

Aplicación de la fluorescencia superficial para la monitorización del proceso fotodinámico en tumores cutáneos

Application of superficial fluorescence to monitor the photodynamic process in skin tumors

Irene SALAS-GARCÍA, Félix FANJUL-VÉLEZ, Mihail ZVEREV, José Luis ARCE-DIEGO

Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas. Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros S/N, 39005 Santander, Cantabria, España.

Persona de contacto: José Luis Arce Diego (arcedj@unican.es)

RESUMEN:

La monitorización no invasiva es uno de los elementos claves para analizar la activación del fotosensibilizador durante el proceso fotoquímico subyacente a la Terapia Fotodinámica (TFD) mediante su fluorescencia. Esta última se puede emplear también para discriminar el tejido patológico del sano. En este trabajo se analizan los patrones de fluorescencia superficial en tres tipos diferentes de cáncer de piel no melanoma, así como su respuesta al tratamiento fotodinámico, mediante un modelo dosimétrico para TFD con Metvix[®]. Los resultados obtenidos muestran diferencias incluso mayores del 50% en los patrones de fluorescencia a medida que progresa el tratamiento dependiendo del tipo de tejido maligno. Lo que demuestra la gran relevancia del medio biológico como factor dosimétrico adicional en el contexto fotodinámico. Estos resultados contribuyen al futuro de desarrollo de una terapia personalizada asistida mediante herramientas dosimétricas para interpretar las imágenes de fluorescencia obtenidas durante la monitorización del tratamiento y el fotodiagnóstico diferencial.

Palabras clave: Terapia Fotodinámica, fluorescencia, fotodiagnóstico, cáncer de piel no melanoma, dosimetría, fotosensibilizador.

ABSTRACT:

Non-invasive treatment monitoring is one of the key elements to assess the photosensitizer activation during the photochemical process underlying Photodynamic Therapy (TFD) by its fluorescence. Furthermore the photosensitizer fluorescence can be employed to discriminate the pathological tissue from the healthy one. In this work the superficial fluorescence patterns in three different types of nonmelanoma skin cancer tumors and their photodynamic treatment response are analysed by a fluorescence based dosimetric model for PDT with topical Metvix[®]. Results show differences of even more than 50% in the fluorescence patterns as the treatment progresses depending on the malignant tissue type. They demonstrate the great relevance of the biological media as an additional dosimetric factor within the photodynamic context. These results contribute to the development of a future customized therapy with the assistance of dosimetric tools to interpret the fluorescence images obtained during the treatment monitoring as well as in differential photodiagnosis.

Key words: Photodynamic Therapy, fluorescence, photodiagnosis, nonmelanoma skin cancer, dosimetry, photosensitizer.

1.- Introducción

La Terapia Fotodinámica (TFD) consiste en la administración sistémica o tópica de un fotosensibilizador y posterior aplicación de la radiación óptica tras un periodo de incubación en el que el fotosensibilizador se acumula de forma selectiva en el tejido tumoral. Como resultado se producen agentes citotóxicos en presencia del oxígeno que dan lugar a la destrucción del tejido maligno [1]. Su naturaleza mínimamente invasiva y el uso de radiación no ionizante, ha extendido su aplicación en diversos ámbitos clínicos para el tratamiento del cáncer y otros tipos de lesiones. Especialmente como técnica de tratamiento en dermatología, donde se aplica para el tratamiento del cáncer de piel no melanoma y patologías precursoras. La incidencia de estas últimas ha aumentado significativamente en las últimas décadas debido en gran medida al aumento de la exposición a la radiación ultravioleta impuesta por las tendencias estéticas actuales [2]. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados terapéuticos, persiste la necesidad de desarrollar una dosimetría de tratamiento personalizada para evitar una eliminación incompleta del tejido tumoral y posibles recidivas. Uno de los fotosensibilizadores más empleados en este ámbito es el Aminolevulinato de Metilo (MAL, Metvix[®]). Un precursor del componente fotoactivo Protoporfirina IX (PpIX) que se acumula selectivamente en las células tumorales [3]. Al igual que otros fotosensibilizadores de la familia de las porfirinas, el protocolo clínico para la aplicación de TFD-Metvix[®] es fijo e independiente del tipo de paciente o lesión, aunque los resultados del tratamiento varían en función de ambos. Por lo que el desarrollo de dosimetría personalizada para TFD es necesario para optimizar la respuesta del paciente al tratamiento y evitar una posible persistencia tumoral o futura recidiva como consecuencia de una elección inadecuada de los parámetros del tratamiento. Para ello se han estudiado diferentes estrategias dosimétricas y factores que afectan al proceso fotodinámico mediante modelos predictivos [4]. Estos últimos han de tener en cuenta una gran cantidad de factores dinámicos y procesos interrelacionados que pueden limitar el adecuado transcurso del tratamien-

