

Herramientas de monitorización de Terapia Fotodinámica mediante fluorescencia

F. Fanjul-Vélez, L. Arévalo-Díaz, J. L. Arce-Diego

Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros s/n, 39005 Santander (Cantabria), España, fanjulf@unican.es, arcedj@unican.es

Resumen

La Terapia Fotodinámica es una modalidad de tratamiento con resultados prometedores en varias disciplinas médicas, tales como dermatología, digestivo, oftalmología u otras. En el caso particular de dermatología se emplea en algunos servicios para combatir cánceres de piel no melanoma. Esta técnica presenta una elevada especificidad y eficacia en cierto tipo de lesiones cancerosas. Dado que el protocolo de aplicación suele ser fijo, según los estudios y ensayos del fabricante del fotosensibilizador, e independiente de la lesión y del paciente, en ocasiones se producen casos de recidiva asociados a este hecho. Para tratar de solventar esta situación, se requiere, por un lado, un adecuado estudio del proceso fotodinámico, de manera personalizada. Este estudio podría ayudar a estimar los parámetros óptimos del protocolo para maximizar la eficacia del tratamiento. Además, se requiere una herramienta que permita llevar a cabo un seguimiento del procedimiento fotodinámico, para asegurar que éste se está llevando a cabo según lo previsto inicialmente. En este trabajo se propone la fluorescencia como herramienta diagnóstica de monitorización. La relación entre las medidas de fluorescencia y el proceso fotodinámico, así como el establecimiento de parámetros iniciales de tratamiento adecuados, requiere del estudio del proceso fotodinámico, que se lleva a cabo también en este proceso, incluyendo la generación de radiación fluorescente. La herramienta se aplica a patologías cutáneas de cáncer de piel no melanoma, con objeto de comprobar las diferencias entre ellas, y así justificar la conveniencia de tratamientos personalizados.

1. Introducción

La Terapia Fotodinámica (*Photodynamic Therapy*, PDT) es una técnica de tratamiento con resultados prometedores en varias especialidades médicas, entre ellas digestivo, oftalmología o dermatología. Sus resultados son prometedores debido a su elevada especificidad en la destrucción de células tumorales, sus limitados efectos secundarios, y sus buenos resultados estéticos. Su mecanismo básico de funcionamiento está basado en las reacciones fotoquímicas que suceden en el tejido tumoral cuando la luz de una fuente óptica interactúa con la parte del tejido al que previamente se ha inoculado la substancia denominada fotosensibilizador [1]. La PDT presenta numerosas ventajas, tales como el carácter mínimamente invasivo, la especificidad para las células tumorales, o el uso de radiación no ionizante, frente a técnicas convencionales como la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía. A pesar de estas ventajas, el tratamiento requiere, idealmente, de una personalización para adaptarse a las particularidades de la lesión y del paciente. En la realidad, los protocolos de aplicación clínica son fijos y vienen

marcados por el fabricante del fotosensibilizador, de acuerdo a los ensayos clínicos previamente efectuados. De esta forma, no se consideran variaciones propias de la lesión específica, o del paciente concreto al que se le está aplicando el tratamiento.

La práctica clínica ha demostrado que la respuesta al tratamiento es altamente dependiente del tipo de lesión y del paciente. Esto es particularmente relevante, por cuanto en este caso un inadecuado tratamiento da como resultado un proceso de recidiva, mediante el cual el tumor resurge y vuelve a generar la lesión original. La forma de resolver este problema estriba en el desarrollo de estudios profundos del proceso fotodinámico, que permitan verificar las relaciones de causa-efecto, desde los parámetros iniciales del tratamiento, hasta el efecto destructivo final. Con este tipo de análisis se podría estimar el conjunto de parámetros necesarios para obtener una destrucción de tejido tumoral completa.

Para ello es necesario estimar la distribución de radiación óptica en el tejido biológico [2], la evolución de los componentes moleculares involucrados en las reacciones fotoquímicas [3], la distribución del fotosensibilizador en el tejido [4], y el área necrotizada [5]. Además, si se pretende monitorizar el tratamiento, es importante estimar la emisión fluorescente del fotosensibilizador, teniendo en cuenta que sufre degradación por fotoquemado durante el propio tratamiento de PDT [6]. Además, es preciso conocer la distribución de radiación fluorescente emitida hacia el exterior del tejido, que sería en última instancia la señal que podría detectarse.

