Freitas LCC, Bachmann L (2015) Optical Characterization of Normal, Benign, and Malignant Thyroid Tissue: A Pilot Study. *J Fluoresc* 25:465
16. Berezin MY, Achilefu S (2010) Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem Rev* 110:2641

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Capítulo 5

### Discussão

Numa era de grandes avanços tecnológicos, em que quase diariamente são apresentados novos dispositivos que tendem a tornar mais seguras a atividade médica em geral e a cirurgia em particular, a identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias continua a depender quase exclusivamente da acuidade visual e da experiência do cirurgião.

Com efeito, apesar de existirem meios complementares de diagnóstico de utilização alargada, aplicáveis à patologia tiroideia e paratiroideia, não são, de modo geral, passíveis de utilização intraoperatória ou dependem da injeção de substâncias extrínsecas, algumas das quais associadas a reações adversas não negligenciáveis [108, 109, 143, 144].

A identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias tem sido apontada desde há longo tempo como fundamental para a sua preservação, minimizando o risco de hipoparatiroidismo pós-operatório e da consequente hipocalcemia, importante causa de morbidade após tireoidectomia total e de litígio médico-legal. O hipoparatiroidismo também está associado a um significativo aumento da mortalidade [3, 30, 145, 146].

A disparidade dos valores reportados na literatura, variando entre 20 e 65 % para a hipocalcemia transitória (definida como hipocalcemia até aos seis meses pós-operatórios) e entre 1 e 7,9 % para a hipocalcemia permanente (definida como a que persiste mais de seis meses após cirurgia), reflete a falta de uniformidade no modo e tempo de recolha dos dados [3, 4, 6, 8, 147].

O viés de publicação pode fazer com que a realidade seja ainda mais grave, já que quase todos os estudos são provenientes de centros com casuísticas elevadas, em que reconhecidamente, as taxas de complicações são inferiores, não refletindo todo o universo cirúrgico [10, 11].

Apesar da associação entre maior taxa de complicações e menor casuística, razões de ordem prática fazem com que a maioria das cirurgias da tiroide e paratiroide, continuem nos nossos dias a ser praticadas por cirurgiões com casuísticas reduzidas (nos Estados Unidos da América, cerca de 50 % das tireoidectomias totais são efetuadas por cirurgiões que operam menos de três por ano) [101, 148, 149].

A descrição da autofluorescência das glândulas paratiroideias em 2011, por um grupo de Investigadores da Universidade de Vanderbilt foi acolhida com entusiasmo pela comunidade cirúrgica, pela mais-valia potencial que poderia representar para a identificação intraoperatória das mesmas [12].

A- Avaliação dos efeitos da estimulação luminosa no desenvolvimento ponderal, secreção hormonal, estrutura e ultraestrutura.

A utilização de estimulação luminosa para desencadear a autofluorescência colocou-nos perante a dúvida da sua inocuidade. Apesar da radiação infravermelho próximo não ter efeitos ionizantes nocivos para os tecidos, a especificidade funcional dos tecidos secretores poderia levar a que a exposição a uma fonte de luz, mesmo que de baixa intensidade, promovesse alterações no padrão de secreção, cuja magnitude era importante esclarecer.

Ao avaliarmos, em modelo animal, a influência da estimulação infravermelho próximo no padrão de secreção tiroideia e paratiroideia tivemos oportunidade de estudar também a sua ação na variação ponderal, de que não existiam referências na literatura.

Os resultados obtidos neste trabalho não mostraram alterações estatisticamente significativas na variação de peso dos animais.

A avaliação da função paratiroideia, que estava inicialmente previsto ser efetuada por doseamentos de PTH nos vários tempos do estudo, teve de ser efetuada de forma indireta pelos doseamentos de cálcio, pois todas as determinações de PTH mostraram valores abaixo do limiar de deteção do sistema utilizado.

As alterações detetadas nos valores de cálcio aos 30 dias não se mantiveram aos 60 dias, assumindo-se escassa a influência da estimulação luminosa nos níveis de cálcio.

Também a repercussão na função tiroideia foi limitada, sendo os resultados concordantes com a maioria dos trabalhos publicados [150-155].

A principal limitação deste estudo estará na baixa potência do mesmo. O cálculo da dimensão da amostra, essencial para a aprovação do projeto pela DGAV, baseou-se na informação fornecida com o kit de reagentes para determinação de PTH, que se revelou inadequado ao modelo utilizado, não sendo possível, por imperativos legais, utilizar mais animais.

Os resultados obtidos parecem, contudo, ser suficientemente robustos para confirmar a inocuidade da utilização da autofluorescência nas condições que permitem a identificação das paratiroides no padrão de desenvolvimento ponderal e de secreção hormonal, sendo este o primeiro trabalho desenvolvido neste campo.

Este trabalho foi completado pela comparação dos padrões estruturais e ultraestruturais de paratiroides irradiadas e não irradiadas, utilizando o mesmo modelo animal.

A avaliação por histologia convencional com coloração de hematoxilina-eosina não mostrou alterações no padrão estrutural das glândulas paratiroideias ou da glândula tiroideia do rato, situação expectável face à pequena quantidade de energia usada para a estimulação luminosa.

Também a avaliação ultraestrutural por microscopia eletrónica não revelou diferenças entre as glândulas paratiroideias irradiadas e não irradiadas, nomeadamente, em relação às

características nucleares, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e grânulos de secreção.

#### B- Dispositivo para identificação intraoperatória por autofluorescência de infravermelho próximo das glândulas paratiroideias

O estudo inicial de Paras e cols utilizava para detecção das paratiroides um sistema baseado em contagens espectrais, não permitindo a visualização intraoperatória das glândulas [12]. Sendo a visualização em tempo real das estruturas uma mais-valia para a atividade cirúrgica, vários grupos iniciaram estudos com vista à utilização da autofluorescência para obtenção de uma imagem intraoperatória, baseados na adaptação de sistemas previamente existentes, concebidos para outras cirurgias ou concebendo novos dispositivos [142, 156-158].

Sendo a autofluorescência das paratiroides um fenómeno ótico, a grande dificuldade para a obtenção de uma imagem está na pequena margem existente entre o comprimento de onda utilizado para excitação (785 nm) e o comprimento de onda da autofluorescência captada (822 nm), que obriga à utilização de filtros de banda muito estreita, pois de outra forma a luz incidente saturaria a imagem, impedindo a visualização da luz emitida.

A nossa investigação inicial replicou os trabalhos de Kim e cols, com a utilização de uma câmara fotográfica digital, modificada através remoção do filtro de infravermelho que equipa este tipo de câmaras e posterior acoplagem de filtro de emissão [142].

Esta solução, embora eficaz *in vitro* não nos permitiu a obtenção de imagens intraoperatórias satisfatórias, pela dificuldade na focagem, necessidade de utilização de um tripé para estabilização da imagem e impossibilidade de variação da distância focal.

Outro inconveniente deste sistema está na inexistência de máquinas fotográficas sem filtro de infravermelhos incorporado disponíveis comercialmente, sendo necessária a remoção manual do filtro, operação morosa e efetuada apenas em centros especializados, com custo elevado que acarreta riscos de dano permanente na máquina e pode ter repercussão nas suas capacidades de focagem e aquisição de imagem.

Face às dificuldades encontradas, optámos pela utilização de um sistema de visão noturna (*goggles*) a que acoplámos um filtro de emissão de 832 nm (+/- 28 nm), que só permite a visualização de luz entre 804 e 860 nm [159].

Este sistema, por inerência das funções para que foi concebido, não tem filtro de infravermelho incorporado, não sendo necessário alterar a sua estrutura original, sendo a acoplagem do filtro efetuada à frente da objetiva.

Sendo um dispositivo de grande amplitude focal, a focagem para pequenas distâncias continuou a ser um dos principais inconvenientes do sistema, sendo, contudo, a sua portabilidade uma vantagem apreciável.

Os testes iniciais efetuados *in vitro* confirmaram a boa capacidade discriminativa do dispositivo na distinção entre tiroide, paratiroide e gordura cervical.

A ausência de amostras de tecido paratiroideu normal é o principal viés deste estudo, pois imperativos éticos tornam impossível a obtenção de amostras frescas de paratiroide.

Apontando os dados presentes na literatura para uma intensidade de autofluorescência maior em paratiroides normais face às paratiroides patológicas, fica reforçada a capacidade discriminativa do sistema [138, 160].

Durante o decurso deste projeto surgiram no mercado dois dispositivos para identificação intraoperatória das paratiroides: Fluobeam (Fluoroptics, Grenoble, França) e PT-eye (Medtronic, Minneapolis, MN, Estados Unidos da América), resultando o primeiro, da adaptação de um dispositivo já existente para a deteção de fluorescência por verde de indocianina, e o segundo, do aperfeiçoamento do sistema utilizado pelos investigadores da Universidade de Vanderbilt.

Enquanto o sistema Fluobeam permite a visualização direta das paratiroides, o sistema PT-eye proporciona apenas uma informação quantitativa de contagens de fluorescência [160]. Ambos os dispositivos têm preços muito elevados, dificilmente comportáveis por hospitais e cirurgiões com baixo volume de cirurgias da tiroide e paratiroide, potencialmente os maiores beneficiários da sua utilização.

Apesar da habitual diminuição do preço ocorrida após o lançamento, ambos os dispositivos custam atualmente mais de 40.000 \$, a que crescem no caso do PT-eye os custos da fibra ótica de uso único (cerca de 400 \$).

O sistema por nós desenvolvido tem um preço que não ultrapassa os 3000 €, o que o torna mais acessível à generalidade dos hospitais.

Sendo de utilização mais difícil que os sistemas comercialmente disponíveis e eventualmente de eficácia ligeiramente menor, situação que só um futuro estudo comparativo poderá documentar, o seu custo muito menor poderá compensar estes inconvenientes.

#### C- Aplicação da autofluorescência em cirurgias da tiroide e paratiroide.

As aplicações da autofluorescência das paratiroides em cirurgia tiroideia e paratiroideia são fundamentalmente três [117, 160, 161]:

- Auxílio na identificação de glândulas paratiroideias inadvertidamente removidas durante a cirurgia de ressecção da tiroide;
- Auxílio na identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias, em cirurgia do hiperparatiroidismo, para a sua excisão;

- Auxílio na identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias em cirurgia de ressecção da tireoide para a sua preservação *in situ*.

Os trabalhos desenvolvidos neste projeto tiveram em vista a validação destas aplicações, para a generalização da sua utilização clínica, permitindo assim a melhoria da qualidade do ato cirúrgico.

O estudo efetuado com a utilização da autofluorescência para inspeção das peças operatórias de tireoidectomia e identificação de glândulas paratiroideias incidentalmente removidas, tendo na sua essência confirmado a utilidade do método, levantou algumas questões, que deverão ser objeto de reflexão e eventuais estudos complementares.

Com efeito, se a especificidade e sensibilidade do método são significativamente elevados, não existiu correlação entre a presença de fragmentos de tecido paratiroideu na peça operatória e a ocorrência de hipocalcemia pós-operatória.

A explicação mais óbvia para esse facto parece-me estar na definição de paratiroidectomia incidental utilizada, que considerou como tal a presença de qualquer quantidade de tecido paratiroideu na peça operatória. Sendo na maioria dos casos essa quantidade escassa, mantendo-se a maior parte da glândula *in situ*, esse tecido representará pouco mais que o equivalente a uma pequena biópsia da glândula, sem repercussão funcional, conforme também sugerido por De Leeuwe e cols [158].

Tal observação reforça o papel do cirurgião na avaliação dos tecidos autofluorescentes e na definição da necessidade de autotransplante dos mesmos, sendo fatores a considerar o número de glândulas identificadas *in situ* durante o ato cirúrgico e a sua cor (marcador indireto de vascularização), conjugados com o número de fragmentos de paratiroide encontrados na peça operatória inspecionada, bem como o seu volume relativo [160].

Outra observação potencialmente relevante foi a constatação da existência de casos de hipocalcemia transitória em pacientes submetidos a hemitiroidectomias, em que, por definição, duas das glândulas paratiroideias não foram perturbadas.

A hipótese de a cada momento a função paratiroideia depender apenas de uma ou duas paratiroides, estando as outras “adormecidas” terá de ser considerada, podendo abrir um novo e interessante campo de estudo.

Uma potencial vantagem da aplicação da autofluorescência, na inspeção das peças operatórias, é a possibilidade de substituição do exame extemporâneo por cortes de congelação, técnica a que muitos cirurgiões recorrem com frequência para confirmação da natureza de tecidos suspeitos.

O exame extemporâneo, cuja eficácia é inquestionável, tem associados custos não desprezíveis, mobilizando recursos humanos (técnico de anatomia patológica e médico patologista) e materiais e levando a um aumento significativo do tempo operatório, bem

como em muitos casos a uma perturbação da atividade regular dos Serviços de Anatomia Patológica.

A utilização da autofluorescência permite ao próprio cirurgião o exame imediato da peça operatória, obviando os custos acima referidos, realizando uma verdadeira “biópsia ótica” em tempo real, com a mesma fiabilidade do exame histológico.

A capacidade de penetração tecidual da radiação infravermelha próximo que não ultrapassa os 5-7 mm é uma das limitações da técnica, admitindo-se que algumas paratiroides intratiroideias possam não ser detetadas, originando falsos negativos, situação difícil de contornar [160, 162].