to. Lo que les confiere una capacidad muy valiosa para estimar a priori la respuesta del tejido bajo unas determinadas condiciones dosimétricas. Por lo que el uso de modelos predictivos presenta un gran interés para realizar una planificación personalizada del tratamiento que maximice su efectividad terapéutica. Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo realizado en los últimos años, el desarrollo de un modelo completo para TFD que considere los complejos fenómenos inherentes al proceso fotodinámico permanece sin resolverse. La propagación óptica en el tejido biológico, la distribución del fotosensibilizador y la interacción fotoquímica entre otros, son cruciales para evaluar la progresión del tratamiento y estimar el efecto del tratamiento bajo un determinado contexto clínico. Además, sería de gran interés poder analizar la señal de fluorescencia emitida por el fotosensibilizador, no sólo con fines diagnósticos aprovechando su acumulación selectiva en el tumor, sino también como indicador de su degeneración para monitorizar la evolución de la terapia. Los modelos propuestos recientemente incluyen aproximaciones para los fenómenos fotofísicos y fotoquímicos principales, así como para la fluorescencia emitida por la PpIX en TFD-ALA aplicada en dermatología. Igualmente se ha estudiado la relación entre la fluorescencia del fotosensibilizador y la distribución de oxígeno singlete [5]. En este caso el modelo empleado es unidimensional y se aplicó en piel sana, por lo que no se considera ni la dependencia radial del proceso fotodinámico ni la influencia de las propiedades ópticas del tejido patológico sobre la distribución de la radiación óptica. Este tipo de modelos se han empleado también para estimar la concentración de oxígeno local a partir de la fluorescencia del fotosensibilizador [6], aunque en este caso el análisis de los componentes moleculares involucrados en la interacción fotoquímica se obtuvo a partir de una simple función escalón para la tasa de fluencia. Por lo que no se considera adecuadamente ni la geometría ni las propiedades ópticas del medio biológico. Ambas consideraciones se han tratado mediante una aproximación de MC [7], aunque otros aspectos como la distribución inhomogénea del fotosensibilizador, la degradación del oxígeno inducida por el pro-

ceso fotodinámico o la dependencia radial del oxígeno singlete fueron despreciados. Las limitaciones indicadas anteriormente limitan la evaluación cuantitativa del proceso fotodinámico en un escenario clínico real, así como un análisis minucioso de la fluorescencia medida en la superficie del tumor. Recientemente se propuso un modelo que permite obtener la evolución temporal de la fluorescencia superficial, y en función de la profundidad, junto con la concentración de oxígeno singlete generada durante el tratamiento [8]. Ambos juegan un papel fundamental como indicadores del progreso del tratamiento y en definitiva, del daño oxidativo. Sin embargo, el potencial de este modelo para la práctica clínica considerando diferentes tipos de cáncer de piel no ha sido estudiado en profundidad. Tal y como se indicó anteriormente los modelos anteriores hacen referencia a piel sana o a un tipo de tumores aislado. En este trabajo se presenta un análisis completo de la respuesta fotodinámica y la potencialidad de la monitorización de la fluorescencia del fotosensibilizador en varios tumores comunes de cáncer de piel no melanoma (carcinoma basocelular nodular (CBCN), carcinoma basocelular infiltrativo (CBCI) y carcinoma de células escamosas (CCE)). El análisis llevado a cabo permite evaluar la relevancia del tipo de tumor empleando un modelo tridimensional para TFD que proporciona la evolución de los principales fenómenos involucrados en el proceso fotodinámico junto con los patrones de fluorescencia superficiales y en profundidad a medida que progresa el tiempo de tratamiento. Los resultados específicos para cada tipo de tumor podrían ser útiles como herramienta de asistencia clínica tanto para planificar la respuesta al tratamiento como para monitorizar su progresión. En la sección 2 se describe brevemente el modelo dosimétrico para TFD-MAL empleado. Su aplicación en los tres tipos de cáncer de piel se presenta en la sección 3 junto a los resultados obtenidos. Finalmente en la sección 4 se presentan las conclusiones más relevantes de este trabajo.

