

PARÁMETROS ÓPTICOS DE TEJIDOS ANIMALES A 632.8 nm

D. Sbarato ¹, A. Germanier¹, P. Quiroga ², M. Rubio ¹, H. Juri ³, A. Eynard ².

¹ Facultad de Matemática, Astronomía y Física, ² Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas,

³ Cátedra de Informática Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba,
Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, (5000) Córdoba.

La dosis en terapia fotodinámica es proporcional a la fluencia de energía (distribución espacial de luz) y a la concentración de sustancias fotosensibles en los tejidos. El conocimiento de las propiedades ópticas del tejido (coeficiente de absorción, coeficiente de scattering) es necesario para calcular la distribución espacial de la luz *in vivo*. En muchos tejidos blandos en el rango visible del espectro el scattering es anisotrópico en el eje de incidencia del haz láser, y el camino libre medio entre interacciones es pequeño. Se han realizado mediciones por métodos directos del coeficiente de atenuación total y de la función fase de scattering en tejidos animales (blandos), con una longitud de onda de 632.8 nm. Los resultados demuestran que para los tejidos estudiados el scattering óptico es fuertemente "picudo" hacia adelante, con un coseno medio comprendido entre 0.90 y 0.99, y el coeficiente de atenuación toma valores entre 10 y 100 mm⁻¹.

I. INTRODUCCIÓN

La fototerapia es una estrategia terapéutica que emplea radiaciones electromagnéticas que abarcan el ultravioleta cercano, el visible y el infrarrojo cercano. La acción terapéutica depende de la absorción de energía por componentes químicos endógenos o exógenos al cuerpo y la posterior conversión de esta energía en calor o en una reacción química en las células¹.

Una aplicación interesante es la terapia fotodinámica (PDT), que consiste en la realización de fototerapia luego de la inyección de derivados de hematoporfirina (Hpd) en el organismo; ésta demuestra ser efectiva para el tratamiento de diversos tumores malignos.

La PDT es un tratamiento que se encuentra en la etapa de evaluación clínica para un amplio rango de tumores malignos. Se basa en la inoculación sistémica de Hpd con la posterior iluminación y excitación con luz visible de los tejidos, en presencia de oxígeno con lo cual se eleva la reactividad de la Hpd y se producen especies moleculares citotóxicas tales como singletes de oxígeno. Estos componentes moleculares son citotóxicos, producen muerte celular y posterior necrosis del tumor¹⁻².

Los efectos biológicos de la PDT dependen de la presencia simultánea en el tumor de oxígeno, Hpd y luz. Si asumimos que el oxígeno se encuentra en el tejido tumoral encontramos que la relación entre dosis de luz y concentración de Hpd utilizada es inversa. Debido a que la Hpd es una sustancia de alta toxicidad aún en células sanas, es clínicamente relevante determinar cual es la dosis mínima necesaria para alcanzar una concentración tumoral tal

que asegure el efecto citotóxico sin causar perjuicio en las células normales.

En muchos tejidos blandos en el rango visible del espectro el scattering es anisotrópico hacia adelante, y el camino libre medio entre interacciones es pequeño³⁻⁴. Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades ópticas del tejido tales como coeficiente de absorción, coeficiente de atenuación, función fase de scattering y coeficiente de scattering son necesarios para calcular la distribución espacial de luz *in vivo*.

En consecuencia en el presente trabajo nos propusimos realizar mediciones por método directo del coeficiente de atenuación total y de la función fase de scattering en tejidos tumorales animales (adenocarcinoma de mama murino) y tejido hepático sano con una longitud de onda de 632.8 nm con el fin de responder a los problemas planteados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.A - COEFICIENTE DE ATENUACIÓN

El coeficiente de atenuación total⁵ (μt), se mide directamente sobre secciones delgadas (5–20 μm) de tejido.

Si la potencia incidente del láser es P_0 , el espesor del tejido es d y la potencia transmitida P , el μt está dado por:

$$\ln P = -\mu t d + \ln P_0 \quad (1)$$

Diseño experimental

El coeficiente de atenuación se mide utilizando el arreglo experimental esquematizado en al Fig. 1. Las muestras se colocan sobre un vidrio portaobjeto de microscopio.

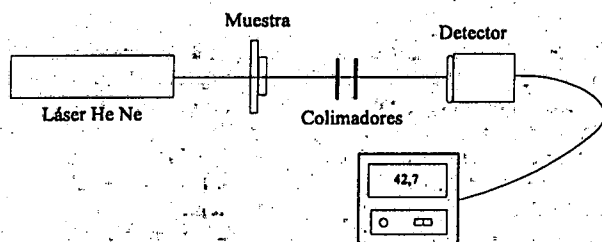


Fig. 1: Esquema del arreglo experimental utilizado para medir el coeficiente de atenuación total en tejidos biológicos.

