

CARACTERIZACION DEL ACOPLAMIENTO DE UNA FUENTE DE LUZ LED A UNA FIBRA OPTICA CON APLICACIÓN EN LA TERAPIA FOTODINAMICA (TFD) DEL CANCER CERVIX

ETCHEVERRY, María Eugenia¹, PASQUALE, Miguel Angel^{2,3}, y GARAVAGLIA, Mario^{1,4}

¹Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

²Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, (UNLP).

³Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) (CCT CONICET La Plata, UNLP y CIC).

⁴Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp) (CCT CONICET La Plata, y CIC).
me_etccherry@hotmail.com

1. Introducción

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en la activación con luz de longitud de onda apropiada de un fotosensibilizador en presencia de oxígeno, causando la muerte de las células tumorales del tejido afectado [1-3]. Cualquier fuente que emita en la zona de absorción del fotosensibilizador y capaz de penetrar suficientemente en el tejido puede usarse en la TFD. El espectro de absorción de los fotosensibilizadores actualmente utilizados presenta una banda de absorción intensa a 420 nm (Banda de Soret) y bandas Q de menor intensidad, siendo la más prominente la que se encuentra a 650 nm. Para algunas neoplasias de alta incidencia [4-9], como resulta ser el cáncer de cuello uterino [10,11], la ventana óptica en la cual la luz llega a la zona afectada es suficientemente amplia para iluminar con luz de longitud de 405 nm. La aplicación efectiva de la TFD requiere no solo que la concentración del fotosensibilizador en el tumor sea suficiente, sino también que la cantidad de luz proveniente de la fuente sea apropiada. En este trabajo se estudia en efecto de la luz roja de 652 y 633 nm, y luz de 405 nm sobre cultivos celulares de células tumorales HeLa de cáncer de cérvix humano. La luz proveniente de las fuentes se concentra mediante espejos o la adaptación de un sistema de fibras ópticas. La emisión de las fuentes se caracteriza radiométrica y fotométricamente: la intensidad de luz emitida por la fuente empleada cumple con la ley del cuadrado de la distancia y la absorción depende de la concentración de droga fotosensibilizadora. Las curvas de mortalidad celular frente al tratamiento fotodinámico (porcentaje de células muertas) se correlacionan con la cantidad de luz que llega de la fuente y es absorbida por la droga, siendo significativamente más efectivo el tratamiento con luz de 405 nm en comparación con luz roja a igual fluencia ($J\ cm^{-2}$). Teniendo en cuenta estos resultados se propone el acoplamiento de la fuente con una fibra óptica posibilitando la aplicación local de la TFD con alta intensidad de luz. Los resultados de este trabajo tendrían un impacto en el hecho de iluminar zonas específicas mediante fibra óptica aprovechando las cavidades naturales (cuello uterino).

2. Experimental

2.1 Fuente de luz

El tejido humano es un medio altamente dispersivo que presenta cromóforos biológicos responsables de determinar una ventana óptica de iluminación. El rango de la misma varía desde los 600 nm hasta 800 nm.

Las fuentes utilizadas para iluminar los cultivos en las respectivas experiencias fueron una fuente Láser y fuentes no láser (Fig. 1). La primera corresponde a un Láser (Biolitec Cerelas with Medlight FD1 optical fiber) de $654\ nm \pm 2,4\ nm$ con 0,62 W y 1,1 W como

potencia de emisión. Las otras fuentes son LEDs que emiten luz de 633 y 405 nm (Fig. 1). Eventualmente se empleó un adaptador óptico –diseñado y construido a propósito– para concentrar la luz emitida por el LED (Fig. 2).