Toda esta información es crítica para asegurar que la cantidad de fotosensibilizador será adecuada y suficiente para el proceso fotodinámico. Una cantidad insuficiente daría lugar a una detención de los efectos del tratamiento, y en particular de la generación de especies de oxígeno reactivas, como el oxígeno singlete, que provoca la destrucción celular. La señal de fluorescencia generada se podría relacionar con este proceso, al menos en primera aproximación, y se podría comprobar in situ la evolución del tratamiento. El tratamiento personalizado sería entonces una realidad en el uso clínico de la PDT.

En este trabajo se trata de proponer un modelo predictivo del tratamiento fotodinámico, así como de la consiguiente generación de señal de fluorescencia. Con ello se trata de contribuir al objetivo anteriormente mencionado.

2. Análisis de la Terapia Fotodinámica

El análisis de la PDT implica el modelado de diferentes partes del proceso de tratamiento. En primer lugar es preciso conocer la absorción espacial de radiación óptica en el tejido. Además ha de conocerse la distribución del fotosensibilizador, que puede ser sistémico o tópico. La clave del tratamiento está en el proceso fotodinámico, de gran complejidad y con un gran número de parámetros involucrados. De este proceso fotodinámico surge una parte dedicada a la generación de radiación fluorescente, clave en la monitorización del tratamiento.

2.1. Distribución de radiación óptica de excitación

Para obtener la distribución de la radiación óptica de excitación se puede emplear la ecuación del transporte de la radiación (*Radiation Transport Theory*) tridimensional. De acuerdo con esta ecuación, la radiación óptica se ve afectada por absorción y esparcimiento de cada partícula que forma el tejido. Para el caso estacionario y en ausencia de fuentes internas, la ecuación se expresa como:

$$\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}) = -(\mu_a + \mu_s)I(r, \hat{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(\hat{s}, \hat{s}') I(r, \hat{s}') d\Omega' \quad (1)$$

En esta ecuación la radiación en el punto \vec{r} sigue la dirección del vector \hat{s} [1]. $I(r, \hat{s})$ es la intensidad específica, en unidades de potencia óptica por unidad de área y por unidad de ángulo sólido. $p(\hat{s}, \hat{s}')$ es la función de fase de esparcimiento, que refleja la distribución de probabilidad de que la radiación óptica sea esparcida en una determinada dirección. μ_a es el coeficiente de absorción, y μ_s es el coeficiente de esparcimiento. La resolución de esta ecuación de forma analítica es compleja, y se suelen emplearse aproximaciones. También es posible resolverla de manera numérica, con por ejemplo el método de Monte Carlo [2, 7].

2.2. Distribución del fotosensibilizador tópico

Debido a que la aplicación final será dermatológica, se considera una situación en la que el fotosensibilizador es tópico. Ciertos fotosensibilizadores son generados endógenamente en las células tumorales, una vez que el precursor aplicado sobre la superficie de la piel alcanza la célula objetivo. Esta descripción se corresponde, por ejemplo, con el fotosensibilizador Metvix®, que se utiliza en este trabajo. Este fotosensibilizador contiene un precursor, Metilaminolevulinato, que se sintetiza para obtener Protoporfirina IX (PpIX) en las células tumorales. La distribución y generación de la sustancia fotoactiva para un fotosensibilizador tópico fue propuesta con anterioridad [4]. La distribución del precursor se puede obtener mediante la ley de Fick. La de la sustancia fotoactiva depende de la concentración del precursor, así como de la tasa de eficiencia del proceso de conversión.

La evolución temporal del precursor aparece la siguiente ecuación:

$$M(t) = M_o \int_0^t \left(\frac{K}{\sqrt{D\pi t'}} e^{-\frac{z^2}{4Dt'}} - \frac{K^2}{D} e^{\frac{Kz}{D}} e^{-\frac{K^2}{D} t'} \right) \cdot \text{erfc} \left(\frac{K}{\sqrt{D}} \sqrt{t'} + \frac{z}{2\sqrt{Dt'}} \right) dt' \quad (2)$$

En esta ecuación M es la concentración del precursor. D es el coeficiente de difusión del medio, y M_o la concentración del precursor en la superficie de la piel al inicio del proceso, en $t=0$. z es la distancia desde la capa denominada estrato córneo hasta el punto de interés. Esta capa presenta una permeabilidad K . τ es el tiempo de eliminación del precursor.

La generación de la sustancia fotoactiva se puede considerar mediante la ecuación:

$$S_0(t) = \varepsilon_p \frac{\tau_p}{\tau_{a \rightarrow p}} M(t) \quad (3)$$

Esta expresión aplica cuando el tiempo de eliminación de la sustancia fotoactiva es corto comparado con el tiempo de difusión del precursor. En estas condiciones hay proporcionalidad entre las concentraciones de uno y otro. En esta ecuación S_0 es la concentración de fotosensibilizador. τ_p es el tiempo de eliminación de la sustancia activa, y $\tau_{a \rightarrow p}$ el invertido en la generación del fotosensibilizador. ε_p es la tasa de eficiencia del proceso de conversión.