El láser utilizado es un He-Ne ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$), continuo, 5 mw de potencia de salida, no polarizado y monomodo (TEM^{00}).

Las muestras se colocan perpendiculares al haz y 16 cm más adelante de las mismas se halla el fotodetector que mide la potencia transmitida.

Los tejidos utilizados son adenocarcinomas de mama murinos de baja y alta capacidad metastásica denominados *M2* y *MM3*, respectivamente y tejido hepático normal.

Tomamos veinte muestras de 5, 10, 15 y 20 μm de espesor respectivamente de cada tejido.

II.B - FUNCIÓN FASE DE SCATTERING

Diseño experimental:

El equipo utilizado para medir la función fase de scattering ($S(\theta)$), se esquematiza en la Fig. 2. El láser utilizado es el mismo de la medición μt y las muestras se preparan y montan de la misma manera. Las mediciones se realizaron sobre 20 muestras de 5 μm de espesor. Luego de irradiadas a 16 cm de las mismas se mide la potencia dispersada para los distintos ángulos. La apreciación angular del equipo es de 0.2° y el ángulo subtendido entre la muestra y el detector es de 0.4° .

El equipo se desarrolló pensando en la simetría azimutal. Una vez medida $S(\theta)$ se calcula el coseno medio de scattering (g), mediante:

$$g = \frac{\int_0^\pi S(\theta) \cos(\theta) d\theta}{\int_0^\pi S(\theta) d\theta} \quad (2)$$

utilizando métodos de integración numérica.

Preparación de las muestras:

Se utilizaron 8 ratones Balb/c endocriados portadores de las dos estirpes tumorales. Se sacrificaron con sobredosis de anestesia y se procedió a la extracción de una muestra tumoral y hepática para su posterior procesamiento en un crióstato. Las mismas se procesaron a -20°C . Una vez obtenidas las secciones se colocaron en un portaobjeto para su posterior irradiación. Las mediciones se realizaron entre 30 y 60 minutos después de realizado el sacrificio.

III. RESULTADOS

III.A - COEFICIENTE DE ATENUACIÓN

Los datos calculados como se especificó en la ecuación (1) se detallan en la Tabla 1.

Coeficientes de Atenuación, μt [mm^{-1}]		
Tumor MM3	Tumor M2	Hígado
85 ± 5	80 ± 5	48 ± 5

Tabla 1: Coeficientes de Atenuación (μt) calculados.

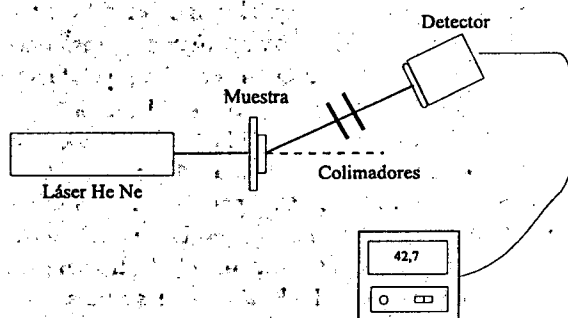


Fig. 2: Esquema del arreglo experimental utilizado para medir la función fase de scattering en tejidos biológicos.

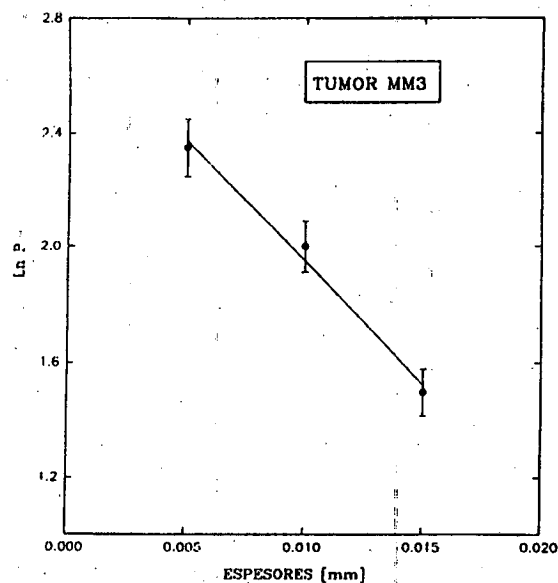


Fig. 3: Gráfica de los valores promedio del logaritmo de las potencias transmitidas para cada espesor versus dicho espesor. Tumor MM3.