Sendo as verdadeiras paratiroides intraparenquimatosas muito raras, esta limitação não deverá ter um impacto significativo, pois a generalidade das glândulas paratiroideias intracapsulares é passível de identificação com a utilização da autofluorescência.

A ocorrência de falsos positivos, descrita na literatura associada a nódulos coloides e tecido adiposo castanho não constitui um verdadeiro problema, pois ambos apresentam de uma forma geral um especto típico que não passa despercebido à inspeção visual pelo cirurgião [160].

A possibilidade de alguns gânglios linfáticos metastáticos poderem emitir autofluorescência, de que existem escassos relatos na literatura, constitui um problema maior, a justificar investigação [160].

A utilização da autofluorescência em cirurgia do hiperparatiroidismo merece também algumas considerações.

No estudo desenvolvido optei por incluir apenas casos em que os exames de localização efetuados no pré-operatório (cintigrafia com Sestamibi e ecografia cervical) não foram concordantes, situação em que potencialmente a utilidade do método será mais evidente.

Nos casos de concordância entre os exames, utilizo habitualmente uma abordagem focalizada, unilateral, com uma incisão cutânea que não ultrapassa os 2 cm.

Esta pequena incisão torna difícil a focagem do dispositivo de captação utilizado, pelo que nesses casos passei a reservar a sua utilização para a confirmação da natureza do tecido excisado, conforme referido anteriormente.

A utilização nos casos de não concordância dos exames pré-operatórios, em que se torna necessário a identificação de todas as glândulas (ou de duas nos casos em que ambos os exames apontam para a mesma lateralidade) mostrou-se útil, apesar de não ser possível, pela técnica, a discriminação entre glândulas normais e patológicas.

Sendo a amostra muito pequena, não é possível confirmar ou infirmar a tendência revelada noutros estudos de menor intensidade das glândulas patológicas face às glândulas normais [138, 163, 164].

A utilidade da técnica em cirurgia do hiperparatiroidismo primário revelou-se, no presente estudo, por um reforço da confiança do cirurgião na correta identificação das glândulas.

Face à variabilidade da intensidade da autofluorescência encontrada, parece-me pouco provável que este parâmetro venha a ser utilizado como único fator na decisão de qual a glândula ou glândulas a excisar, devendo o cirurgião basear a sua opção na conjugação da sua avaliação visual das paratiroides, identificadas com o auxílio da autofluorescência, com os dados de intensidade obtidos.

Não sendo objeto de estudo neste trabalho, pela escassa casuística anual reunida no hospital onde trabalho, a aplicação da autofluorescência à cirurgia do hiperparatiroidismo secundário carece de investigação aprofundada. A possibilidade de uma menor ou nula emissão de autofluorescência pelas paratiroides tem sido sugerida por alguns autores, não sendo evidente a razão desta menor emissão, situação que o esclarecimento da causa da autofluorescência poderá elucidar [165, 166].

Também a utilização no contexto de hiperparatiroidismo primário associado a neoplasia endócrina múltipla tipo I (MEN I) justifica esclarecimento, já que o trabalho de Squires e cols parece mostrar uma menor intensidade de fluorescência das glândulas paratiroideias, associada a uma maior intensidade da fluorescência dos tecidos adjacentes, que pode diminuir a utilidade da técnica nestas situações. A pequena dimensão da amostra do estudo (seis pacientes) torna necessária a realização de estudos mais robustos para tomada de conclusões definitivas [167].

Apesar de não existir consenso absoluto sobre a necessidade de identificação de todas as glândulas paratiroideias durante a cirurgia da tiroide, pois tal pode implicar, em certos casos, uma disseção exaustiva que pode pôr em risco quer a viabilidade destas glândulas, quer a integridade do nervo laríngeo recorrente e do ramo externo do nervo laríngeo superior, a grande maioria dos estudos associa a identificação sistemática das paratiroides com a diminuição dos casos de hipocalcemia pós-operatória [146, 168-172].

O estudo efetuado em cirurgia de ressecção da tiroide apresentou como principal viés o facto de todas as cirurgias serem efetuadas pelo mesmo cirurgião, confirmando, contudo, algumas das vantagens da técnica apontadas por outros autores [173-176].

Sendo a experiência do cirurgião o fator mais importante na identificação das glândulas paratiroideias, não deixa de ser relevante a diferença no número de paratiroides identificadas com alto grau de certeza pelo cirurgião e o número de paratiroides identificadas com o auxílio da autofluorescência.

Fica implícito neste estudo, bem como no conjunto da literatura publicada sobre o tema, poder a utilização da autofluorescência contribuir para a diminuição da curva de aprendizagem e do treino visual, necessários à identificação intraoperatória das glândulas

paratiroideias, sendo necessária a consubstanciação desta hipótese por estudos prospectivos envolvendo cirurgiões com diversos níveis de experiência.

Ressalvo aqui outro viés deste estudo, comum a todos os estudos na área efetuados até ao momento: a ausência de comprovação histológica da natureza dos tecidos identificados quer visualmente quer por autofluorescência, já que imperativos éticos não permitem a realização sistemática de biópsias desses tecidos, pois tal representaria um risco inaceitável para o paciente.

Existindo dados na literatura provenientes de estudos realizados em cadáver que apontam para valores de concordância entre os 60 e os 70 % entre as paratiroides identificadas visualmente e as detetadas em exame histológico esse viés poderá ter uma dimensão significativa [26].

Sendo o principal objetivo da aplicação da autofluorescência à cirurgia de ressecção da tiroide a diminuição das taxas de hipocalcemia, os resultados deste trabalho, embora promissores não esclarecem completamente a questão, pois se no grupo de estudo não se verificaram casos de hipocalcemia persistente, a pequena dimensão da amostra não permite a obtenção de valores estatisticamente significativos. O desenho de um estudo com potência suficiente para esclarecer a questão será impossível a um centro isolado, necessitando de cooperação multi-institucional internacional.

Parece-me, contudo, inequívoco que, a melhoria da acuidade na identificação das paratiroides proporcionada pela utilização da autofluorescência, minimiza o risco de hipocalcemia permanente, confirmando os resultados de Benmiloud e Dip [177-179].

A possibilidade dessa deteção ocorrer numa fase precoce da disseção cervical, conforme o conceito de “mapeamento” desenvolvido por Kim e cols, poderá ajudar a diminuir o manuseamento das paratiroides, orientando a disseção com vista à preservação da vascularização das glândulas, cuja avaliação continua a depender do cirurgião [174].

Não é consensual, contudo, esta possibilidade, pois dependerá da capacidade de penetração da luz infravermelha nos tecidos, variável conforme os sistemas utilizados. Ladurner e cols consideram ser sempre necessário algum grau de disseção para a identificação das paratiroides, sendo que a posição habitual destas glândulas obrigará para a sua visualização à mobilização do lobo tiroideu, situação que só por si poderá ser causadora de perturbação [175].

A diminuição da taxa de hipocalcemia transitória, não demonstrada estatisticamente neste trabalho, situação comum a várias outras publicações, levanta a questão da verdadeira dimensão deste problema, que pode ser decomposto em vários pontos:

- Na generalidade dos trabalhos não foi feita uma distinção entre hipocalcemia bioquímica e hipocalcemia clínica, sendo que esta é afetada por uma grande subjetividade e suscetibilidade individual, pouco compatíveis com o rigor científico, não sendo raras as situações de hipocalcemia sintomática com valores laboratoriais dentro dos parâmetros da normalidade. Por outro lado, imperativos éticos fazem com que muitas vezes seja iniciada reposição de cálcio profilática baseada nos valores de calcemia, antes da presença de sintomas [177, 179].

- Também a definição de hipocalcemia utilizada pode condicionar os resultados obtidos. Não parece coincidência o facto de no único trabalho publicado em que existiu uma diminuição estatisticamente significativa da hipocalcemia transitória, tenha sido utilizada como definição de hipocalcemia a presença de um valor de cálcio sérico menor que 8 mg/dl às 24 ou 48 horas. Esta definição, correta do ponto de vista clínico, gera num trabalho científico um potencial viés, já que o comparador não é o mesmo [178].

- A ocorrência de episódios de hipocalcemia em cirurgias em que não existe manipulação cervical de um dos lados (hemitiroidectomias, lobectomias unilaterais), suscetível de perturbar o funcionamento dessas paratiroides, que originou a hipótese acima formulada de existirem a cada momento “paratiroides adormecidas”, poderá levar a pensar que a abolição dos casos de hipocalcemia transitória é um objetivo quase impossível de alcançar, pois mesmo o manuseamento cuidadoso das paratiroides previamente identificadas, com inequívoca manutenção da sua viabilidade, pode gerar uma perturbação no funcionamento da ou das paratiroides ativas nesse momento, levando a um episódio de hipocalcemia cuja duração depende da entrada em funcionamento das glândulas que foram perturbadas ou das glândulas “adormecidas”.

A possibilidade de ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos tem de estar sempre presente quando da utilização da autofluorescência para identificação das glândulas paratiroideias, reforçando a sua condição de método auxiliar da decisão, que continuará a ser clínica.

Foram reportados na literatura falsos positivos associados à presença de nódulos coloides da tiroide, metástases ganglionares e tecido adiposo castanho [113, 158, 160].

O aspeto visual dos nódulos coloides, bem como a sua localização, permitem, habitualmente, uma diferenciação relativamente fácil das paratiroides, não constituindo assim verdadeiro problema na maioria dos casos. Também o tecido adiposo castanho, ao contrário do tecido adiposo “branco” apresenta autofluorescência, podendo originar falsos positivos.

A raridade da presença de tecido adiposo castanho em adultos, bem como a escassa quantidade do mesmo em localização cervical e a possibilidade da sua diferenciação por exposição à luz branca diminuem a importância deste facto.

Os escassos relatos de falsos positivos associados a metástases ganglionares configuram um problema que poderá ter implicações mais profundas, já que está em causa a manutenção *in situ* de tecido metastático com possíveis consequências nefastas na progressão da doença. Alguns fatores parecem minimizar este problema: por um lado o número de relatos de falsos positivos associados a gânglios metastáticos é muito pequeno, carecendo de melhor esclarecimento; por outro lado algumas características morfológicas associadas à infiltração metastática podem ajudar à decisão do cirurgião, que pode passar pelo recurso ao exame extemporâneo do tecido suspeito ou mesmo à sua excisão, desde que salvaguardada a manutenção *in situ* das restantes glândulas paratiroideias normalmente vascularizadas.

Num estudo não publicado apresentado por Lorenz e cols no 2<sup>nd</sup> Symposium on Parathyroid Fluorescence (Lausanne, Suíça, Fevereiro de 2020) os autores mostraram a inexistência/redução da autofluorescência das paratiroides numa amostra de seis crianças submetidas a tiroidectomia total profilática, no contexto de neoplasia endócrina múltipla tipo II A.

Não sendo a tiroidectomia habitual nas crianças fora deste contexto, fica por esclarecer se a diminuição da fluorescência encontrada está associada a características próprias da síndrome ou à maturação incompleta das células paratiroideias na infância, remetendo para a questão da causa da fluorescência, ainda desconhecida.

- Durante a realização deste estudo ganhou popularidade a utilização do corante verde de indocianina, injetado por via endovenosa, para avaliação da perfusão das glândulas paratiroideias, condição não avaliável pela autofluorescência [114, 115, 180-182].

Sendo o verde de indocianina injetado por via endovenosa, a sua presença em circulação vai permitir a realização de uma angiografia das paratiroides, que devem ter sido previamente identificadas pelo cirurgião, podendo para esta identificação ser utilizada a autofluorescência [117, 182, 183].

A emissão de fluorescência pelo verde de indocianina ocorre também na banda do infravermelho próximo, pelo que após a sua injeção deixa de ser possível a captação de autofluorescência, logo a utilização das duas técnicas, sendo possível, implica uma programação cuidadosa [117, 183].

À semelhança do que acontece com a autofluorescência, também a vascularização da glândula tiroideia vai originar que a mesma seja corada, situação que embora ocorra tardiamente em relação à paratiroide leva a que exista uma janela estreita para a avaliação da perfusão desta [117, 183].

Estudos efetuados por Galvez-Pastor e cols parecem mostrar que à semelhança do que ocorre com a autofluorescência, em que a identificação das glândulas paratiroideias não garante a abolição dos casos de hipocalcemia transitória, também a utilização do verde de

indocianina e a avaliação da perfusão não é suficiente para os evitar por completo, apesar de constituir um importante fator preditivo de hipocalcemia [118, 184].

Vários autores compararam os dois métodos, sem mostrarem uma evidente superioridade de um deles, não invalidando a mais-valia da complementaridade dos mesmos [176, 182, 183].

A autofluorescência parece detetar precocemente as paratiroides face ao verde de indocianina, situação que poderá constituir uma vantagem, pois poderá diminuir a manipulação tecidual e o compromisso vascular [182].

A utilização complementar dos dois métodos carece de uma programação operatória cuidadosa, com identificação das glândulas paratiroideias por autofluorescência, seguida da injeção do verde de indocianina para avaliação da perfusão, pois ocorrendo o pico de emissão do verde de indocianina aos 832 nm, após essa injeção, deixa de ser possível a utilização da autofluorescência [183].