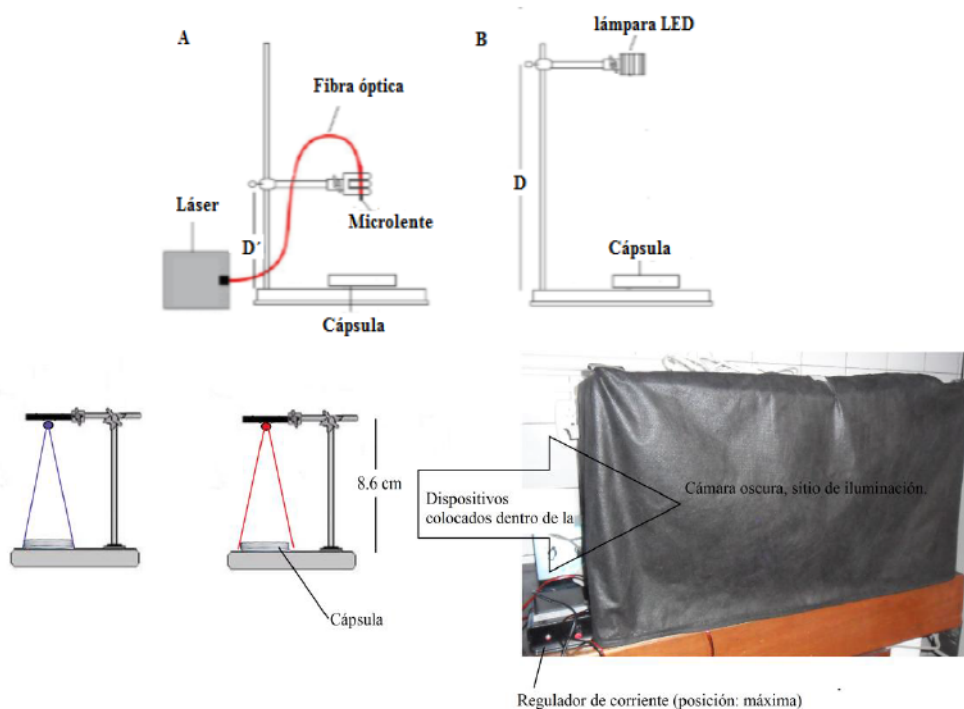


Figura 1. Esquema de las fuentes utilizadas para la iluminación. (a) Fuente láser, (b) fuente LED. Las fuentes LED que se emplearon emiten luz de longitudes de onda de 633 y 405 nm. En la parte inferior se muestra el arreglo experimental para la aplicación de la TFD en cultivos. Las distancias de la fuente al cultivo se regula de manera de que la tasa de fluencia sea

comparable

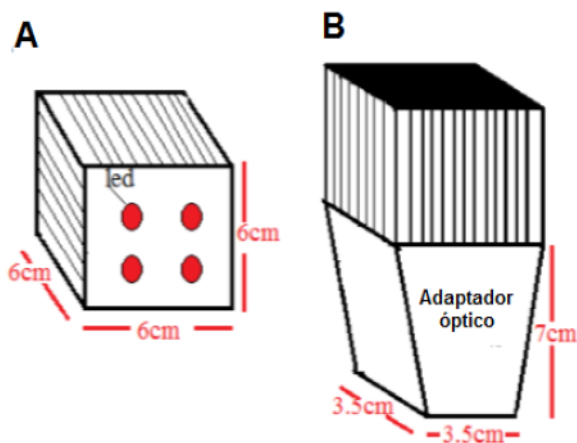


Figura 2. Lámpara LED de 633 nm sin adaptador óptico(A) y con adaptador (B) a la salida del haz de iluminación.

2.2 Cultivos celulares

Los cultivos celulares se prepararon sembrando 50000-100000 células en cápsulas de Petri de 3,6 cm de diámetro. Después de 24 hs, los cultivos se incubaron con la temoporfirina (**m-tetrahidroxifenilclorina, mTHPC, Foscan[®]**) en concentración de 0,5 µg/ml en medio de mantenimiento durante 24 hs, luego se lavaron e iluminaron. La viabilidad celular se midió por conteo de células teñidas apropiadamente y por medio de ensayos colorimétricos.

3. Resultados

3.1. Radiometría y Fotometría

Para caracterizar a las fuentes de iluminación se siguió el hecho de que el flujo luminoso emitido por una lámpara puede ser obtenida mediante el uso de la esfera integradora, teoría desarrollado por Ulbricht (1920). A través de la curva de sensibilidad espectral de un observador universal, se puede expresar el flujo radiante $V(\lambda)$ en términos de flujo luminoso [12,13].

$$F = K \int_{\text{visible}} V(\lambda)\phi(\lambda)d\lambda \quad (1)$$

Donde, K es la constante de eficiencia para visión fotópica, cuyo valor es 683,002 (lm / W), $V(\lambda)$ es la eficiencia luminosa fotópica relativa y $\phi(\lambda)$ es la densidad de potencia espectral.

La luz emitida por la fuente láser fue acoplada a una fibra óptica la cual presentaba una microlente en su extremo con el objeto de hacer diverger el haz de iluminación en un área circular con una potencia radiante de $8,65 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$.

Las otras fuentes LED tienen las características siguientes:

(i) Lámpara LED de 637 nm \pm 17,67 nm con una potencia de emisión de 1,06 W sin difusor (Figura 1). Su potencia radiante calculada fue $6,44 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$. Esta lámpara con el adaptador óptico alcanza una potencia de 2,00 W.

(ii) LEDs de 633 y 405 nm con 1 W de potencia.

La comparación del grado de solapamiento entre la curva de emisión de las fuentes láser y no láser con el espectro de absorción de la droga mTHPC (solución 4 mg/ml en metanol) en distintas regiones espectrales se muestran en las Figuras 3 y 4. Se observa que la luz láser se acerca más a la longitud de onda de máxima absorción para la banda de 650 nm, sin embargo el área de solapamiento resulta mayor en la lámpara LED. Para la región comprendida entre 400 – 420 nm, la conocida banda de Soret se superpone con la emisión LED de 405 nm de longitud de onda nominal [14].