2.- Descripción del modelo dosimétrico para TFD-MAL

A continuación se describe brevemente la fundamentación del modelo empleado para obtener la evolución de los fenómenos involucrados en la TFD. Tal y como se indicó anteriormente, el fotosensibilizador de uso tópico MAL, es un precursor del elemento fotoactivo PpIX. Tras la administración tópica del MAL en la superficie cutánea, se produce un proceso de difusión a través de las diferentes capas de la piel y a continuación una transformación metabólica en la PpIX. Diferentes estudios han demostrado la gran influencia que tiene la capa córnea de la epidermis en el proceso de difusión del precursor hacia las capas más profundas de la piel y su distribución inhomogénea en el tejido. Para obtener dicha distribución durante el periodo de incubación de 3 horas impuesto por el protocolo para Metvix[®], se empleó la ley de difusión de Fick teniendo en cuenta la permeabilidad de la capa córnea, el coeficiente de difusión en el tejido, el tiempo de relajación del precursor como consecuencia de la generación del fotosensibilizador y otros procesos como el flujo linfático y la perfusión sanguínea, así como la concentración inicial de precursor aplicada en la superficie del tumor [9]. Esta última se obtuvo a partir de las indicaciones relacionadas con la administración de la crema Metvix[®] que se recogen en el protocolo clínico, considerando en todos los casos una lesión con una extensión superficial circular, la densidad de precursor en la crema y su masa molecular. Considerando que el tiempo de relajación de la PpIX es mucho más pequeño que el tiempo de difusión del MAL, la concentración de PpIX producida endógenamente es proporcional a la concentración instantánea de MAL.

La interacción fotoquímica que tiene lugar entre la luz, el fotosensibilizador y el oxígeno presente en el tejido se modeló mediante un sistema de ecuaciones diferenciales que permite obtener la evolución temporal de los componentes moleculares en los diferentes puntos de la muestra de tejido [10, 11]. Las soluciones del sistema de ecuaciones se obtuvieron mediante una herramienta de reso-

lución de ecuaciones diferenciales disponible en la plataforma Matlab®.

La distribución de la radiación óptica de excitación en medios turbios, fuertes dispersores de la luz, y con grandes variaciones en sus propiedades ópticas, como son los tejidos biológicos, se puede obtener mediante la Teoría de Transporte de la Radiación (RTT). Para resolver la ecuación RT en el estado estacionario se empleó el método de Monte Carlo de Wang y Jacques [12]. Esta implementación es multicapa, con sus bordes perpendiculares al haz de la fuente óptica y por lo tanto adecuada para el cálculo de la distribución óptica en medios estratificados como la piel. En este trabajo se consideraron las propiedades ópticas de cada capa de tejido a la longitud de onda de la TFD (635 nm).