Não conseguindo casuística suficiente que me permitisse assegurar resultados significativos, excluí deste trabalho a avaliação da utilização da autofluorescência das paratiroides em esvaziamentos cervicais, situação em que esta técnica poderá ser de grande utilidade, já que a ela se associam taxas mais elevadas de hipocalcemia pós-operatória [102].

Na literatura também não se encontram trabalhos relevantes sobre o assunto, tornando imperativa a realização de estudos prospetivos randomizados para a confirmação da efetiva melhoria nas taxas de hipocalcemia transitória e (fundamentalmente) definitiva.

Deixo para o fim aquele que poderá ser eventualmente o maior viés deste trabalho, que é comum a todas as publicações sobre o tema: a experiência do cirurgião.

Conforme anteriormente referido, a deteção intraoperatória das glândulas paratiroideias é altamente dependente da experiência do cirurgião, que está associada ao seu volume operatório anual.

Tendo eu, à semelhança dos autores de outros trabalhos existentes, elevada casuística em cirurgia tiroideia e paratiroideia, poderei não usufruir completamente dos benefícios da técnica, ao contrário do que aconteceria com cirurgiões menos experientes cuja diferença nos resultados poderia ser mais notória.

#### D- Contribuição para o esclarecimento da origem da fluorescência das paratiroides

O fenómeno descrito por Paras - autofluorescência das paratiroides expostas a um comprimento de onda de 785 nm - continua a despertar o interesse dos investigadores, já que ainda não foi possível descobrir a sua causa [12, 160].

Apesar do presente estudo ter natureza essencialmente prática, procurando ajudar a resolver o problema concreto constituído pela identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias, tentei também dar um pequeno contributo para o esclarecimento da causa

da fluorescência, através da confirmação da robustez do fenômeno, submetendo as glândulas paratiroideias a condições extremas, aquecimento, congelamento e fixação em formol, assim como através de análises espectroscópicas por Ground State Diffuse reflectance e Laser induced luminescence.

Os resultados obtidos, confirmam os poucos estudos existentes na literatura sobre o tema e ajudam a excluir a necessidade da existência de uma reação enzimática para a geração da autofluorescência [158, 160, 174, 185].

Não foi possível, contudo, nos estudos efetuados identificar o fluoróforo responsável. Fica latente a possibilidade de estarem implicados o aminoácido triptofano, bem como elastina e colagénio.

Para além da confirmação do “pico” de fluorescência aos 822 nm, identifiquei, por espectroscopia, outros picos de emissão, dos quais o mais importante aos 711 nm, após estimulação aos 650 nm.

A importância deste pico e as suas potencialidades na discriminação entre tecido tiroideu e paratiroideu carece de confirmação por novos estudos.

A localização da estimulação na banda do visível pode permitir a utilização de fontes de luz menos dispendiosas, não dispensando, no entanto, a utilização de filtros apropriados.

Também o desfasamento existente entre este pico e o pico de emissão do verde de indocianina poderá permitir a utilização simultânea e integração dos dois métodos.

## Capítulo 6

### Conclusões e perspectivas futuras

A utilização da autofluorescência das glândulas paratiroideias para a sua identificação intraoperatória tem vindo a ganhar gradualmente maior importância, à medida que novos trabalhos têm demonstrado a sua utilidade no auxílio ao cirurgião e no aumento da segurança cirúrgica.

A investigação desenvolvida neste projeto contribuiu para a demonstração da inocuidade da radiação de infravermelho próximo, aplicada nas condições que permitem a identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias, ao confirmar a ausência de alterações significativas no padrão de secreção hormonal, bem como de modificações na estrutura e ultraestrutura das glândulas, cumprido o ponto 1 dos objetivos do estudo.

Também ficou inequívoca a demonstração da possibilidade de captação da autofluorescência das paratiroides com recurso a tecnologia de baixo custo e fácil acessibilidade (ponto 2), que, naturalmente, é passível de aperfeiçoamento.

A comercialização de dispositivos de baixo custo baseados no trabalho desenvolvido neste projeto, poderá contribuir para que o acesso a esta tecnologia se generalize e a mesma fique ao alcance de cirurgiões operando fora dos grandes centros, maiores beneficiários potenciais desta tecnologia.

A utilidade do sistema para a inspeção imediata das peças operatórias foi demonstrada de forma convincente (ponto 3), pois a rapidez e fiabilidade da “biópsia ótica” aliadas à diminuição de custos, face ao exame histológico extemporâneo, são fatores a ter em consideração.

A utilidade da autofluorescência das paratiroides na cirurgia do hiperparatiroidismo primário, ficou apenas parcialmente demonstrada neste trabalho, carecendo de confirmação por estudos mais robustos (ponto 4), apesar do aumento de confiança que proporciona ao cirurgião ser uma mais-valia inquestionável, difícil de objetivar cientificamente.

A vantagem da técnica na diminuição do hipoparatiroidismo pós-operatório permanente também foi confirmada, o que não aconteceu de forma inequívoca com o hipoparatiroidismo transitório (ponto 5), justificando a realização de mais estudos.

Ambos os objetivos secundários foram atingidos, com a confirmação da robustez do fenómeno pela persistência da autofluorescência das paratiroides submetidas a aquecimento, congelação e fixação em formalina (questão 1), bem como com a identificação de outros picos de fluorescência passíveis de utilização clínica (questão 2).

Algumas questões mantêm-se em aberto, justificando a continuação da pesquisa na área, em várias linhas de investigação:

- Não existindo ainda certezas sobre a natureza do fluoróforo responsável, o conhecimento deste poderá ser de grande utilidade para o desenvolvimento de novos dispositivos, bem como para a sua possível utilização noutras áreas da cirurgia.

Esta linha de investigação deverá continuar a ser desenvolvida pela Engenharia Biomédica, sendo, possivelmente, a mais difícil de implementar face aos elevados custos.

- A confirmação do conceito de “paratiroide adormecida” justifica a investigação de qual ou quais paratiroides funcionam a cada momento, bem como dos estímulos para o seu “despertar”.

- A validação da utilidade clínica da autofluorescência das paratiroides para a sua identificação intraoperatória obriga à realização de estudos robustos, em várias áreas até agora insuficientemente investigadas:

. Avaliação dos resultados da utilização da autofluorescência por cirurgiões de vários níveis de experiência.

. Avaliação dos resultados da utilização da autofluorescência em esvaziamentos cervicais (compartimento central e lateral)

. Avaliação da utilização da autofluorescência em cirurgia da tiroide e paratiroide em crianças.

. Confirmação definitiva das diferenças de intensidade de fluorescência entre paratiroides normais e patológicas, para possível definição de padrão discriminativo entre ambas.

. Avaliação do impacto da utilização da técnica na redução da hipocalcemia transitória, através da realização de estudos prospetivos aleatórios multicêntricos, com critérios homogêneos de inclusão.

- Exploração das potencialidades do pico de autofluorescência identificado aos 711 nm, bem como a sua possível compatibilização com a utilização do verde de indocianina.

- Desenvolvimento de novos dispositivos com recurso à utilização de filtros óticos mais seletivos, possibilitando uma maior penetração nos tecidos do feixe de luz infravermelha e melhor capacidade de deteção da autofluorescência emitida pelas paratiroides, possibilitando a deteção destas glândulas antes do início da disseção lateral do lobo tiroideu e a identificação de glândulas paratiroideias intratiroideias profundas.

A utilidade da autofluorescência para a identificação intraoperatória das paratiroides ficou assim bem estabelecida, e, mesmo considerando que a investigação sobre o tema está longe de se poder dar por concluída, é inegável que constitui um pequeno passo no sentido do aumento da segurança cirúrgica, princípio que norteia a atividade de qualquer cirurgião.

## Capítulo 7

### Referências

1. Policeni BA, Smoker WR, Reede DL: **Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands.** *Semin Ultrasound CT MR* 2012, **33**(2):104-114.
2. Akerstrom G, Malmaeus J, Bergstrom R: **Surgical anatomy of human parathyroid glands.** *Surgery* 1984, **95**(1):14-21.
3. Almquist M, Ivarsson K, Nordenstrom E, Bergenfelz A: **Mortality in patients with permanent hypoparathyroidism after total thyroidectomy.** *Br J Surg* 2018, **105**(10):1313-1318.
4. Bergenfelz A, Nordenstrom E, Almquist M: **Morbidity in patients with permanent hypoparathyroidism after total thyroidectomy.** *Surgery* 2020, **167**(1):124-128.
5. Edafe O, Balasubramanian SP: **Incidence, prevalence and risk factors for post-surgical hypocalcaemia and hypoparathyroidism.** *Gland Surg* 2017, **6**(Suppl 1):S59-S68.
6. Pattou F, Combemale F, Fabre S, Carnaille B, Decoux M, Wemeau JL, Racadot A, Proye C: **Hypocalcemia following thyroid surgery: incidence and prediction of outcome.** *World J Surg* 1998, **22**(7):718-724.
7. Ritter K, Elfenbein D, Schneider DF, Chen H, Sippel RS: **Hypoparathyroidism after total thyroidectomy: incidence and resolution.** *The Journal of surgical research* 2015, **197**(2):348-353.
8. Chadwick DR: **Hypocalcaemia and permanent hypoparathyroidism after total/bilateral thyroidectomy in the BAETS Registry.** *Gland Surg* 2017, **6**(Suppl 1):S69-S74.
9. Wilson RB, Erskine C, Crowe PJ: **Hypomagnesemia and hypocalcemia after thyroidectomy: prospective study.** *World J Surg* 2000, **24**(6):722-726.
10. Duclos A, Peix JL, Colin C, Kraimps JL, Menegaux F, Pattou F, Sebag F, Touzet S, Bourdy S, Voirin N *et al*: **Influence of experience on performance of individual surgeons in thyroid surgery: prospective cross sectional multicentre study.** *BMJ* 2012, **344**:d8041.
11. Sosa JA, Bowman HM, Tielsch JM, Powe NR, Gordon TA, Udelsman R: **The importance of surgeon experience for clinical and economic outcomes from thyroidectomy.** *Ann Surg* 1998, **228**(3):320-330.
12. Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jansen A: **Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands.** *J Biomed Opt* 2011, **16**(6):067012.
13. Johansson H: **The Uppsala anatomist Ivar Sandström and the parathyroid gland.** *Uppsala journal of medical sciences* 2015, **120**(2):72-77.
14. Modarai B, Sawyer A, Ellis H: **The glands of Owen.** *J R Soc Med* 2004, **97**(10):494-495.
15. Delbridge LW, Palazzo FF: **First parathyroid surgeon: Sir John Bland-Sutton and the parathyroids.** *ANZ J Surg* 2007, **77**(12):1058-1061.
16. Toneto MG, Prill S, Debon LM, Furlan FZ, Steffen N: **The history of the parathyroid surgery.** *Rev Col Bras Cir* 2016, **43**(3):214-222.
17. Vermeulen AH: **The birth of endocrine pathology: How Erdheim misunderstood parathyroids.** *Virchows Arch* 2010, **457**(3):283-290.
18. Rogers-Stevane J, Kauffman GL, Jr.: **A historical perspective on surgery of the thyroid and parathyroid glands.** *Otolaryngol Clin North Am* 2008, **41**(6):1059-1067, vii.
19. Kafetzis ID, Diamantopoulos A, Christakis I, Leoutsakos B: **The history of the parathyroid glands.** *Hormones (Athens)* 2011, **10**(1):80-84.
20. Carney JA: **The glandulae parathyroideae of Ivar Sandstrom. Contributions from two continents.** *Am J Surg Pathol* 1996, **20**(9):1123-1144.