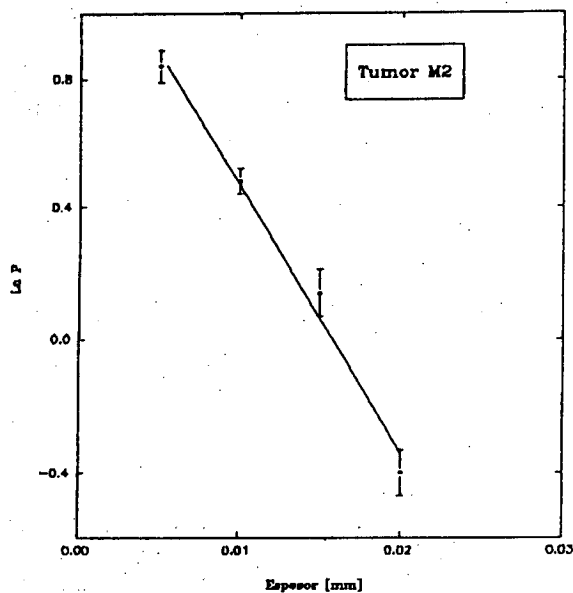


Fig. 4: Gráfica de los valores promedio del logaritmo de las potencias transmitidas para cada espesor versus dicho espesor. Tumor M2.

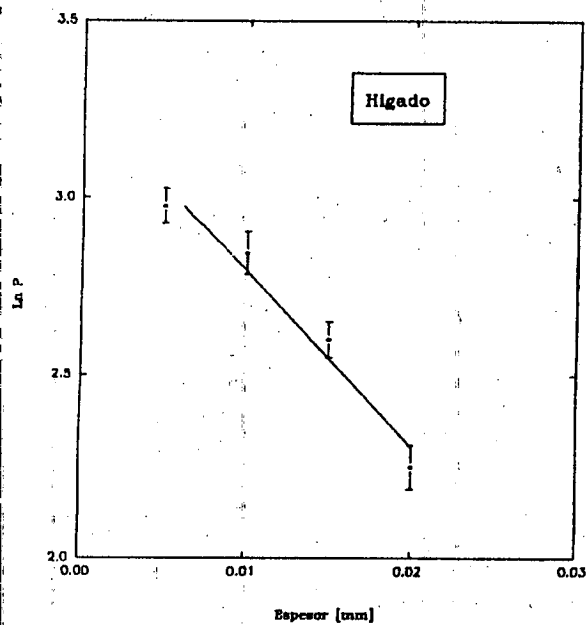


Fig. 5: Gráfica de los valores promedio del logaritmo de las potencias transmitidas para cada espesor versus dicho espesor. Hígado sano.

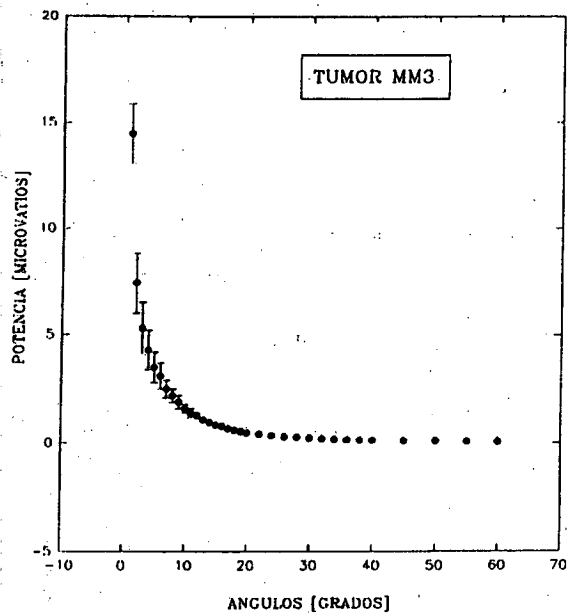


Fig. 6: Gráfica de los valores promedio de las potencias transmitidas para cada ángulo versus dicho ángulo. Tumor MM3.

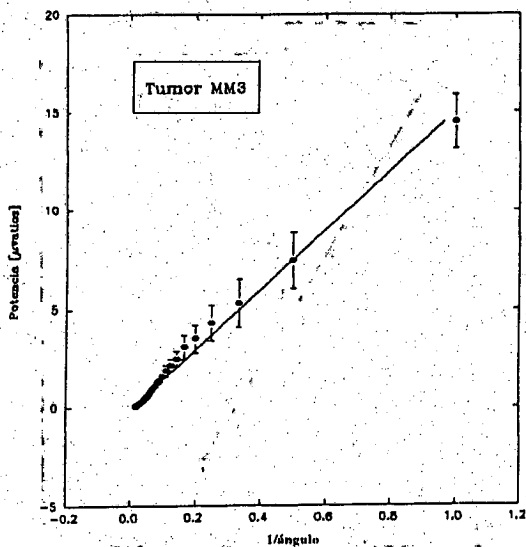


Fig. 7: Gráfica de los valores promedio de las potencias transmitidas para cada ángulo versus la inversa de dichos ángulos. Tumor MM3.