La emisión de fluorescencia del fotosensibilizador en cada punto de la muestra del tejido (705 nm) se obtuvo a partir de la densidad de fotones de excitación absorbidos por las moléculas de fotosensibilizador y el rendimiento cuántico de fluorescencia [13]. La distribución espacial no uniforme de fluoróforo y su variación temporal provoca que las fuentes emisoras de fluorescencia en cada posición del tejido varíen a lo largo del tratamiento. A partir de estas fuentes de fluorescencia se obtuvo la fluorescencia debida a las moléculas de fotosensibilizador que escapa de la superficie del tumor. Para ello, se empleó otra aproximación del método de Monte Carlo [14], que fue modificada para considerar fuentes de fluorescencia locales que sufren una variación espacial y temporal dinámica [8]. Así, en un instante determinado del tratamiento, la fluorescencia total que escapa de la superficie del tumor J_f en una determinada posición radial r se puede obtener acumulando el flujo que escapa en superficie producido por cada fuente de potencia de fluorescencia tal y como se expresa en (1). En esta ecuación r_s y z_s son las coordenadas de la fuente de fluorescencia, $\Delta V(r_s, z_s)$ es el volumen incremental asociado con la posición de la fuente y $T(r_s, z_s, r)$ es la función de transferencia de fluorescencia desde la fuente hasta la superficie del tejido [8].

$$J_f(r, t) = \sum_{r_s} \sum_{z_s} P_f(r_s, z_s, t) \Delta V(r_s, z_s) T(r_s, z_s, r) \quad (1)$$

3.- Aplicación del modelo: resultados y discusión

El modelo dosimétrico para TFD-MAL descrito anteriormente se aplicó a tres tipos diferentes de cáncer de piel no melanoma: CBCI, CBCN y CCE. Se consideró en todos los casos una lesión de radio superficial 1 cm y 3 mm de profundidad. Las propiedades ópticas empleadas para los diferentes tipos de tejido a la longitud de onda de tratamiento y de emisión de fluorescencia se recogen en la Tabla 1 [15]. En todos los casos se considera un haz óptico cilíndrico de 0.3 cm de radio perpendicular a la muestra de tejido, una irradiancia de 100 mW/cm² y un tiempo de radiación de 10 minutos.

Longitud de onda de excitación (635 nm)		
Tipo de tejido	μ_a (cm ⁻¹)	μ_s (cm ⁻¹)
CBCI	1.5	142.85
CBCN	1.5	104.76
CCE	2	95.238
Longitud de onda de emisión (705 nm)		
CBCI	1.5	100
CBCN	0.8	90
CCE	1	85

Tabla 1. Propiedades ópticas de los tejidos a las longitudes de onda de excitación y de emisión (μ_a : coeficiente de absorción; μ_s : coeficiente de scattering) [15].

La concentración inicial de MAL en la superficie de la lesión se calculó en base a las especificaciones del protocolo clínico para Metvix®, donde se recomienda la aplicación de 1 mm de grosor de crema cubriendo 5 mm extra de piel sana alrededor de la patología y un periodo de incubación de 3 horas antes de aplicar la radiación óptica. Una descripción más detallada de los parámetros empleados tanto para el cálculo de la distribución del fotosensibilizador en el tejido, como para la interacción fotoquímica se puede consultar en trabajos previos [16].

En la Fig. 1 se representa la dependencia temporal de la fluorescencia media que escapa de la superficie del CBCI en función de la coordenada radial. Se llevaron a cabo un total de 10 iteraciones para cada tipo de cáncer de piel y su distribución particular de fuentes de fluorescencia en diferentes instantes temporales. Las barras de error representan la desviación estándar para el total de interacciones. Tal y como se puede observar el aumento de la degradación del fotosensibilizador como consecuencia del fotoquemado y la absorción de la señal de fluorescencia particular en cada patología produce una disminución de la fluorescencia que escapa en la superficie del tumor a medida que progresa el tiempo de tratamiento. Igualmente se puede observar el efecto del radio del haz óptico sobre el área superficial de máxima emisión. Lo que pone de manifiesto la necesidad de disponer de modelos tridimensionales para evaluar la influencia del perfil del haz óptico empleado sobre la predicción obtenida.