2.3. Proceso fotodinámico

La interacción fotoquímica entre el fotosensibilizador, la radiación óptica de la fuente y el oxígeno en el tejido genera agentes citotóxicos en forma de oxígeno singlete. Esta sustancia se encarga de inducir la muerte celular tumoral. La interacción, compleja, se puede estudiar mediante un sistema de ecuaciones diferenciales. Este sistema recoge la evolución temporal de las concentraciones de diversos componentes moleculares implicados, como el fotosensibilizador en estado base, en estado singlete excitado y triplete, S_0 , S_1 y T , el oxígeno en estado base 3O_2 , el oxígeno singlete 1O_2 , o los receptores de oxígeno singlete R [3, 8]:

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -\nu\rho\sigma_{psa}[S_0] - kpb[^1O_2][S_0] + \frac{\eta_0}{\tau_1}[S_1] + \frac{\eta_{30}}{\tau_3}[T] + \frac{\alpha s}{\tau_3}[T][^3O_2] \quad (4)$$

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -\frac{1}{\tau_1}[S_1] + \nu\rho\sigma_{psa}[S_0] \quad (5)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -\frac{\eta_{30}}{\tau_3}[T] - \frac{\alpha s}{\tau_3}[T][^3O_2] + \frac{\eta_{13}}{\tau_1}[S_1] \quad (6)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -\frac{\alpha s}{\tau_3}[T][^3O_2] + \frac{\eta_0}{\tau_0}[^1O_2] + P \quad (7)$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = -kpb[S_0][^1O_2] - kcx[R][^1O_2] - ksc[C][^1O_2] - \frac{\eta_0}{\tau_0}[^1O_2] + \frac{\alpha s}{\tau_3}[T][^3O_2] \quad (8)$$

$$\frac{d[R]}{dt} = -kcx[^1O_2][R] + U \quad (9)$$

La elección de los parámetros del modelo es clave, y redundante en gran medida en su exactitud [5, 8]. La resolución de este sistema de ecuaciones requiere de aproximaciones para sistemas de ecuaciones diferenciales rígidas.

2.4. Fluorescencia generada

Las moléculas de fotosensibilizador actúan, además de como generadoras de sustancias citotóxicas, como emisoras de fluorescencia. Esta cualidad hace que la fluorescencia emitida sea el máximo interés en la planificación y monitorización del tratamiento. La fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de fotosensibilizador presente en el tejido [8]. Para calcular la cantidad de fluorescencia generada en el tejido biológico, es necesario añadir una ecuación adicional al sistema anteriormente mostrado:

$$P_f(r, z) = v \cdot \rho(r, z) \cdot \sigma_{psa} \cdot [S_0](r, z) \cdot \eta_{10} \cdot E_{photon_{zem}} \cdot V(r, z) \quad (10)$$

En esta ecuación v es la velocidad de la luz en el tejido, ρ es la densidad de fotones en una localización espacial, σ_{psa} es la sección transversal de absorción de las moléculas del fotosensibilizador, η_{10} es la eficiencia de fluorescencia, $E_{photon_{zem}}$ es la energía del fotón a la longitud de onda de emisión, y V es el volumen de cada vóxel de la rejilla de computación en coordenadas cilíndricas.

En consecuencia, es posible obtener distribuciones de fluorescencia como la que aparece en la Figura 1.

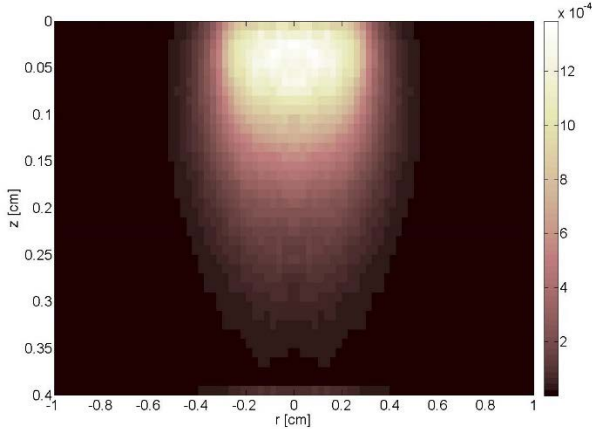


Figura 1. Distribución de fluorescencia generada en profundidad y dirección radial.