21. Fancy T, Gallagher D, 3rd, Hornig JD: **Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands.** *Otolaryngol Clin North Am* 2010, **43**(2):221-227, vii.
22. Mohebbati A, Shaha AR: **Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations.** *Clin Anat* 2012, **25**(1):19-31.
23. Gray SW, Skandalakis JE, Akin JT, Jr.: **Embryological considerations of thyroid surgery: developmental anatomy of the thyroid, parathyroids and the recurrent laryngeal nerve.** *Am Surg* 1976, **42**(9):621-628.
24. Hillary S, Balasubramanian SP: **Anatomy of the thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands.** *Surgery (Oxford)* 2017, **35**(10):537-541.
25. Tattera D, Wong LM, Vikse J, Sanna B, Pękala P, Walocha J, Cirocchi R, Tomaszewski K, Henry BM: **The prevalence and anatomy of parathyroid glands: a meta-analysis with implications for parathyroid surgery.** *Langenbecks Arch Surg* 2019, **404**(1):63-70.
26. Melo C, Pinheiro S, Carvalho L, Bernardes A: **Identification of parathyroid glands: anatomical study and surgical implications.** *Surg Radiol Anat* 2015, **37**(2):161-165.
27. Lappas D, Nossios G, Anagnostis P, Adamidou F, Chatzigeorgiou A, Skandalakis P: **Location, number and morphology of parathyroid glands: results from a large anatomical series.** *Anat Sci Int* 2012, **87**(3):160-164.
28. Fomin AB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM: **DiGeorge Syndrome: a not so rare disease.** *Clinics (Sao Paulo)* 2010, **65**(9):865-869.
29. Kunstman JW, Kirsch JD, Mahajan A, Udelsman R: **Clinical review: Parathyroid localization and implications for clinical management.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, **98**(3):902-912.
30. Sakorafas GH, Stafyla V, Bramis C, Kotsifopoulos N, Kolettis T, Kassaras G: **Incidental parathyroidectomy during thyroid surgery: an underappreciated complication of thyroidectomy.** *World J Surg* 2005, **29**(12):1539-1543.
31. Chen HS, T. Emura, S. Kubo, K.: **An Update on the structure of the parathyroid gland.** *The Open Anatomy Journal* 2013, **5**:1-9.
32. Miller FR: **Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands.** *Otolaryngol Clin North Am* 2003, **36**(1):1-7, vii.
33. Raybuck HE: **The innervation of the parathyroid glands.** *Anat Rec* 1952, **112**(1):117-123.
34. Zajac JD, Danks JA: **The development of the parathyroid gland: from fish to human.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008, **17**(4):353-356.
35. CC C: **Pathobiology of Parathyroid gland Structure and Function in Animals.** In: *Endocrine System.* edn. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996: 293-325.
36. Capen CC, Rosol TJ: **Recent advances in the structure and function of the parathyroid gland in animals and the effects of xenobiotics.** *Toxicol Pathol* 1989, **17**(2):333-345.
37. Isono H, Shoumura S, Emura S: **Ultrastructure of the parathyroid gland.** *Histol Histopathol* 1990, **5**(1):95-112.
38. Carlson D: **Parathyroid pathology: hyperparathyroidism and parathyroid tumors.** *Arch Pathol Lab Med* 2010, **134**(11):1639-1644.
39. Rosai J, DeLellis RA, Carcangiu ML, Frable WJ, Tallini G, Rosai J, DeLellis RA, American Registry of Pathology: **Tumors of the thyroid and parathyroid glands.** Silver Spring, Maryland: American Registry of Pathology; 2014.
40. LiVolsi VA, Montone KT, Baloch ZN: **Parathyroid: The Pathology of Hyperparathyroidism.** *Surg Pathol Clin* 2014, **7**(4):515-531.
41. Wenig BM: **Atlas of head and neck pathology,** Third edition. edn. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
42. Kittel B, Ernst H, Kamino K: **Anatomy, Histology, Ultrastructure, Parathyroid, Rat.** In: *Endocrine System.* edn.: Springer Berlin Heidelberg; 1996: 330-333.
43. Hara J, Yamada K: **Some features of the structure and histochemistry of the rat parathyroid gland.** *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1962, **57**:360-370.

44. Summers R, Macnab R: **Thyroid, parathyroid hormones and calcium homeostasis.** *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 2017, **18**(10):522-526.
45. Conigrave AD: **The Calcium-Sensing Receptor and the Parathyroid: Past, Present, Future.** *Front Physiol* 2016, **7**:563.
46. Khan M, Jose A, Sharma S: **Physiology, Parathyroid Hormone (PTH).** In: *StatPearls*. edn. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
47. Chen RA, Goodman WG: **Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2004, **286**(6):F1005-F1011.
48. Liyanarachchi KD, Debono M: **Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands.** *Surgery (Oxford)* 2017, **35**(10):542-555.
49. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: **Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid.** *Nature* 1993, **366**(6455):575-580.
50. Hall JE, Guyton AC: **Guyton and Hall textbook of medical physiology**, 12th edn. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2011.
51. Brown EM: **The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics.** *Sub-cellular biochemistry* 2007, **45**:139-167.
52. Hannan SA: **The magnificent seven: a history of modern thyroid surgery.** *International journal of surgery (London, England)* 2006, **4**(3):187-191.
53. Sarkar S, Banerjee S, Sarkar R, Sikder B: **A Review on the History of 'Thyroid Surgery'.** *Indian J Surg* 2016, **78**(1):32-36.
54. Abâu al-Qâasim Khalaf ibn °Abbâas a-Z, Lewis GL, Spink MS: **On surgery and instruments; a definitive edition of the Arabic text with English translation and commentary, by M. S. Spink and G. L. Lewis.** Berkeley,: Univ. of California Press; 1973.
55. Ignjatović M: **The thyroid gland in works of famous old anatomists and great artists.** *Langenbecks Arch Surg* 2010, **395**(7):973-985.
56. Halsted W: **The Operative Story of Goitre: The Author's Operation:** Johns Hopkins Press; 1919.
57. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M *et al*: **2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer.** *Thyroid* 2016, **26**(1):1-133.
58. Patel KN, Yip L, Lubitz CC, Grubbs EG, Miller BS, Shen W, Angelos P, Chen H, Doherty GM, Fahey TJI *et al*: **The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the Definitive Surgical Management of Thyroid Disease in Adults.** *Annals of Surgery* 2020, **271**(3):e21-e93.
59. Bartsch DK, Luster M, Buhr HJ, Lorenz D, Germer CT, Goretzki PE, German Society for G, Visceral S: **Indications for the Surgical Management of Benign Goiter in Adults.** *Dtsch Arztebl Int* 2018, **115**(1-02):1-7.
60. Roman BR, Randolph GW, Kamani D: **Conventional Thyroidectomy in the Treatment of Primary Thyroid Cancer.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019, **48**(1):125-141.
61. Cibas ES, Ali SZ: **The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology.** *Thyroid* 2017, **27**(11):1341-1346.
62. Liu X, Medici M, Kwong N, Angell TE, Marqusee E, Kim MI, Larsen PR, Cho NL, Nehs MA, Ruan DT *et al*: **Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid Cancer Type and Prognosis.** *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2016, **26**(2):256-261.
63. Anand B, Ramdas A, Ambroise MM, Kumar NP: **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: A Cytohistological Study.** *Journal of Thyroid Research* 2020, **2020**:8095378.

64. Duh Q-Y, Clark OH, Kebebew E: **Atlas of endocrine surgical techniques**. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010.
65. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, Barletta JA, Wenig BM, Al Ghuzlan A, Kakudo K *et al*: **Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors**. *JAMA Oncol* 2016, **2**(8):1023-1029.
66. Randolph G: **Surgery of the thyroid and parathyroid glands**, 2nd edn. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2013.
67. Arora N, Dhar P, Fahey TJ, 3rd: **Seminars: local and regional anesthesia for thyroid surgery**. *J Surg Oncol* 2006, **94**(8):708-713.
68. Pinchot S, Chen H, Sippel R: **Incisions and Exposure of the Neck for Thyroidectomy and Parathyroidectomy**. *Operative Techniques in General Surgery* 2008, **10**(2):63-76.
69. Gil Z, Patel SG: **Surgery for thyroid cancer**. *Surg Oncol Clin N Am* 2008, **17**(1):93-120, viii.
70. Portinari M, Carcoforo P: **The application of drains in thyroid surgery**. *Gland Surg* 2017, **6**(5):563-573.
71. Miccoli P, Berti P, Conte M, Bendinelli C, Marcocci C: **Minimally invasive surgery for thyroid small nodules: preliminary report**. *J Endocrinol Invest* 1999, **22**(11):849-851.
72. Miccoli P, Berti P, Bendinelli C, Conte M, Fasolini F, Martino E: **Minimally invasive video-assisted surgery of the thyroid: a preliminary report**. *Langenbecks Arch Surg* 2000, **385**(4):261-264.
73. Ikeda Y, Takami H, Sasaki Y, Kan S, Niimi M: **Endoscopic resection of thyroid tumors by the axillary approach**. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2000, **41**(5):791-792.
74. Sephton BM: **Extracervical Approaches to Thyroid Surgery: Evolution and Review**. *Minim Invasive Surg* 2019, **2019**:5961690.
75. Anuwong A: **Transoral Endoscopic Thyroidectomy Vestibular Approach: A Series of the First 60 Human Cases**. *World J Surg* 2016, **40**(3):491-497.
76. Anuwong A, Ketwong K, Jitpratoom P, Sasanakietkul T, Duh QY: **Safety and Outcomes of the Transoral Endoscopic Thyroidectomy Vestibular Approach**. *JAMA Surg* 2018, **153**(1):21-27.
77. Organ CH, Jr.: **The history of parathyroid surgery, 1850-1996: the Excelsior Surgical Society 1998 Edward D Churchill Lecture**. *J Am Coll Surg* 2000, **191**(3):284-299.
78. Wax MK, Valiulis AP, Hurst MK: **Drains in thyroid and parathyroid surgery. Are they necessary?** *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 1995, **121**(9):981-983.
79. Tibblin S, Bondeson AG, Bondeson L, Ljungberg O: **Surgical strategy in hyperparathyroidism due to solitary adenoma**. *Ann Surg* 1984, **200**(6):776-784.
80. Bergenfelz A, Lindblom P, Tibblin S, Westerdaal J: **Unilateral versus bilateral neck exploration for primary hyperparathyroidism: a prospective randomized controlled trial**. *Ann Surg* 2002, **236**(5):543-551.
81. Carneiro-Pla D: **Contemporary and Practical Uses of Intraoperative Parathyroid Hormone Monitoring**. *Endocrine Practice* 2011, **17**(Supplement 1):44-53.
82. Packman KS, Demeure MJ: **Indications for parathyroidectomy and extent of treatment for patients with secondary hyperparathyroidism**. *Surg Clin North Am* 1995, **75**(3):465-482.
83. Tang JA, Friedman J, Hwang MS, Salapatras AM, Bonzelaar LB, Friedman M: **Parathyroidectomy for tertiary hyperparathyroidism: A systematic review**. *Am J Otolaryngol* 2017, **38**(5):630-635.
84. Tominaga Y, Matsuoka S, Uno N, Sato T: **Parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism in the era of calcimimetics**. *Ther Apher Dial* 2008, **12** Suppl 1:S21-26.
85. Wilhelm SM, Wang TS, Ruan DT, Lee JA, Asa SL, Duh QY, Doherty GM, Herrera MF, Pasiaka JL, Perrier ND *et al*: **The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for**

- Definitive Management of Primary Hyperparathyroidism.** *JAMA Surg* 2016, **151**(10):959-968.
86. McDow AD, Sippel RS: **Should Symptoms Be Considered an Indication for Parathyroidectomy in Primary Hyperparathyroidism?** *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2018, **11**:1179551418785135.
87. Clarke BL: **Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism.** *Front Horm Res* 2019, **51**:13-22.
88. Silverberg SJ, Clarke BL, Peacock M, Bandeira F, Boutroy S, Cusano NE, Dempster D, Lewiecki EM, Liu JM, Minisola S *et al*: **Current issues in the presentation of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the Fourth International Workshop.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014, **99**(10):3580-3594.
89. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, Potts JJT: **Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014, **99**(10):3561-3569.
90. Akerström G, Stålberg P: **Surgical management of MEN-1 and -2: state of the art.** *Surg Clin North Am* 2009, **89**(5):1047-1068.
91. Aygun N, Uludag M: **Intraoperative Adjunct Methods for Localization in Primary Hyperparathyroidism.** *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 2019, **53**(2):84-95.
92. Norman JG: **Minimally invasive radioguided parathyroidectomy: an endocrine surgeon's perspective.** *J Nucl Med* 1998, **39**(10):15N, 24N.
93. Agarwal G, Barraclough BH, Robinson BG, Reeve TS, Delbridge LW: **Minimally invasive parathyroidectomy using the 'focused' lateral approach. I. Results of the first 100 consecutive cases.** *ANZ J Surg* 2002, **72**(2):100-104.
94. Miccoli P, Bendinelli C, Vignali E, Mazzeo S, Cecchini GM, Pinchera A, Marcocci C: **Endoscopic parathyroidectomy: report of an initial experience.** *Surgery* 1998, **124**(6):1077-1079; discussion 1079-1080.
95. Sasanakietkul T, Jitpratoom P, Anuwong A: **Transoral endoscopic parathyroidectomy vestibular approach: a novel scarless parathyroid surgery.** *Surg Endosc* 2017, **31**(9):3755-3763.
96. Fewins J, Simpson CB, Miller FR: **Complications of thyroid and parathyroid surgery.** *Otolaryngol Clin North Am* 2003, **36**(1):189-206, x.
97. Gopalakrishna Iyer N, Shaha AR: **Complications of thyroid surgery: prevention and management.** *Minerva Chir* 2010, **65**(1):71-82.
98. Miccoli P: **Thyroid surgery : preventing and managing complications.** Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2013.
99. Cernea CR, Brandao LG, Hojajj FC, De Carlucci D, Montenegro FL, Plopper C, Vanderlei F, Gotoda R, Dias FL, Lima RA: **How to minimize complications in thyroid surgery?** *Auris Nasus Larynx* 2010, **37**(1):1-5.
100. Russell MD, Kamani D, Randolph GW: **Surgical management of the compromised recurrent laryngeal nerve in thyroid cancer.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019, **33**(4):101282.
101. Aspinall S, Oweis D, Chadwick D: **Effect of surgeons' annual operative volume on the risk of permanent Hypoparathyroidism, recurrent laryngeal nerve palsy and Haematoma following thyroidectomy: analysis of United Kingdom registry of endocrine and thyroid surgery (UKRETS).** *Langenbecks Arch Surg* 2019, **404**(4):421-430.
102. Sitges-Serra A, Gallego-Otaegui L, Suarez S, Lorente-Poch L, Munne A, Sancho JJ: **Inadvertent parathyroidectomy during total thyroidectomy and central neck dissection for papillary thyroid carcinoma.** *Surgery* 2017, **161**(3):712-719.
103. Andrioli M, Valcavi R: **Sonography of Normal and Abnormal Thyroid and Parathyroid Glands.** *Front Horm Res* 2016, **45**:1-15.
104. McBiles M, Lambert AT, Cote MG, Kim SY: **Sestamibi parathyroid imaging.** *Semin Nucl Med* 1995, **25**(3):221-234.