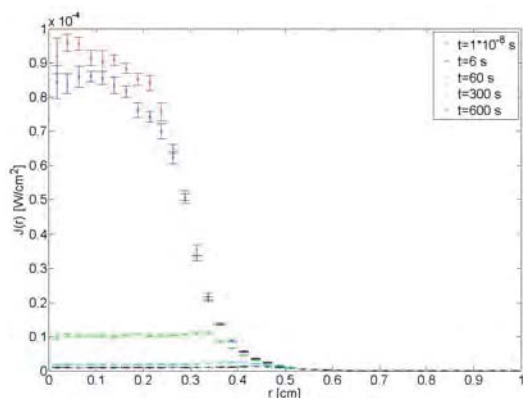


Fig. 1: Fluorescencia que escapa en la superficie del CBCI (W/cm^2) vs. componente radial en diferentes instantes temporales a lo largo del tratamiento.

Los patrones de fluorescencia superficial obtenidos a medida que transcurre el tratamiento para los diferentes tipos de tejido maligno muestran claras diferencias. Como ejemplo, en la Fig. 2 se representa la fluorescencia que escapa en la superficie vs. la componente radial en el CBCI, el CBCN y el CCE cuando ha transcurrido la mitad del tiempo de tratamiento. Como se puede observar, a pesar de que su tendencia espacio-temporal es similar en los tres tipos de tumor bajo las mismas condiciones de tratamiento, la fluorescencia detectada en la superficie

varía para cada lesión. Esto mismo ocurre en todos los instantes temporales a lo largo del tratamiento.

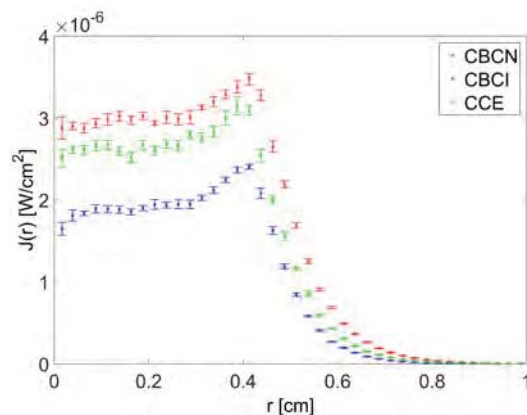


Fig. 2: Fluorescencia que escapa en la superficie (W/cm^2) del CBCN, CBCI y CCE vs. componente radial cuando ha transcurrido la mitad del tratamiento (300 s).

La cuantificación estadística de las diferencias encontradas en el área de incidencia directa del haz óptico revela un incremento medio por encima del 50 % entre el CBCN y el CBCI a lo largo de todo el tratamiento (50.39 % en el primer minuto, 58.22 % a mitad del tratamiento y 56.51 % al final). Esta diferencia se reduce ligeramente si se compara el CCE y el CBCI a 35.30 %, 40.62 % y 39.46 % respectivamente. La discriminación entre patologías se reduce considerablemente entre el CBCN y el CCE. En cuyo caso la diferencia se reduce a 11.18 %, 12.53 % y 12.25 %. Este tipo de resultados son de gran ayuda para la monitorización personalizada de la evolución del tratamiento fotodinámico y además reflejan la importancia del tipo de tumor para planificar adecuadamente el tratamiento ya que los patrones de fluorescencia tienen una relación directa con la degradación del fotosensibilizador durante la reacción fotoquímica y en consecuencia con la generación de agente citotóxico. Igualmente las diferencias observadas en los instantes iniciales del tratamiento, le confieren al modelo presentado utilidad desde el punto de vista del fotodiagnóstico diferencial.

4.- Conclusiones

Se ha analizado la fluorescencia superficial emitida por el fotosensibilizador MAL-PpIX durante el transcurso de la TFD en diferentes

tipos de cáncer de piel no melanoma mediante un modelo predictivo. Los resultados obtenidos revelan diferencias incluso superiores al 50 % dependiendo del tipo de tumor. Por lo que resultan de gran importancia para la planificación y monitorización del tratamiento fotodinámico, así como para el fotodiagnóstico diferencial.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Fundación San Cándido.