2.5. Fluorescencia emitida

La fluorescencia generada en el interior del tejido es de vital importancia. Sin embargo, a efectos de monitorización experimental, se hace necesario conocer la fluorescencia emitida hacia el exterior del tejido. Esto da lugar a patrones de emisión superficial. La obtención de este tipo de patrones requiere de nuevo de aproximaciones a la propagación de radiación óptica en medios turbios. Además, en este caso se trata de un sistema con múltiples fuentes de radiación a la longitud de onda de emisión. El problema se puede resolver de forma general mediante [9]:

$$J_f(r, t) = \sum_{r_s} \sum_{z_s} P_f(r_s, z_s, t) \Delta V(r_s, z_s) T(r_s, z_s, r) \quad (11)$$

En esta ecuación r_s y z_s son las coordenadas de las fuentes de fluorescencia, ΔV es el volumen incremental, y T la función de transferencia de fluorescencia. Esta función se puede obtener mediante el método de Monte Carlo.

3. Aplicación a tejidos patológicos

Una vez fijado el sistema y sus condicionantes, éste se aplica a patologías dermatológicas de tipo cáncer de piel no melanoma. El objetivo fundamental está relacionado con la obtención de patrones de fluorescencia superficial emitida, en función del tipo de lesión y del tiempo de tratamiento.

La aplicación se realiza sobre lesiones de tipo carcinoma basal celular (BCC), carcinoma basal celular infiltrativo y carcinoma de células escamosas. La estructura del tejido se compone de una capa de tejido tumoral de 3 mm, a la que continúa tejido sano. Es necesario conocer las propiedades ópticas tanto del tejido tumoral como del tejido sano, a la longitud de onda de excitación de 633 nm, y a la de emisión fluorescente. La distribución de fotosensibilizador tópico se ha asumido similar para todas las patologías, con un radio de aproximadamente 1 cm. Se han asumido las propiedades fotoquímicas del principio activo PpIX, y una distribución.

Las fuentes de fluorescencia, dentro del complejo modelo fotoquímico, se computan para diferentes intervalos temporales. La duración del tratamiento clínico está en torno a 10 minutos, aproximadamente. La irradiancia aproximada de la fuente óptica sobre el tejido dermatológico está en torno a los 100 mW/cm².

La Figura 2, obtenida mediante el modelo anterior, muestra la variación de la emisión de fluorescencia en la dirección radial para diversos tiempos de tratamiento.

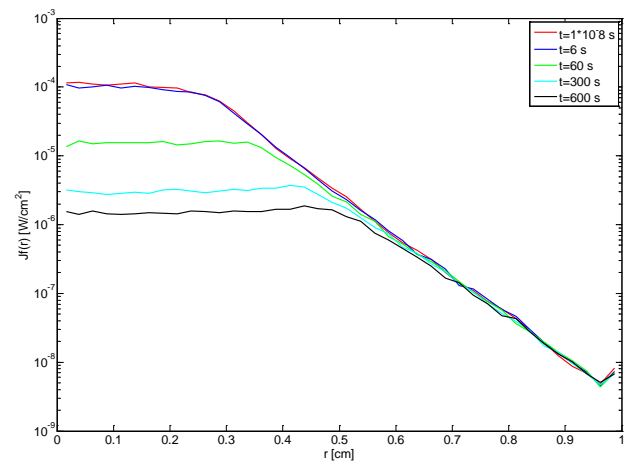


Figura 2. Emisión de fluorescencia en la dirección radial para BCC en diversos tiempos de tratamiento.

En la Figura 2 se puede apreciar, en primer lugar, cómo la emisión fluorescente en la dirección radial sigue el perfil espacial del haz incidente. Así, se aprecia una caída progresiva de esta radiación a partir de 0.3 cm. Es

interesante observar que esta caída no es abrupta, sino que, debido fundamentalmente al esparcimiento de la radiación, se produce emisión significativa más allá de la localización del haz incidente. En segundo lugar, otro de los efectos significativos tiene que ver con la reducción de la emisión de fluorescencia máxima a medida que el tiempo de tratamiento aumenta. Este efecto está provocado por el fotoquemado del fotosensibilizador, y está estrechamente relacionado con su eficacia terapéutica. Por lo tanto, es un signo de que el poder de destrucción tumoral en esa zona está decreciendo. A su vez, existe un efecto de apantallamiento que se va reduciendo con la evolución del tratamiento y el correspondiente fotoquemado. Eso hace que nuevas fuentes de fluorescencia más lejanas se activen y, en consecuencia, el esparcimiento haga que la emisión aumente en puntos radiales más lejanos. Incluso los máximos absolutos de fluorescencia se van desplazando hacia posiciones radiales más alejadas del punto central de iluminación.