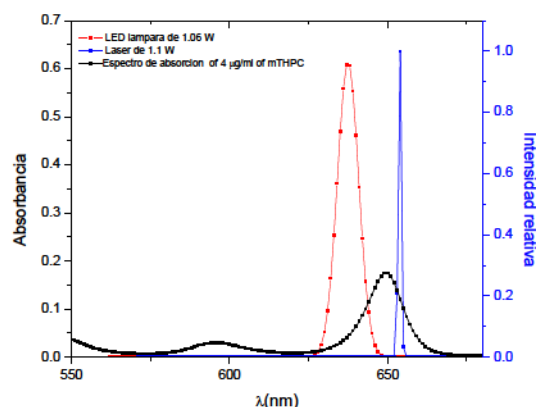


Figura 3. Solapamiento entre Láser de Diodo de 1,1 W y LED de 1,06 W contra la curva de absorción de la mTHPC en la región espectral 550 – 700 nm .

Como complemento a los resultados de la figura 3 una serie de experiencias usando un arreglo fotométrico para dos concentraciones de mTHPC y diferentes distancias fuente-detector fue realizada (Figura 4), permitiendo describir un área de solapamiento entre los picos de absorción de la droga y emisión de la fuente, lo cual está relacionado con la absorción de fotones por la droga fotoactivable.

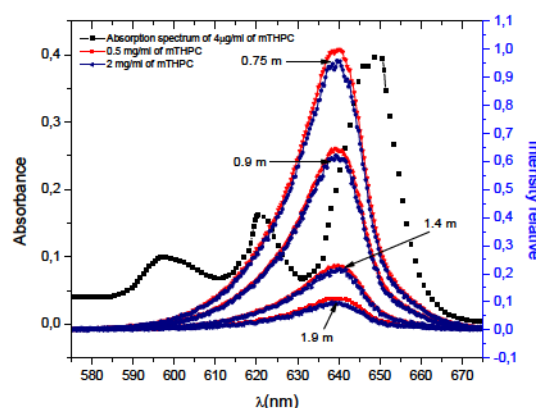


Figura 4. Solapamiento entre flujo luminoso para cada cuatro distancias y dos concentraciones de droga contra la curva de absorción de la droga.

Finalmente, comparativamente con el láser, el dispositivo LED puede fotoactivar el fármaco y producir eficacia en los ensayos de cultivos de células HeLa de forma segura y en una manera simple y sencilla de utilizar.

3.2. Tratamiento Fotodinámico

Se prepararon cultivos de células HeLa en condiciones estériles usando el flujo laminar. Luego se incubaron con el fotosensibilizador en medio RPMI y suero fetal bovino al 2% en (FBS), durante 24 hs en oscuridad para la absorción de la droga. Finalmente se expusieron a un cierto tiempo de iluminación por una fuente láser o LED.

Nuestros resultados previos mostraron que la terapia fotodinámica es más efectiva cuanto mayor es la concentración de droga y el tiempo de iluminación. Vale la pena notar que la

concentración de droga no puede superar el límite de toxicidad natural ($40 \mu\text{g/ml}$ para la mTHPC en cultivos de células HeLa), y el tiempo de exposición está limitado a la elevación de temperatura en la zona iluminada.

Luego de la incubación durante 24 horas de cultivos de células HeLa con $0,25 \mu\text{g/ml}$ de mTHPC, se iluminaron los cultivos empleando los arreglos mostrados en la sección previa con el fin de comparar el efecto de la iluminación para distintas fuentes de iluminación. Para ello, se eligieron 5 tiempos de iluminación (Figura 5). La evaluación de dicho efecto se realizó con la técnica de MTT (metiltetrazolio).

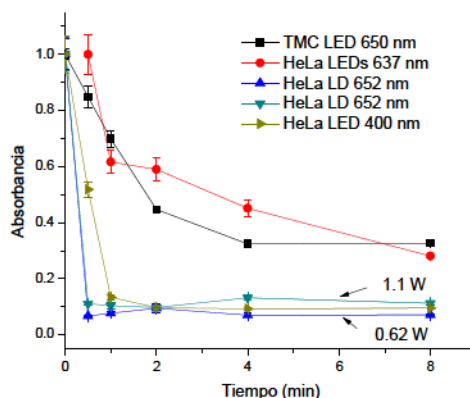


Figura 5. Medida de absorbancia en función del tiempo de iluminación para LEDs de 633 nm y 405 nm y fuente láser de diodo (LD) de 652 nm para dos potencias de excitación ($0,6 \text{ W}$ y $1,1 \text{ W}$) en cultivos de células HeLa. Se muestra además el efecto fotodinámico en células TMC (fibrosarcoma murino).