Referencias

- [1] M. R. HAMBLIN, P. MRÓZ, “Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical” (Engineering in medicine & Biology, 2008).
- [2] S. CHOUDHARY, J. TANG, M. L. ELSAIE, K. NOURI, “Lasers in the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer”, *Dermatol. Surg.*, 37, 409-425, 2011.
- [3] A. E. O’CONNOR, W. M. GALLAGHER, A. T. BYRNE, “Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy”, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 85, 1053–1074, 2009.
- [4] B. C. WILSON, M. S. PATTERSON, L. LILGE, “Implicit and Explicit Dosimetry in Photodynamic Therapy: a New Paradigm”, *Lasers Med. Sci.*, 12, 182-199, 1997.
- [5] B. LIU, T. J. FARRELL, M. S. PATTERSON, “Comparison of noninvasive photodynamic therapy dosimetry methods using a dynamic model of ALA-PDT of human skin”, *Phys. Med. Biol.*, 57, 825-841, 2012.
- [6] M. A. WESTON, M. S. PATTERSON, “Monitoring oxygen concentration during photodynamic therapy using prompt photosensitizer fluorescence”, *Phys. Med. Biol.*, 58, 7039-7059, 2013.
- [7] R. M. VALENTINE, C. T. A. BROWN, H. MOSELEY, S. IBBOTSON, K. WOOD, “Monte Carlo modeling of in vivo protoporphyrin IX fluorescence and singlet oxygen production during photodynamic therapy for patients presenting with superficial basal cell carcinomas”, *J. Biomed. Opt.*, 16, 048002-1-11, 2011.
- [8] I. SALAS-GARCÍA, F. FANJUL-VÉLEZ, J. L. ARCE-DIEGO, “Superficial radially-resolved fluorescence and three-dimensional photochemical time-dependent model for Photodynamic Therapy”, *Opt. Lett.*, 39, 1845-1848, 2014.
- [9] L. O. SVAASAND, P. WYSS, M. T. WYSS, Y. TADIR, B. J. TROMBERG, M. W. BERNIS, “Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizers”, *Lasers in Surgery and Medicine*, 18, 139-149, 1996.
- [10] T. H. FOSTER, R. S. MURANT, R. G. BRYANT, R. S. KNOX, S. L. GIBSON, R. HILF, “Oxygen consumption and diffusion effects in PDT”, *Radiation Research*, 126, 3, 296-303, 1991.
- [11] X. H. HU, Y. FENG, J. Q. LU, R. R. ALLISON, R. E. CUENCA, G. H. DOWNIE, C. H. SIBATA, “Modeling of a type II photofrin-mediated PDT process in a heterogeneous tissue phantom”, *Photochemistry and Photobiology*, 81, 1460-1468, 2005.
- [12] L. WANG, S. L. JACQUES, L. ZHENG, “MCML – Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues”, *Comput. Meth. Programs Biomed.*, 47, 131-146, 1995.
- [13] I. SALAS-GARCÍA, F. FANJUL-VÉLEZ, J. L. ARCE-DIEGO, “Spatial photosensitizer fluorescence emission predictive analysis for photodynamic therapy monitoring applied to a skin disease”, *Opt. Commun.*, 285, 1581-1588, 2012.
- [14] S. L. JACQUES, “Monte Carlo Simulations of Fluorescence in Turbid Media, Handbook of Biomedical Fluorescence”, (B. W. Rogue and M. A. Mycek, eds. CRC Press, 2003).
- [15] E. SALOMATINA, B. JIANG, J. NOVAK, A. N. YAROSLAVSKY, “Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range”, *J. Biomed. Opt.*, 11, 0640261-640269, 2006.
- [16] I. SALAS-GARCÍA, F. FANJUL-VÉLEZ, J. L. ARCE-DIEGO, “Photosensitizer absorption coefficient modeling and necrosis prediction during photodynamic therapy”, *J. Photochem. Photobiol., B-Biol.*, 114, 79-86, 2012.