Estos resultados confirman que la producción de oxígeno singlete citotóxico comienza en la zona central de irradiación, pero a medida que el tratamiento progresa, se desplaza a zonas más profundas y radialmente más alejadas del tejido. El patrón de fluorescencia puede ser recogido mediante una cámara CCD (Charge-Coupled Device) o CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor), y comparado con las predicciones del modelo. De esta forma, se podría comprobar si el tratamiento sigue el resultado esperado a priori. Además, los diferentes parámetros iniciales del protocolo, tales como la concentración de fotosensibilizador, irradiancia de la fuente óptica, longitudes de onda de excitación y emisión, patrón espacial o radio eficaz podrían ser ajustados a las particularidades de la lesión y del paciente. A pesar de las ventajas de la PDT para el tratamiento de cáncer de piel no melanoma, la experiencia clínica demuestra que la respuesta no es siempre la misma con un protocolo fijo.

4. Conclusiones

La Terapia Fotodinámica es una técnica de tratamiento cuyo objetivo es la destrucción tumoral. Presenta un carácter mínimamente invasivo, utiliza radiación no ionizante y posee una elevada especificidad. Su funcionamiento se basa en la inoculación de una sustancia fotosensibilizadora, que se acumula preferentemente en el tejido maligno. La irradiación óptica de esa sustancia provoca la generación de especies citotóxicas, que inducen la destrucción celular. La compleja interrelación entre los numerosos parámetros involucrados hace que no sea sencillo conocer los óptimos para una aplicación concreta, sobre una lesión y un paciente concretos. Además, en la aplicación clínica de la PDT se emplean protocolos fijos, independientes de la lesión y del paciente.

En este trabajo se ha analizado en profundidad el proceso de funcionamiento de la PDT, de manera cuantitativa. Para ello en primer lugar se ha propuesto un complejo modelo que abarca las distintas fases del procedimiento. El tratamiento comienza con la propagación de radiación óptica en el tejido biológico, considerado como un medio turbio. Una vez conocida esta propagación y absorción en

el medio, se debe conocer la distribución del fotosensibilizador, típico en este caso. El modelo fotoquímico incluye las concentraciones de las sustancias más significativas y su interrelación temporal. Esto incluye la generación de radiación fluorescente, susceptible de ser empleada para monitorizar el diagnóstico.

El sistema presentado se podría emplear para ayudar en la planificación de los parámetros del protocolo personalizado a la lesión y el paciente concretos, así como para una adecuada monitorización del tratamiento. Con ello se contribuiría a reducir las tasas de recidiva.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad de España “Nuevas fases activas en nano-óxidos de metales de transición y tierras raras estabilizadas a alta presión” (MAT2015-69508-P), cofinanciado con fondos FEDER, y por la Fundación San Cándido.

Referencias

- [1] Vo-Dinh T. Biomedical Photonics Handbook. CRC Press, Second Edition 2014 (ISBN: 9781420085143).
- [2] Wang L, Jacques SL, Zheng L. MCML – Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer methods and programs in biomedicine*, vol 47, 1995, pp 131-146 (ISSN: 0169-2607).
- [3] Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SL, Hilf R. Oxygen Consumption and Diffusion Effects in PDT. *Radiation Research*, vol 26, 1991, pp 296-303 (ISSN: 0033-7587).
- [4] Svaasand LO, Wyss P, Wyss MT, Tadir Y, Tromberg BJ, Berns MW. Dosimetry model for Photodynamic Therapy with topically administered photosensitizers. *Lasers in Surgery and Medicine*, vol 18, 1996, pp 139-149 (ISSN: 1096-9101).
- [5] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Photosensitizer absorption coefficient modeling and necrosis prediction during photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol 114, 2012, pp 79–86 (ISSN: 1011-1344).
- [6] Liu B, Farrell TJ, Patterson MS. A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen. *Phys. Med. Biol.*, vol 55, 2010, pp 5913-5932 (ISSN: 0031-9155).
- [7] Wang L, Jacques SL, Zheng L. CONV – Convolution for responses to a finite diameter photon beam incident on multi-layered tissues. *Computer methods and programs in biomedicine*, vol 54, 1997, pp 141-150 (ISSN: 0169-2607).
- [8] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Spatial photosensitizer fluorescence emission predictive analysis for photodynamic therapy monitoring applied to a skin disease. *Optics Communications*, vol 285, 2012, pp 1581–1588 (ISSN: 0030-4018).
- [9] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Superficial radially-resolved fluorescence and three-dimensional photochemical time-dependent model for Photodynamic Therapy. *Optics Letters*, vol 39, 2014, pp 1845-1848 (ISSN: 0146-9592).