La fuente láser con la fibra óptica y micro-lente tiene un comportamiento similar al LED de 1 W con emisión de 405 nm . La absorbancia leída se aproxima a cero para tiempos de iluminación menores a 2 minutos. El LED de 633 nm con un tiempo de iluminación de 8 minutos produce que la absorbancia relativa baje hasta $0,3$, aunque con tendencia a seguir disminuyendo.

4. Discusión y conclusiones

La eficiencia del tratamiento fotodinámico en cultivos de células HeLa se relaciona con la cantidad de luz adsorbida por la droga. La iluminación con el LED de 405 nm produce la mayor mortalidad de células, hecho que se correlaciona con la presencia de un pico intenso de absorción en el espectro de la temoporfirina.

El aumento en la fluencia local también produce un aumento en la eficiencia del tratamiento fotodinámico. Esto se observa en el Láser acoplado a la fibra óptica, logrando que la absorbancia del metiltetrazolio baje rápidamente para tiempos de iluminación superiores a los 3 minutos.

Estos resultados motivaron el diseño de una fuente LED acoplada a un sistema de fibras ópticas que permite localizar la aplicación de la luz con concentrar la luz en un área pequeña, logrando un aumento en la fluencia y la posibilidad de localizar el tratamiento de acuerdo a los requerimientos de neoplasias específicas.

Los resultados de este trabajo tendrían un impacto clínico en el hecho de iluminar zonas específicas mediante fibra óptica aprovechando las cavidades naturales (cuello uterino) y otro socio-económico por cuanto la tecnología desarrollada es económica y podría llegar a las pacientes de servicios asistenciales públicos.

Bibliografía

1. Dougherty, T. J. Gomer, C. J. Henderson, B. W. Jori, G. Kessel, D. Korbelik, M. Moan, J. and Peng, Q. "Photodynamic therapy," *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905 (1998).
2. B. W. Henderson, T. J. Dougherty, *Photodynamics Therapy: Basic principles and clinical applications* (Marcel-Dekker, New York, 1992)
3. T.C.Zhuaand and J.C.Finlay "The role of photodynamic therapy (PDT)," *Photochem. Photobiol. Sci.* **35**(7), 3127-3136 (2008).
4. M. A.Biel "Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers," *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 239-244 (1996).
5. W.E.Grant, P.M. Speight, C.Hopper, and S.G. Bown "Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity," *Int. J. Cancer.* **71**, 937- 942 (1997).
6. J.S.Friedberg, R.Mick, J.P.Steveson, T.Zhu, T.M.Busch, D. Shin, D.Smith, M.Culligan, A.Dimofte, E.Glatstein, and S.M.Hahn "A phase II trial of pleural photodynamic therapy (PDT) and surgery for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) with pleural spread," *J. Clin. Oncol.* **22**, 2192-2201 (2004).
7. H.I.Pass et al. "Intrapleural photodynamic therapy: Results of a phase I trial," *Ann. Surg. Oncol.* **1**, 28-37 (1994).
8. J.S.Friedberg, R.Mick, J.Stevenson, J. Metz, T. Zhu, J. Buyske, D.H. Serman, H.I.Pass, E.Glatstein, and S.M.Hahn "A phase I study of Foscan-mediated photodynamic therapy and surgery in patients with mesothelioma," *Ann. Thorac. Surg.* **75**, 952-959(2003).
9. T.T.Goodell and P.J.Muller "Photodynamic therapy: A novel treatment for primary brain malignancy," *J. Neurosci. Nurs.* **33**, 296- 300 (2001).
10. P.X. Li, J.H. Mu, H.L. Xiao, D.H. Li "Antitumor effect of photodynamic therapy with a novel targeted photosensitizer on cervical carcinoma. *Oncol. Rep.* **1**, 125-132 (2015).
11. P. Hillemanns, K. Petry, P. Soergel, P. Collinet, K. Ardaens, J. Gallwas, A. Luyten, C. Dannacker "Efficacy and safety of hexaminolevulinatate photodynamic therapy in patients with low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Laser Surg. Med* **46**, 456-461 (2014).
12. R. D. Lozano, *El color y su medición* (Americalee, Buenos Aires, 1978)
13. P. R. Ixtaina. *Fotometria*. Technical report. 2014.
14. M.E. Etcheverry, M.A. Pasquale, M. Garavaglia. "Comparison in Vitro of the Photodynamic Action with Temoporfin Using 637 nm and 400 nm as Excitation Source". 16th International Congress on Photobiology - September 8th - 12th, 2014 - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
<http://www.photobiology2014.com.ar/website/abstract-book/>