105. Ruda JM, Hollenbeak CS, Stack BC, Jr.: **A systematic review of the diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism from 1995 to 2003.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005, **132**(3):359-372.
106. Broos WAM, Wondergem M, Knol RJJ, van der Zant FM: **Parathyroid imaging with (18)F-fluorocholine PET/CT as a first-line imaging modality in primary hyperparathyroidism: a retrospective cohort study.** *EJNMMI Res* 2019, **9**(1):72.
107. Dudley NE: **Methylene blue for rapid identification of the parathyroids.** *Br Med J* 1971, **3**(5776):680-681.
108. Harrison BJ, Triponez F: **Intraoperative adjuncts in surgery for primary hyperparathyroidism.** *Langenbecks Arch Surg* 2009, **394**(5):799-809.
109. Patel HP, Chadwick DR, Harrison BJ, Balasubramanian SP: **Systematic review of intravenous methylene blue in parathyroid surgery.** *Br J Surg* 2012, **99**(10):1345-1351.
110. Takeuchi S, Shimizu K, Shimizu K, Jr., Akasu H, Okamura R: **Identification of pathological and normal parathyroid tissue by fluorescent labeling with 5-aminolevulinic acid during endocrine neck surgery.** *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* 2014, **81**(2):84-93.
111. Barczynski M, Konturek A, Hubalewska-Dydejczyk A, Cichon S, Nowak W: **Evaluation of Halle, Miami, Rome, and Vienna intraoperative iPTH assay criteria in guiding minimally invasive parathyroidectomy.** *Langenbecks Arch Surg* 2009, **394**(5):843-849.
112. Aygun N, Uludag M: **Surgical Treatment of Primary Hyperparathyroidism: Which Therapy to Whom?** *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 2019, **53**(3):201-214.
113. Abbaci M, De Leeuw F, Breuskin I, Casiraghi O, Lakhdar AB, Ghanem W, Laplace-Builhe C, Hartl D: **Parathyroid gland management using optical technologies during thyroidectomy or parathyroidectomy: A systematic review.** *Oral oncology* 2018, **87**:186-196.
114. Vidal Fortuny J, Karenovics W, Triponez F, Sadowski SM: **Intra-Operative Indocyanine Green Angiography of the Parathyroid Gland.** *World J Surg* 2016, **40**(10):2378-2381.
115. Zaidi N, Bucak E, Yazici P, Soundararajan S, Okoh A, Yigitbas H, Dural C, Berber E: **The feasibility of indocyanine green fluorescence imaging for identifying and assessing the perfusion of parathyroid glands during total thyroidectomy.** *J Surg Oncol* 2016, **113**(7):775-778.
116. Sound S, Okoh A, Yigitbas H, Yazici P, Berber E: **Utility of Indocyanine Green Fluorescence Imaging for Intraoperative Localization in Reoperative Parathyroid Surgery.** *Surgical innovation* 2019, **26**(6):774-779.
117. Kahramangil B, Berber E: **The use of near-infrared fluorescence imaging in endocrine surgical procedures.** *J Surg Oncol* 2017, **115**(7):848-855.
118. Vidal Fortuny J, Belfontali V, Sadowski SM, Karenovics W, Guigard S, Triponez F: **Parathyroid gland angiography with indocyanine green fluorescence to predict parathyroid function after thyroid surgery.** *Br J Surg* 2016, **103**(5):537-543.
119. Lakowicz JR: **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** In.: Springer; 2006: 954.
120. Lee J: **Perspectives on Bioluminescence Mechanisms.** *Photochemistry and photobiology* 2017, **93**(2):389-404.
121. Brodl E, Winkler A, Macheroux P: **Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence.** *Comput Struct Biotechnol J* 2018, **16**:551-564.
122. Monici M: **Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications.** *Biotechnol Annu Rev* 2005, **11**:227-256.
123. Nagaya T, Nakamura YA, Choyke PL, Kobayashi H: **Fluorescence-Guided Surgery.** *Front Oncol* 2017, **7**:314.
124. Gioux S, Choi HS, Frangioni JV: **Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation.** *Molecular imaging* 2010, **9**(5):237-255.
125. Diana M: **Fluorescence-guided surgery applied to the digestive system: the cybernetic eye to see the invisible.** *Cir Esp* 2018, **96**(2):65-68.

126. Degett TH, Andersen HS, Gögenur I: **Indocyanine green fluorescence angiography for intraoperative assessment of gastrointestinal anastomotic perfusion: a systematic review of clinical trials.** *Langenbecks Arch Surg* 2016, **401**(6):767-775.
127. Pesce A, Piccolo G, La Greca G, Puleo S: **Utility of fluorescent cholangiography during laparoscopic cholecystectomy: A systematic review.** *World J Gastroenterol* 2015, **21**(25):7877-7883.
128. Korb ML, Huh WK, Boone JD, Warram JM, Chung TK, de Boer E, Bland KI, Rosenthal EL: **Laparoscopic Fluorescent Visualization of the Ureter With Intravenous IRDye800CW.** *J Minim Invasive Gynecol* 2015, **22**(5):799-806.
129. Auner GW, Koya SK, Huang C, Broadbent B, Trexler M, Auner Z, Elias A, Mehne KC, Brusatori MA: **Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis.** *Cancer Metastasis Rev* 2018, **37**(4):691-717.
130. Kallaway C, Almond LM, Barr H, Wood J, Hutchings J, Kendall C, Stone N: **Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics.** *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2013, **10**(3):207-219.
131. Brusatori M, Auner G, Noh T, Scarpace L, Broadbent B, Kalkanis SN: **Intraoperative Raman Spectroscopy.** *Neurosurg Clin N Am* 2017, **28**(4):633-652.
132. Asher SA, Peters GE, Pehler SF, Zinn K, Newman JR, Rosenthal EL: **Fluorescent detection of rat parathyroid glands via 5-aminolevulinic acid.** *Laryngoscope* 2008, **118**(6):1014-1018.
133. Prosst RL, Willeke F, Schroeter L, Post S, Gahlen J: **Fluorescence-guided minimally invasive parathyroidectomy: a novel detection technique for parathyroid glands.** *Surg Endosc* 2006, **20**(9):1488-1492.
134. van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, Swijnenburg RJ, Tummers QR, Hutteman M, Hamming JF, Kievit J, Frangioni JV, van de Velde CJ *et al*: **Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of parathyroid adenomas with use of low-dose methylene blue.** *Head Neck* 2014, **36**(6):853-858.
135. Suzuki T, Numata T, Shibuya M: **Intraoperative photodynamic detection of normal parathyroid glands using 5-aminolevulinic acid.** *Laryngoscope* 2011, **121**(7):1462-1466.
136. Das K, Stone N, Kendall C, Fowler C, Christie-Brown J: **Raman spectroscopy of parathyroid tissue pathology.** *Lasers Med Sci* 2006, **21**(4):192-197.
137. McWade MA, Paras C, White LM, Phay JE, Mahadevan-Jansen A, Broome JT: **A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands.** *Surgery* 2013, **154**(6):1371-1377.
138. Kose E, Kahramangil B, Aydin H, Donmez M, Berber E: **Heterogeneous and low-intensity parathyroid autofluorescence: Patterns suggesting hyperfunction at parathyroid exploration.** *Surgery* 2019, **165**(2):431-437.
139. Wang I, Clemente LP, Pratas RM, Cardoso E, Clemente MP, Montán S, Svanberg S, Svanberg K: **Fluorescence diagnostics and kinetic studies in the head and neck region utilizing low-dose delta-aminolevulinic acid sensitization.** *Cancer Lett* 1999, **135**(1):11-19.
140. Thomas G, McWade MA, Sanders ME, Solórzano CC, McDonald WH, Mahadevan-Jansen A: **Identifying the novel endogenous near-infrared fluorophore within parathyroid and other endocrine tissues.** *Biomedical Optics* 2016, PTu3A.5
141. Thomas G, McWade MA, Paras C, Mannoh EA, Sanders ME, White LM, Broome JT, Phay JE, Baregamian N, Solorzano CC *et al*: **Developing a Clinical Prototype to Guide Surgeons for Intraoperative Label-Free Identification of Parathyroid Glands in Real Time.** *Thyroid* 2018, **28**(11):1517-1531.
142. Kim SW, Song SH, Lee HS, Noh WJ, Oak C, Ahn YC, Lee KD: **Intraoperative Real-Time Localization of Normal Parathyroid Glands With Autofluorescence Imaging.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016, **101**(12):4646-4652.

143. Khan MA, North AP, Chadwick DR: **Prolonged postoperative altered mental status after methylene blue infusion during parathyroidectomy: a case report and review of the literature.** *Ann R Coll Surg Engl* 2007, **89**(2):W9-11.
144. Lambrecht P, Vandeplas G, Van Slycke S, Smet PF, Brusselaers N, Vermeersch H: **Phototoxic reaction after parathyroid surgery: case report and review of the literature.** *Acta clinica Belgica* 2012, **67**(6):438-441.
145. Dent PC, Bagnall NM: **Litigation in thyroid surgery in England.** *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)* 2017, **78**(4):213-218.
146. Bai B, Chen Z, Chen W: **Risk factors and outcomes of incidental parathyroidectomy in thyroidectomy: A systematic review and meta-analysis.** *PloS one* 2018, **13**(11):e0207088.
147. Edafe O, Prasad P, Harrison B, Balasubramanian S: **Incidence and predictors of post-thyroidectomy hypocalcaemia in a tertiary endocrine surgical unit.** *Ann R Coll Surg Engl* 2014, **96**(3):219-223.
148. Hauch A, Al-Qurayshi Z, Randolph G, Kandil E: **Total thyroidectomy is associated with increased risk of complications for low- and high-volume surgeons.** *Ann Surg Oncol* 2014, **21**(12):3844-3852.
149. Saunders BD, Wainess RM, Dimick JB, Doherty GM, Upchurch GR, Gauger PG: **Who performs endocrine operations in the United States?** *Surgery* 2003, **134**(6):924-931; discussion 931.
150. Fronza B, Somacal T, Mayer L, de Moraes JF, de Oliveira MG, Weber JB: **Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLLT) on thyroid hormone function in a rabbit model.** *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013, **42**(1):26-30.
151. Azevedo LH, Correaaranha AC, Stolf SF, Eduardo CDP, Ferreira Vieira MM: **Evaluation of low intensity laser effects on the thyroid gland of male mice.** *Photomedicine and laser surgery* 2005, **23**(6):567-570.
152. Lerma E, Hevia A, Rodrigo P, Gonzalez-Campora R, Armas JR, Galera H: **The effect of HeNe laser radiation on the thyroid gland of the rat.** *Int J Exp Pathol* 1991, **72**(4):379-385.
153. Weber JB, Mayer L, Cenci RA, Baraldi CE, Ponzoni D, Gerhardt de Oliveira M: **Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model.** *Photomed Laser Surg* 2014, **32**(11):612-617.
154. Mayer L, Gomes FV, Baraldi CE, Weber JoBB, Oliveira MIGd: **Assessment of LLLT systemic effects on thyroid hormones function after dental titanium implant installation: An experimental rabbit model.** *Natural Science* 2013, **Vol.05No.08**:8.
155. Mohammed I, Al-Azawi T, AL-Mustawfi N: **Effect of laser treatment on thyroid gland hormones in female rabbits.** *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2011, **25**(2):61-64.
156. Ladurner R, Sommerey S, Al Arabi N, Hallfeldt KK, Stepp H, Gallwas JK: **Intraoperative near-infrared autofluorescence imaging of parathyroid glands.** *Surgical endoscopy* 2017, **31**(8):3140-3145.
157. Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R: **Cutting Edge in Thyroid Surgery: Autofluorescence of Parathyroid Glands.** *J Am Coll Surg* 2016, **223**(2):374-380.
158. De Leeuw F, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben Lakhdar A, Laplace-Builhé C, Hartl D: **Intraoperative Near-infrared Imaging for Parathyroid Gland Identification by Auto-fluorescence: A Feasibility Study.** *World J Surg* 2016, **40**(9):2131-2138.
159. Liu Y, Bauer AQ, Akers WJ, Sudlow G, Liang K, Shen D, Berezin MY, Culver JP, Achilefu S: **Hands-free, wireless goggles for near-infrared fluorescence and real-time image-guided surgery.** *Surgery* 2011, **149**(5):689-698.
160. Solorzano CC, Thomas G, Baregamian N, Mahadevan-Jansen A: **Detecting the Near Infrared Autofluorescence of the Human Parathyroid: Hype or Opportunity?** *Ann Surg* 2019.