En las Figs. 3, 4 y 5 se muestran las gráficas de los valores promedio de $\ln(P)$ para cada espesor versus dicho espesor para cada uno de los tejidos.

III.B - FUNCIÓN FASE DE SCATTERING

Se observó la existencia de simetría azimutal, pues girando la muestra, el valor de la potencia transmitida no cambia.

En la Fig. 6 se muestra la gráfica de los valores promedio de las potencias transmitidas para cada ángulo vs. dichos ángulos. El valor asignado a las barras de error es el error standard de los promedios ($\pm \text{ESM}$).

El ajuste de los valores promedio de la potencia transmitida como función del ángulo mediante la hipérbola, $P = b + a/\theta$, se muestra en la Fig. 7. Los valores de los parámetros que mejor ajustan dicha curva son $a = 15.1$ y $b = 0.08$ con un coeficiente de correlación $r = 0.995$. Sin embargo, la Fig. 8 muestra la gráfica del ajuste de los mismos valores pero con la distribución de Henyey-Greenstein³⁻⁶, su expresión es:

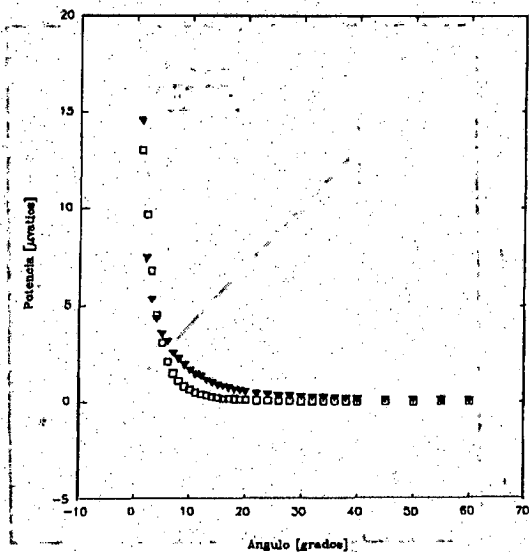


Fig. 8: Gráfica del ajuste de los valores medidos (\blacktriangledown) con la distribución de Henyey-Greenstein (\square). Tumor MM3.

$$S(\theta) = \frac{a(1-g^2)}{(1+g^2-2g \cos(\theta))^{3/2}} \quad (3)$$

los valores del ajuste son $a = 0.029$ y $g = 0.937$. El coseno de scattering obtenido es $(98 \pm 1) 10^{-2}$.

IV. DISCUSIÓN

COEFICIENTE DE ATENUACIÓN TOTAL

Los valores obtenidos están contenidos en el rango típico (desde 10 hasta 100 mm^{-1}) determinado por Flock⁵ para tejidos biológicos blandos.

FUNCIÓN FASE DE SCATTERING

La distribución de Henyey-Greestein es utilizada habitualmente para simular función fase de scattering en tejidos biológicos³⁻⁶.

El ajuste de los valores de potencia transmiti-

da en función del ángulo mediante la distribución de Henyey-Greenstein nos proporciona un valor de $g = 0.94$ que no concuerda con el valor determinado a través de la definición (2) donde se obtuvo $g = (98 \pm 1) 10^{-2}$. Esto nos induce a suponer que la utilización del modelo de Henyey-Greenstein, sobre todo en simulación, implica definir un coseno medio efectivo que corrija los desacuerdos del mismo. Por otro lado, el buen acuerdo de la hipérbola con los valores medidos es significativo.

REFERENCIAS

1. Profio E. y D. Doiron. *Med. Phys.* 8 (2) (1981).
2. Pooler, J. y D. Valzeno. *Med. Phys.* 8 (5) (1981).
3. Keijzer, M. *et al.* *Lasers Surg Med.* 9, 148-154 (1989).
4. Bolin, F. *et al.* *Photochem. Photobiol.* 46 (5) (1987).
5. Flock, S. *et al.* *Med. Phys.*, 14 (5) (1987).
6. Star, W. *et al.* *Phys. Med. Biol.*, 33 (4) (1988).