161. Kose E, Rudin AV, Kahramangil B, Moore E, Aydin H, Donmez M, Krishnamurthy V, Siperstein A, Berber E: **Autofluorescence imaging of parathyroid glands: An assessment of potential indications.** *Surgery* 2020, **167**(1):173-179.
162. Stolik S, Delgado J, Perez A, Anasagasti L: **Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2000, **57**(2-3):90-93.
163. DiMarco A, Chotalia R, Bloxham R, McIntyre C, Tolley N, Palazzo FF: **Autofluorescence in Parathyroidectomy: Signal Intensity Correlates with Serum Calcium and Parathyroid Hormone but Routine Clinical Use is Not Justified.** *World J Surg* 2019.
164. Squires MH, Jarvis R, Shirley LA, Phay JE: **Intraoperative Parathyroid Autofluorescence Detection in Patients with Primary Hyperparathyroidism.** *Ann Surg Oncol* 2019, **26**(4):1142-1148.
165. Wolf HW, Grumbeck B, Runkel N: **Intraoperative verification of parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism using near-infrared autofluorescence (IOPA).** *Updates Surg* 2019, **71**(3):579-585.
166. Di Marco AN, Palazzo FF: **Near-infrared autofluorescence in thyroid and parathyroid surgery.** *Gland Surg* 2020, **9**(Suppl 2):S136-s146.
167. Squires MH, Shirley LA, Shen C, Jarvis R, Phay JE: **Intraoperative Autofluorescence Parathyroid Identification in Patients With Multiple Endocrine Neoplasia Type 1.** *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2019, **145**(10):897-902.
168. Chang YK, Lang BHH: **To identify or not to identify parathyroid glands during total thyroidectomy.** *Gland Surg* 2017, **6**(Suppl 1):S20-s29.
169. Chew C, Li R, Ng MK, Chan STF, Fleming B: **Incidental parathyroidectomy during total thyroidectomy is not a direct cause of post-operative hypocalcaemia.** *ANZ J Surg* 2018, **88**(3):158-161.
170. Irkorucu O, Tascilar O, Cakmak GK, Emre AU, Ucan HB, Karakaya K, Comert M: **Inadvertent parathyroidectomy and temporary hypocalcemia: an adverse natural outcome or a true complication during thyroidectomy?** *Endocr Regul* 2007, **41**(4):143-148.
171. Sippel RS, Ozgul O, Hartig GK, Mack EA, Chen H: **Risks and consequences of incidental parathyroidectomy during thyroid resection.** *ANZ J Surg* 2007, **77**(1-2):33-36.
172. Vasileiadis I, Charitoudis G, Vasileiadis D, Kykalos S, Karatzas T: **Clinicopathological characteristics of incidental parathyroidectomy after total thyroidectomy: The effect on hypocalcemia. A retrospective cohort study.** *International journal of surgery (London, England)* 2018, **55**:167-174.
173. Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Prunello M, Rosenthal RJ: **Increased identification of parathyroid glands using near infrared light during thyroid and parathyroid surgery.** *Surg Endosc* 2017, **31**(9):3737-3742.
174. Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, Ko JB, Oak C, Kim Y, Lee KD: **Near-Infrared Autofluorescence Image-Guided Parathyroid Gland Mapping in Thyroidectomy.** *Journal of the American College of Surgeons* 2018, **226**(2):165-172.
175. Ladurner R, Lerchenberger M, Al Arabi N, Gallwas JKS, Stepp H, Hallfeldt KKJ: **Parathyroid Autofluorescence-How Does It Affect Parathyroid and Thyroid Surgery? A 5 Year Experience.** *Molecules* 2019, **24**(14).
176. Alesina PF, Meier B, Hinrichs J, Mohmand W, Walz MK: **Enhanced visualization of parathyroid glands during video-assisted neck surgery.** *Langenbecks Arch Surg* 2018, **403**(3):395-401.
177. Benmiloud F, Godiris-Petit G, Gras R, Gillot JC, Turrin N, Penaranda G, Noullet S, Chereau N, Gaudart J, Chiche L *et al*: **Association of Autofluorescence-Based Detection of the Parathyroid Glands During Total Thyroidectomy With Postoperative Hypocalcemia Risk: Results of the PARAFUO Multicenter Randomized Clinical Trial.** *JAMA Surg* 2019.

178. Benmiloud F, Rebaudet S, Varoquaux A, Penaranda G, Bannier M, Denizot A: **Impact of autofluorescence-based identification of parathyroids during total thyroidectomy on postoperative hypocalcemia: a before and after controlled study.** *Surgery* 2018, **163**(1):23-30.
179. Dip F, Falco J, Verna S, Prunello M, Loccisano M, Quadri P, White K, Rosenthal R: **Randomized Controlled Trial Comparing White Light with Near-Infrared Autofluorescence for Parathyroid Gland Identification During Total Thyroidectomy.** *J Am Coll Surg* 2019, **228**(5):744-751.
180. Zaidi N, Bucak E, Okoh A, Yazici P, Yigitbas H, Berber E: **The utility of indocyanine green near infrared fluorescent imaging in the identification of parathyroid glands during surgery for primary hyperparathyroidism.** *J Surg Oncol* 2016, **113**(7):771-774.
181. Jin H, Dong Q, He Z, Fan J, Liao K, Cui M: **Application of a Fluorescence Imaging System with Indocyanine Green to Protect the Parathyroid Gland Intraoperatively and to Predict Postoperative Parathyroidism.** *Adv Ther* 2018, **35**(12):2167-2175.
182. Lerchenberger M, Al Arabi N, Gallwas JKS, Stepp H, Hallfeldt KKJ, Ladurner R: **Intraoperative Near-Infrared Autofluorescence and Indocyanine Green Imaging to Identify Parathyroid Glands: A Comparison.** *Int J Endocrinol* 2019, **2019**:4687951.
183. Kahramangil B, Berber E: **Comparison of indocyanine green fluorescence and parathyroid autofluorescence imaging in the identification of parathyroid glands during thyroidectomy.** *Gland Surg* 2017, **6**(6):644-648.
184. Gálvez-Pastor S, Torregrosa NM, Ríos A, Febrero B, González-Costea R, García-López MA, Balsalobre MD, Pastor-Pérez P, Moreno P, Vázquez-Rojas JL *et al*: **Prediction of hypocalcemia after total thyroidectomy using indocyanine green angiography of parathyroid glands: A simple quantitative scoring system.** *Am J Surg* 2019, **218**(5):993-999.
185. Moore EC, Rudin A, Alameh A, Berber E: **Near-infrared imaging in re-operative parathyroid surgery: first description of autofluorescence from cryopreserved parathyroid glands.** *Gland Surg* 2019, **8**(3):283-286.

## **Anexos**

- Comunicações
- Abstract publicado
- Poster
- Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
- Autorização da Direção Geral de Agricultura e Veterinária
- Autorização da Comissão de Ética dos SAMS
- Parecer do DPO (Data Protection Officer) dos SAMS sobre o DPIA (Data protection impact assessment) do projeto
- Modelo de consentimento para tratamento de dados pessoais
- Modelo de consentimento informado para cirurgias
- Autorizações editoriais para reprodução de figuras e artigos

Comunicações livres

1- Serra C, Silveira L, Canudo A

Identificação intraoperatória das glândulas paratiroides por autofluorescência em cirurgia do hiperparatiroidismo primário

XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Março de 2019

2- Serra C, Bentes N, Silveira L, Canudo A

Identificação por autofluorescência de glândulas paratiroideias incidentalmente excisadas em cirurgia da tiroideia

XL Congresso Nacional de Cirurgia (Evento Virtual) Novembro de 2020

Palestra por convite

- Serra C

Fluorescence in endocrine surgery

Online Course: Use of fluorescence in surgery

Lusíadas Saúde, Dezembro de 2020

Abstracts publicados

1- Serra C, Silveira L, Canudo A.

Revista Portuguesa de Cirurgia, Março de 2019, Suplemento; 162-163

Identificação intraoperatória das glândulas paratiroides por autofluorescência em cirurgia do hiperparatiroidismo primário



RESUMO DE COMUNICAÇÃO

SESSÃO: CO-END

TÍTULO: **Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides por auto-fluorescência em cirurgia do hiperparatiroidismo primário**

RESUMO: **Objetivo/Introdução:** A identificação intra-operatória das glândulas paratiroides é sempre um desafio para os cirurgiões envolvidos na cirurgia tiroideia e paratiroideia. Em 2011 Paras e Cols mostraram que as paratiroides submetidas a fonte de luz infra-vermelho próximo emitem auto-fluorescência, permitindo a sua distinção dos restantes tecidos cervicais. Desde então alguns estudos vieram confirmar a utilidade da técnica. Neste



trabalho apresentamos os resultados da utilização de um dispositivo de baixo custo, por nós desenvolvido, na identificação das glândulas paratiroides em cirurgia do hiperparatiroidismo primário **Material e Métodos:** Em cinco doentes com hiperparatiroidismo primário operados no nosso hospital, apresentando ecografia cervical e cintigrafia com Sestamibi não concordantes foi utilizada fonte LED 780 nm para desencadear auto-fluorescência, visualizada com dispositivo de visão nocturna com filtro de 810 nm acoplado. **Resultados:** Nos cinco doentes foi identificado e excisado nódulo de maior fluorescência, sendo a natureza do mesmo confirmada em exame extemporâneo. Em todos os casos foi identificada a outra glândula homolateral. Doseamentos de PTH intra-operatória mostraram em todos os casos descida significativas face aos valores basais, cumprindo os critérios de Miami. **Discussão:** A utilização da auto-fluorescência para identificação das glândulas paratiroideias tem aplicação clínica na cirurgia do hiperparatiroidismo, sendo a sua utilidade acrescida em situações de não concordância cintigrafia-ecografia

HOSPITAL: Hospital dos SAMS  
SERVIÇO: Departamento de Cirurgia, Hospital dos SAMS (1), Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (2)  
CAPÍTULO: Cirurgia Endócrina e da Cabeça e Pescoço  
AUTORES: Carlos Serra (1,2), Luis Silveira (2), António Canudo (1)  
CONTACTO: Carlos Serra  
E-MAIL: caaserra@netcabo.pt

2- Serra C, Bentes N, Silveira L, Canudo A

Revista Portuguesa de Cirurgia , Maio de 2021, Suplemento, 76

Identificação por autofluorescência de glândulas paratiroideias incidentalmente excisadas em cirurgia da tiroideia



Capítulo  
Cirurgia Endócrina

**Resumo de Comunicação**

Sessão: C.O. Endócrino  
ID Resumo: 3134780  
Tipo: Comunicação oral

CAPÍTULO: Cirurgia Endócrina e da Cabeça e Pescoço  
TÍTULO: *Identificação por autofluorescência de glândulas paratiroideias incidentalmente excisadas em cirurgia da tiroideia*

RESUMO: **Introdução:** A excisão incidental de glândulas paratiroideias é comum durante a cirurgia tiroideia, não sendo o seu significado clínico óbvio, o que não invalida a necessidade de se desenvolverem todos os esforços para a preservação das glândulas in situ. Os autores apresentam aqui os resultados da utilização de um dispositivo por eles desenvolvido na detecção por autofluorescência de glândulas incidentalmente excisadas. **Material e Métodos:** Em 40 tireoidectomias consecutivas as peças operatórias foram imediatamente inspeccionadas. A localização das áreas fluorescentes suspeitas foi confrontada com o exame anátomo-patológico. Determinações de cálcio e PTH foram efectuadas às 24 horas, 15 dias e 180 dias. **Resultados:** Foram detectadas 8 áreas fluorescentes suspeitas, sendo 7 coincidentes com o tecido paratiroideu identificado no exame histológico e 1 falso positivo. Uma paratiroide intratiroideia não foi identificada, resultando valores de sensibilidade de 87,5% e especificidade (96,2%). 13 pacientes (32,5%) apresentaram hipocalcémia às 24 horas. Ao 15º dia apenas um paciente mantinha hipocalcémia com normalização aos 180 dias. Exame anátomo-patológico identificou 8 fragmentos de paratiroide (em 7 doentes), não existindo correlação entre a presença deste tecido e a ocorrência de hipocalcémia ( $p=0,254$ ). **Discussão:** Apesar de não termos demonstrado correlação entre a paratiroidectomia incidental e a hipocalcémia, a autofluorescência pode ter utilidade para a detecção de glândulas paratiroideias incidentalmente excisadas.



HOSPITAL: Hospital dos SAMS  
SERVIÇO: Departamento de Cirurgia do Hospital dos SAMS (1), Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (2), Serviço de Cirurgia do Hospital de Vila Franca de Xira (3)  
AUTORES: Carlos Serra (1,2), Nuno Bentes (1,3), Luis Silveira (2), António Canudo (1)  
NOME: Carlos Serra  
E-MAIL: caaserra@netcabo.pt

Revista Portuguesa de Cirurgia

76

Poster

1 – Serra C, Bentes N, Silveira L, Canudo A  
 8th Conference of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES 2019)  
 Granada, Spain  
 May 16-18, 2019  
 Parathyroid identification by autofluorescence – preliminary report on five cases of surgery for primary hyperparathyroidism  
 Abstract ID: 13, Poster Number: 10

### PARATHYROID IDENTIFICATION BY AUTOFLUORESCENCE PRELIMINARY REPORT ON SURGERY FOR PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM

Serra, Carlos ; Bentes, Nuno ; Silveira, Luis ; Canudo, Antonio .  
 1. Hospital dos SAMS, Lisboa, Portugal 2. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

**Purpose**  
 Intra-operative identification of parathyroid glands is always a challenge for surgeons performing parathyroid or thyroid surgery. In this study we present the results of the utilization of a low-cost device that we developed in the identification of parathyroid glands in surgery for primary hyperparathyroidism.

**Methods**  
 In 5 patients operated in our hospital with the diagnosis of primary hyperparathyroidism and non concordant ultrasonography and MIBI-Scan we used a 780 nm LED (figure 1) to irradiate the cervical area. The resulting auto-fluorescence was visualized with night vision goggles with a 810 nm filter assembled (figure 2).

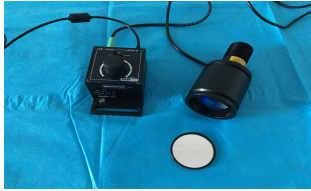


Figure 1 - LED 780 nm with 769 nm bandpass filter


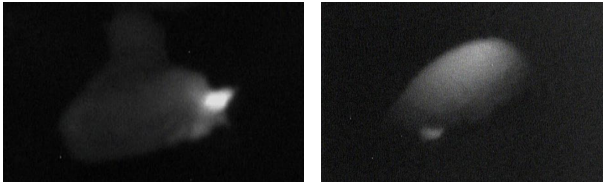


Figure 2 - Night vision goggles with a 810 nm filter

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Non Concordance	Surgery	Pt. Identified/ sought
1	F	51	Primary Hyperparathyroidism	Sestambi - Hyperfixation on PIII right Ultrasound - PIII left	Excision of right inferior parathyroid	2/2
2	F	72	Primary Hyperparathyroidism	Sestambi - negative Ultrasound - PIII right	Excision of right superior parathyroid	2/2
3	F	68	Primary Hyperparathyroidism Nodule on right lobe of thyroid	Sestambi - negative Ultrasound - intrathyroid nodularity	Excision of right superior parathyroid Right thyroid lobectomy	2/2
4	F	49	Primary Hyperparathyroidism Nodule on right lobe of thyroid	Sestambi - PIV left Ultrasound - PIV right	Excision of right superior parathyroid Right thyroid lobectomy	2/2
5	M	26	Primary Hyperparathyroidism	Sestambi - PIII right Ultrasound - negative	Excision of right superior parathyroid	2/2

**Results**

In all five patients it was possible to identify the two autofluorescent parathyroid glands sought.



Patient	Pre-op calcium	Pre-op PTH	IO PTH max	IO PTH min	% PTH	Ca 24 h	PTH 24h	Ca 15 d	Ca 15 d
1	12	267	388	31,8	-90%	8,4	8,9	9,0	32
2	11,4	102	171	19	-88%	8,5	26	9,9	44
3	10,6	139	-	-	-	8,6	50	9,7	91
4	10,8	142	114	18,9	-83%	9,4	3	8,5	52
5	11,8	209	100	4	-96%	8,9	3	8,8	86

**Conclusion**

The utilization of autofluorescence for intra-operative identification of parathyroid glands has clinical application in surgery for primary hyperparathyroidism, being of special utility when ultrasonography and sestamibi scan are non concordant.

- Paras C, Keller M, White L, Phay J, Mahadevan-Jensen A (2011) Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. J Biomed Opt 16 (6):067012.  
 - Kim SW, Lee HS, Ahn Y-C, Park CW, Jeon SW, Kim CH, Ko JB, Oak C, Kim Y, Lee KD (2018) Near-Infrared Autofluorescence Image-Guided Parathyroid Gland Mapping in Thyroidectomy. Journal of the American College of Surgeons 229 (2):165-172.  
 - Liu Y, Rieger AQ, Akers WJ, Sudlow G, Liang K, Shen D, Berzin MY, Culver JP, Achilefu S (2011) Hands-free, wireless goggles for near-infrared fluorescence and real-time image-guided surgery. Surgery 149(5):689-698.  
 - Falco J, Dip F, Quadri P, de la Fuente M, Rosenthal R (2016) Cutting edge in thyroid surgery: autofluorescence of parathyroid glands. Journal of the American College of Surgeons 223 (2):374-380

2 – Serra C, Bentes N, Silveira L, Canudo A  
 9<sup>th</sup> Biennial Congress of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES 2020)  
 Athens, Greece  
 May 28-30, 2020  
 Identification of inadvertently removed Parathyroid glands during Thyroid surgery by  
 Autofluorescence. Aceite para apresentação . Evento cancelado

9th BIENNIAL CONGRESS  
 OF THE EUROPEAN SOCIETY  
 OF ENDOCRINE SURGEONS



28-30  
 MAY  
 2020  
 Megaron  
 Athens International  
 Conference Center  
 ATHENS, GREECE

25  
 HOSPITAL  
 SAMS  
 1994 | 2019

FACULDADE  
 CIÊNCIAS DA SAÚDE

## IDENTIFICATION OF INADVERTENTLY REMOVED PARATHYROID GLANDS DURING THYROID SURGERY BY AUTOFLUORESCENCE

Serra, Carlos <sup>1,2</sup>; Bentes, Nuno <sup>1</sup>; Silveira, Luis <sup>1</sup>; Canudo, Antonio <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hospital dos SAMS, Lisboa, Portugal  
<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

### Background

Incidental excision of parathyroid glands is a common event on thyroid surgery occurring in 5,2 to 21,6 % of cases, without an obvious clinical significance, since divergent results can be obtained from the literature. Even though, all efforts must be done to preserve parathyroid glands *in situ* or if necessary to autotransplant the excised gland.

Facing the autofluorescence emitted by parathyroid glands, that persists even with devascularized glands, the authors start to use an own device to inspect thyroidectomy specimens for incidentally removed parathyroid tissue.

### Methods

Specimens of 40 consecutive thyroid surgeries were immediately inspected with the utilization of a device composed by a 780 nm LED and night-vision goggles, with bandpass filters assembled. Localization of suspect high-fluorescence spots were recorded for confrontation with pathological exam. Determinations of calcium and PTH were done before surgery and 24 hours and 15 days after.



Figure 1 - Inspection of the sample



Figure 2 - Parathyroid fragment (bright spot) on a heterogeneous thyroid lobe

Table 1 Demographic, pathological and operative data

Variables	Number of patients (%)	Number of patients (%) with IPS	P value	Test value
Sex				
Male	7 (17.5)	2 (28.5)	0.408	0.415
Female	33 (82.5)	5 (15.2)		
Surgery				
Total/completion	36 (90.0)	7 (18.4)	0.448	0.943
Hemithyroidectomy	4 (10.0)	0		
Thoracic goiter				
Yes	5 (12.5)	0	0.283	0.174
No	35 (87.5)	7 (20.0)		
Malignancy				
Yes	7 (17.5)	2 (28.5)	0.355	0.720
No	33 (82.5)	5 (15.2)		
Thyroiditis				
Yes	6 (15.0)	1 (16.7)	0.721	0.003
No	34 (85.0)	5 (14.7)		
24 h hypocalcemia				
Yes	13 (32.5)	1 (7.6)	0.254	1.283
No	27 (67.5)	6 (22.2)		

IPS, incidental parathyroid tissue on specimen.

### Results

Patients ages ranged from 36 to 83 years, with predominance of female sex (82,5%). 24 hours postoperative calcium varied between 7,1 and 9,5 . 24 hours postoperative PTH varied between 3 and 77,0 .

13 patients (32,5 %) presented biochemical hypocalcemia at 24 hours.

At postoperative day 15, just one patient presented calcium below 8 (PTH 10,9) with complete normalization 6 months after surgery.

Pathological examination identified 8 parathyroid fragments (7 patients).

There was no correlation between the presence of parathyroid tissue in the specimen and postoperative hypocalcemia ( $p=0,254$ ).

8 suspicious areas of augmented fluorescence were detected, 7 coincident with the pathological examination and 1 false positive (Colloid nodule). One intrathyroid gland was not identified, thus resulting a sensitivity of 87,5% and specificity 96,2%.

Table 2 Parathyroid glands on sample

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Pt S	Pt AF	C/P	Loc	Suspension	Hypocalcemia
1	M	79	Multinodular goiter	1	1	P	EC	No	No
2	F	70	Multinodular goiter	1	1	P	EC	No	No
3	M	73	Normal thyroid (totalization)	1	1	P	EC	No	No
4	F	62	Multinodular goiter	2	1	P; C	IC; IT	No; no	No
5	F	66	Papillary carcinoma	1	1	P	IC	No	No
6	F	36	Multinodular goiter	1	1	P	IC	No	No
7	F	38	Multinodular goiter	1	1	P	EC	Yes	Yes

M, male; F, female; Pt S, number of parathyroid glands found on pathological exam; Pt AF, number of parathyroid glands found by autofluorescence; C, complete gland; P, fragment of gland; Loc, localization regarding thyroid gland; EC, extracapsular; IC, Intracapsular; IT, intrathyroidal (surrounded by parenquima).

### Conclusion

Although we couldn't demonstrate correlation between incidental parathyroidectomy and hypocalcemia, autofluorescence may be an useful tool for in-table identification of incidentally removed glands.

- Sakorafas GH, Stafilys V, Bramis C, Kotziopoulos N, Kuletis T, Katsarou G. Incidental parathyroidectomy during thyroid surgery: an underappreciated complication 32 of thyroidectomy. World J Surg. 2005;29(12):1539-43 (London, England). 2018;50:167-74.
- Parsa C, Keller M, White L, Pines J, Mahadevan-Jansen A. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands. J Biomed Opt. 4 2011;16(6):067012.
- Serra C, Silveira L. Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device. ANZ J Surg. 2019; doi: 10.1111/ans.15597
- Albadi M, De Lencastre F, Divasoli I, Casaraghi G, Lakhadar AB, Ghannem W, et al. Parathyroid gland management using optical technologies during thyroidectomy or parathyroidectomy: A systematic review. Oral oncology. 2018;87:186-96; doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.11.011.



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PARECER**

**Processo:** CE-FCS-2014-022

**Tema Projecto/Proponente:** “*Identificação das glândulas paratiroideias por auto-fluorescência de infra-vermelho próximo. Estudo em tecido animal*” – Exmo. Senhor Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra

Exmo. Sr. Presidente da Faculdade de Ciências da Saúde

Apreciado o pedido referente ao processo acima mencionado esta Comissão não detectou matéria que ofenda os princípios éticos.

Covilhã, 19 de Dezembro de 2014

  
O Presidente da Comissão de Ética  
Prof. Doutor José Martinez de Oliveira

2018-03-19 005330

Ex<sup>ma</sup> Senhor  
Doutor Carlos Alberto de Almeida Serra  
Universidade da Beira Interior  
Centro de Investigação em Ciências da Saúde  
Av. Infante D. Henrique  
6200 – 506 COVILHÃ

Nossa referência  
0421/000/000  
/2018

Vossa referência

Vossa data

Assunto: **PROTEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS – PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efetuado por V. Ex<sup>a</sup> no sentido de poder ser autorizada a realização do projeto experimental designado "Identificação intra-operatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infra-vermelho próximo – Estudo em modelo animal" tendo por investigador responsável o Doutor Luis Filipe Silveira, cabe-me informar que o mesmo foi avaliado de acordo com o Artigo 44º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".

Mais se informa V. Ex<sup>a</sup> que esta Direção Geral, depois de esclarecidas as dúvidas que a sua análise nos levantou, o projeto em apreço recebeu uma avaliação favorável e foi autorizado de acordo com o nº 1, do Artigo 42º do mesmo diploma legislativo.

Para além disso, e dado os procedimentos a realizar aos animais serem classificados, em termos de severidade infligida aos animais, com as categoria de **Ligeiro** e **Moderado**, é primordial fazer-se, no decorrer do desenvolvimento do projeto, uma adequada monitorização dos sinais de dor, sofrimento ou angústia dos animais submetidos aos procedimentos, por forma a poder fazer-se uma atualização sobre o nível de dor, sofrimento ou angústia efetiva a que os mesmos possam ficar sujeitos, nomeadamente, de tipo **Severo**, o que, a acontecer, implicará a submissão do projeto a uma avaliação retrospectiva, de acordo com o ponto 3, do artigo 45º, do documento legislativo acima referido.

Finalmente, resta-me especificar, de acordo com o discriminado no nº 2, do Artigo 46º, do atrás referido Decreto-Lei, o seguinte:

- O utilizador que realiza o projeto: Diretor da Escola de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior;
- A pessoa responsável pela execução global do projeto e pela sua conformidade com a autorização do mesmo: Doutor Luis Filipe Silveira;
- O estabelecimento onde o projeto vai ser realizado: Biotério de alojamento de pequenos roedores, da Escola de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Com os melhores cumprimentos,

 O Diretor Geral

GRAÇA MARIANO

Fernando Bernardo

Substituta-Geral

Por Delegação de Competências nº 12091/2016

Publicado no DRE Iª série nº 201 de 19 de outubro de 2016

DBEA/APM



**Relatório e Parecer do DPO sobre DPIA**

**Autor: Dr. Carlos Serra**

**Data da Realização: 21 de Fevereiro de 2019**

**Data de Envio: 21 de Fevereiro de 2019**

**Versão: 1.0**

**1. Introdução**

O presente DPIA foi-nos apresentado pelo Dr. Carlos Serra para realização de um estudo/ensaio clínico tendo como sujeitos pacientes do próprio, que são utentes do SAMS.

Juntou o respectivo DPIA e a minuta de consentimento.

Apresenta um risco baixo e um número de envolvidos muito baixo (menos de 70 pacientes).

**2. Consulta Prévia**

Não é necessária consulta prévia

**3. Parecer**

Face ao referido no DPIA e à análise efectuada, não são necessárias grandes considerações, uma vez que, formalmente, o DPIA respeita as orientações do RGPD.

Propomos, para mitigação do risco, que, sublinhamos, já é baixo, o utente fique com cópia do consentimento e que não use o código identificador exatamente como ele existe no sistema, propondo-se que faça alguma manipulação sobre ele ou usar uma tabela de pseudonimização.

Nada mais há a dizer.

Lisboa, 25 de Fevereiro de 2019

O DPO



(José Pereira da Costa)



Lisboa, 13.03.2019

Exmo. Senhor Dr. Carlos Serra,

Em resposta ao pedido efectuado a este Hospital para a realização do Estudo "Identificação intra-operatória das glândulas parotídeas com fluorescência de infravermelho próximo", informamos que a Comissão de Ética dos SAMS, decidiu aceitar a documentação entregue em justificação das questões colocadas.

No mesmo sentido informamos que, face à aprovação do DPO – SBSI, Dr. José Pereira da Costa cujo relatório e parecer se anexa, se encontram reunidas todas as condições exigidas, pelo que foi autorizado a realização do Estudo solicitado.

Com os melhores cumprimentos,

Prof. Dr. Costa Martins

Presidente da Comissão de Ética

## Consentimento para tratamento de dados pessoais

Sr. (Sr.ª)

O Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra, como responsável pelo tratamento de dados, com o email [carlos.serra@sams.sbsi.pt](mailto:carlos.serra@sams.sbsi.pt) propôs-me participar num estudo de investigação sobre a Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides por autofluorescência de infravermelho próximo.

Fui informado de que sou livre de aceitar ou recusar e isso não mudará as nossas relações no que diz respeito à cirurgia e subsequentes consultas de seguimento a efectuar no Hospital dos SAMS e Centro Clínico SAMS SBSI.

A fim de esclarecer a minha decisão recebi, e bem compreendi, as informações seguintes relativamente à Proteção de dados:

- A investigação é destinada a estudar a eficácia da identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com a utilização da autofluorescência nomeadamente na prevenção da hipocalcémia pós-
- Os procedimentos que irão ser realizados pelo investigador A NIVEL DA PROTEÇÃO DE DADOS incluem:
  - Fornecer um certo número de dados pessoais , clínicos e laboratoriais presentes em formulários preparados e validados para esse fim. Todos são confidenciais e não estão acessíveis a manipulação por estranhos.
  - Os dados recolhidos serão utilizados com a finalidade de pesquisa médica clínica ou fundamental e serão tratados e apresentados de forma totalmente anónima - Dados do ensaio, associados a um código que não permite a sua identificação direta, comunicados pelos investigadores e membros da equipa de investigação aos responsáveis pelo tratamento, para as finalidades descritas em cumprimento com as disposições legais e regulamentares. As entidades que podem ter acesso aos dados pessoais não pseudonimizados (não codificados) são o investigador, as comissões de ética e as autoridades reguladoras.
  - A qualquer momento, é meu direito o acesso aos dados que me digam respeito, retificação dos mesmos o ou direito de retirar o consentimento em

qualquer altura, devendo este ser efetuado através do Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra

- É meu direito apresentar reclamação a uma autoridade de controlo.
- Entende-se como adequado um prazo de conservação dos dados de 25 anos (Regulamento nº 536/2014 de 16 de abril). Em situações devidamente justificadas, este prazo poderá ser alargado.
- Poderei a todo o momento pedir informação complementar ao Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra, e se o desejar, parar a minha participação sem suportar nenhuma responsabilidade.
- Conservo todos os meus direitos garantidos na lei.
- O meu consentimento não liberta em nada os investigadores responsáveis deste trabalho das suas responsabilidades.
- Conforme o RGPD o titular dos dados tem os seguintes direitos:
  - Direito de acesso do titular de dados (art.º15)

O titular dos dados tem o direito de obter do responsável pelo tratamento o acesso aos seus dados pessoais.
  - Direito de retificação (art.º16)

O titular tem o direito de obter do responsável pelo tratamento a retificação dos dados pessoais inexatos que lhe digam respeito.
  - Direito ao apagamento dos dados (art.º 17)

O titular tem o direito de obter do responsável pelo tratamento o apagamento dos seus dados pessoais.
  - Direito à limitação do tratamento (art.º18º)

O titular dos dados tem o direito de obter do responsável pelo tratamento a limitação do tratamento em certas situações.
  - Direito de portabilidade de dados (art.º20)

O titular dos dados tem o direito de receber os dados pessoais que lhe digam respeito e que tenha fornecido a um responsável pelo tratamento, num formato estruturado, de uso corrente e de leitura automática, e o direito de transmitir esses dados a outro responsável pelo tratamento.
  - Direito de oposição (art.º21)

O titular dos dados tem o direito, em certas situações, de se opor a qualquer momento, por motivos relacionados com a sua situação particular, ao tratamento dos dados pessoais que lhe digam respeito.

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Aceito participar nesta investigação nas condições acima referidas.

Autorizo a recolha, escolha e tratamento dos meus dados, apenas pelo Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra, e eventualmente por um representante das autoridades de saúde.

(Assinatura)

20

Confirmo que, sobre este estudo, tudo foi explicado ao participante acima referido.

O Médico Cirurgião,

**Dr. Carlos Alberto de Almeida Serra**

## IDENTIFICAÇÃO INTRAOPERATÓRIA DAS GLÂNDULAS PARATIROIDEIAS POR FLUORESCÊNCIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Eu, abaixo-assinado

:

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a avaliar a eficácia da deteção intra-operatória das glândulas paratiroideias durante a cirurgia da tiroideia/ paratiroideia que até ao momento tem dependido da acuidade visual do cirurgião, pela sua iluminação com uma fonte de luz infra-vermelha próxima (780 nm).

Sei que este estudo não comporta qualquer risco acrescido á cirurgia a que serei submetido, nem serão efetuados exames ou análises extra àqueles que a minha situação clínica obriga.

Fui informado que a intensidade da fonte luminosa utilizada não tem qualquer efeito nocivo nos tecidos, não sendo utilizado qualquer tipo de radiação ionizante. Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto .

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo

Data

Assinatura

Nome do Médico Responsável - Dr. Carlos Serra

Data

Assinatura

**Submission ID:** 1084262

Date: 05 Nov 2020 10:51am

**Name:** Dr Carlos Serra

Institute/company: Hospital do SAMS

Address: Rua Cidade de Gabela 1

Post/Zip Code: 1800-083

City: Lisboa

State/Territory: Lisboa

Country: Portugal

Telephone:

Email: [caaserra@me.com](mailto:caaserra@me.com)

**Type of Publication:** Journal

Title: Semin Ultrasound CT MR

Auhtors: Policeni

Year: 2012

From page: 104

To page: 114

ISSN: [0887-2171](#)

Volume: 33

Issue: 2

Article title: Anatomy and embriology of the thyroid and parathyroid glands

**I would like to use:** Illustration(s)

Quantity of material: Figures 10, 13 and 14

I am the author of the Elsevier material: No

Elsevier author is involved in my project: No

In what format will you use the material: Print and Electronic

Translation: Yes, not including English language

Language(s): Portuguese

**Proposed use:** Reuse in a thesis/dissertation

Material can be extracted: No

**Additional Comments / Information:**



Dear Carlos

We hereby grant you permission to reprint the aforementioned material at no charge **in your thesis, in print and on the University web site** subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year).”

3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

This includes permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Kind Regards

Anita

**Anita Mercy**

Senior Copyrights Coordinator - Copyrights Team

**Elsevier** | Health Content Operations

(A division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd.)

Ascendas International Tech Park, Crest - 12th Floor|Taramani, Chennai 600113 • India|

Tel: [+91 4442994696](tel:+914442994696)

[a.vethakkan@elsevier.com](mailto:a.vethakkan@elsevier.com)

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	<a href="#">5043300133338</a>
License date	Apr 06, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Surgical Oncology Clinics of North America
Licensed Content Title	Surgery for Thyroid Cancer
Licensed Content Author	Ziv Gil,Snehal G. Patel
Licensed Content Date	Jan 1, 2008
Licensed Content Volume	17
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	28
Start Page	93
End Page	120
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Are you the author of this Elsevier article? No

Will you be translating? No

Title Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com fluorescência de infravermelho próximo

Institution name Faculdade de Ciências da Saúde

Expected presentation date Dec 2020

Portions Chapter Surgery for Thyroid Cancer figures 1 and 2

Dr. Carlos Serra  
Rua Abade Faria 20

Requestor Location Lisboa, Lisboa 1900  
Portugal  
Attn: Dr. Carlos Serra

Publisher Tax ID GB [494 6272 12](#)

Customer VAT ID PT507681134

Total 0.00 EUR

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	<a href="#">5054830172709</a>
License date	Apr 23, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Langenbeck's Archives of Surgery
Licensed Content Title	The thyroid gland in works of famous old anatomists and great artists
Licensed Content Author	Mile Ignjatović
Licensed Content Date	Jul 6, 2010
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	6
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Title	Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com fluorescência de infravermelho próximo
Institution name	Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2020
Portions	Figure 6
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra
Customer VAT ID	PT507681134
Billing Type	Invoice
Billing Address	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Portugal 1900 Attn: Dr. Carlos Serra
Total	0.00 EUR

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	<a href="#">5053830469331</a>
License date	Apr 21, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Surgery
Licensed Content Title	A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands
Licensed Content Author	Melanie A. McWade,Constantine Paras,Lisa M. White,John E. Phay,Anita Mahadevan-Jansen,James T. Broome
Licensed Content Date	Dec 1, 2013
Licensed Content Volume	154
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	7
Start Page	1371
End Page	1377
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com fluorescência de infravermelho próximo
Institution name	Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2020
Portions	1,2
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra
Publisher Tax ID	GB <a href="#">494 6272 12</a>
Customer VAT ID	PT507681134
Total	0.00 USD

SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

The publisher has provided special terms related to this request that can be found at the end of the Publisher's Terms and Conditions.

License Number	<a href="#">5085450164122</a>
License date	Jun 10, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Lasers in Medical Science
Licensed Content Title	Near-infrared irradiation of the thyroid area: effects on weight development and thyroid and parathyroid secretory patterns
Licensed Content Author	Carlos Serra et al
Licensed Content Date	May 6, 2019
Type of Use	I don't see my intended use
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Is this reuse sponsored by or associated with a pharmaceutical or a medical products company?	no
Author of this Springer Nature content	yes
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20 Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Customer VAT ID	PT507681134
Billing Type	Invoice
Billing Address	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Portugal 1900 Attn: Dr. Carlos Serra
Total	0.00 USD

# Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

The publisher has provided special terms related to this request that can be found at the end of the Publisher's Terms and Conditions.

License Number	<a href="#">5085450103220</a>
License date	Jun 10, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Indian Journal of Surgery
Licensed Content Title	Development of a Low-Cost Portable Device for Identification of Parathyroid Glands Using Autofluorescence
Licensed Content Author	Carlos Serra et al
Licensed Content Date	Apr 23, 2020
Type of Use	I don't see my intended use
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Is this reuse sponsored by or associated with a pharmaceutical or a medical products company?	no
Author of this Springer Nature content	yes
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Customer VAT ID	PT507681134
Billing Type	Invoice
Billing Address	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20  Lisboa, Portugal 1900 Attn: Dr. Carlos Serra
Total	0.00 USD

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

JOHN WILEY AND SONS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 13, 2021

---

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number [5084721431468](#)

License date Jun 09, 2021

Licensed Content  
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content  
Publication ANZ Journal of Surgery

Licensed Content  
Title Autofluorescence of parathyroid glands: still detectable with an affordable device

Licensed Content  
Author Carlos Serra, Luís Silveira

Licensed Content  
Date Nov 28, 2019

Licensed Content  
Volume 90

Licensed Content  
Issue 7-8

Licensed Content  
Pages 44

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type Author of this Wiley article

Format Print and electronic

Portion Full article

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Will you be translating?	No
Title	Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com fluorescência de infravermelho próximo
Institution name	Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2021
Order reference number	1
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20 Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	PT507681134
Total	0.00 USD

# Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Oct 13, 2021

---

---

This Agreement between Dr. Carlos Serra ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number [5166150395578](#)

License date Oct 11, 2021

Licensed Content  
Publisher Springer Nature

Licensed Content  
Publication Journal of Fluorescence

Licensed Content Title Spectroscopic Analysis of Parathyroid and Thyroid Tissues by  
Ground-State diffuse Reflectance and Laser Induced Luminescence:  
a Preliminary Report

Licensed Content  
Author Carlos Serra et al

Licensed Content Date Jul 20, 2021

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type academic/university or research institute

Format print and electronic

Portion full article/chapter

Will you be  
translating? no

Circulation/distribution 1 - 29

Author of this Springer  
Nature content yes

## Identificação intraoperatória das glândulas paratiroideias por fluorescência de infravermelho próximo

Title	Identificação intra-operatória das glândulas paratiroides com fluorescência de infravermelho próximo
Institution name	Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2021
Order reference number	1
Requestor Location	Dr. Carlos Serra Rua Abade Faria 20 Lisboa, Lisboa 1900 Portugal Attn: Dr. Carlos Serra
Customer VAT ID	PT507681134
Total	0.00 USD