

DETERMINACIÓN DE LA PpIX EN LA PIEL DE RATÓN POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Ramón-Gallegos E. *, Ponce-Parra C. **, López Bueno G. **, Elías-Serrano R. *, Calderón A. †, Muñoz-Hernández R. †, Pérez Zapata A. J. *, Cruz Orea A. ** y Sánchez-Sinencio F. **

*Lab. de Citopatología Ambiental. Depto. de Morfología. ENCB-IPN. Carpio y Plan de Ayala S/N. Col. Sto. Tomás. Delegación Miguel Hidalgo. C.P. 11340. México, D.F.; evaramong@portugalmail.pt

**Lab. de Técnicas Fototérmicas. Depto. de Física, CINVESTAV-IPN. A.P. 14-740, México, D.F. +CICATA-IPN. +Legaria 694. Col. Irrigación. C.P. 11500, México, D.F.

Resumen: A la fecha se ha mencionado que la protoporfira IX (PpIX) que induce el ácido δ -aminolevulínico (ALA), utilizado en la Terapia Fotodinámica (PDT), se acumula en la epidermis y no en la dermis como en ciertas patologías, pero los métodos que han utilizado para demostrar lo anterior no son tan sensibles. En el presente trabajo se desarrolló una metodología de separación en fase de los espectros fotoacústicos (EFA) de la piel para determinar la localización precisa de la PpIX. Se expusieron ratones CD1 por vía I.P. a concentraciones de 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA, por 1, 0.75, 0.50 y 1 h respectivamente. Se obtuvieron fragmentos de piel de la región abdominal a los que se les determinaron los espectros de absorción ópticos (EAO) de 300 a 700 nm utilizando un espectrofotómetro fotoacústico y finalmente se obtuvo una señal a una determinada longitud de onda dependiente de la amplitud y fase, las cuales se separaron y nos dieron 2 espectros de absorción de los principales cromóforos.

La espectroscopia fotoacústica permitió conocer que la PpIX en la piel normal se localiza en la dermis, cerca de la membrana basal, no en la epidermis como se ha manejado hasta la fecha. Los valores del coeficiente de absorción óptico (β) a 630 nm, muestran que la penetración de la luz en la piel para esta longitud de onda es mayor a dosis bajas de ALA.

INTRODUCCIÓN

En los materiales biológicos las técnicas espectroscópicas convencionales presentan muchas dificultades inherentes a la alta dispersión de la luz y de estructuras que varían con la profundidad (por ejemplo, sangre, piel y plantas). Las ventajas de las técnicas fototérmicas son que permiten obtener espectros de medios que presentan una alta dispersión de luz y obtener un perfil en profundidad significativa de la muestra analizada, además de determinar propiedades térmicas y estudios de cinética de fenómenos fotoquímicos de materiales biológicos, que han sido demostrados por varios investigadores [1]. Por otro lado, a la fecha se ha mencionado que la protoporfira IX (PpIX) que induce el ácido δ -aminolevulínico (ALA), utilizado en la Terapia Fotodinámica (PDT) [2], se acumula en la epidermis y no en la dermis como en ciertas patologías [3], pero los métodos que han sido utilizados para demostrarlo, no son lo suficientemente sensibles. En el presente trabajo se desarrolló una metodología de separación en fase de los espectros fotoacústicos (EFA) de la piel para determinar la localización precisa de la PpIX, lo cual ayudará en la optimización del uso de láseres en la PDT.

METODOLOGÍA

Antes de analizar la PpIX en la piel se realizó el estudio farmacocinético de ésta molécula para determinar el tiempo óptimo de la mayor acumulación de la PpIX a diferentes dosis de ALA. Así se utilizaron 5 grupos de 4 ratones CD 1, se expusieron a las concentraciones de 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) por vía intraperitoneal (I.P.), en cada grupo se determinó la PpIX en la sangre obtenida por punción directa del corazón a las 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 h de exposición al ALA. Se utilizó un grupo testigo al que se le administró solución salina. De esta manera se obtuvieron los tiempos óptimos de exposición para cada dosis de ALA probada (1, 0.75, 0.50 y 1 h para 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA respectivamente). Posteriormente se trataron, por vía I.P., los siguientes grupos (cada uno de 7 ratones): uno con solución salina fisiológica, 4 con 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA, y uno más con 160 mg/kg de ALA con 100 mg/kg de α -tocoferol, se expusieron a sus tiempos óptimos y se sacrificaron para obtener fragmentos de 1cm² de piel, de la región abdominal de los ratones, que inmediatamente fueron incluidos en tissue-teck y almacenados a -20°C hasta su análisis fotoacústico. Minutos antes de

realizar el ensayo, los fragmentos de la piel fueron descongelados, rasurados y se dejaron secar. Las muestras se colocaron en la celda fotoacústica con el lado de la epidermis hacia arriba, se extendieron perfectamente con unas pinzas y por último se selló la celda con una tapa de cuarzo y grasa para vacío.

Los espectros de absorción fueron obtenidos desde 300 hasta 700 nm con un espectrofotómetro fotoacústico con las siguientes características: lámpara de Xenón (Oriel) de 1000W, frecuencia mecánica variable de 17 Hz, monocromador para monitorear a intervalos de 1 nm, celda de cuarzo que contenía un micrófono el cual fue conectado a un amplificador lock-in (SR-850) que transfirió la señal simultáneamente a una computadora personal mediante una interfase dando finalmente una señal a una determinada longitud de onda dependiente de la amplitud y fase. La señal fotoacústica fue normalizada con respecto a la obtenida del carbón químicamente puro, para tener referencia del espectro de emisión de la lámpara (Xe).

Del espectro de absorción óptico se determinó el coeficiente de absorción óptico como una función de la longitud de onda, esto es posible gracias a que las muestras son térmicamente gruesas, esto quiere decir $a_s l_s \gg 1$, donde $a_s = \sqrt{pf/a}$ es el coeficiente de difusión térmico, f la frecuencia de modulación de la luz, α y l_s son la difusividad térmica y el grosor de la muestra respectivamente. En este caso todas las muestras fueron térmicamente gruesas considerando $\alpha \cong 0.001 \text{ cm}^2/\text{s}$ [4], siendo así posible utilizar la siguiente relación para calcular el coeficiente de absorción óptico [5]:

$$b = (a_s) \left[q^2 + q(2 - q^2)^{\frac{1}{2}} \right] / (1 - q^2) \quad (1)$$

Donde q es la intensidad fotoacústica normalizada.

El método que se utilizó para la separación del espectro de absorción de dos niveles de cromóforos (melanina y pigmentos con grupo hemo) de la piel de ratón es llamado *Método de Separación en la Fase*, el cual ha sido utilizado ampliamente con otras muestras en espectroscopía fotoacústica [4,6].

RESULTADOS

En los EFA obtenidos, aplicando el método de separación en la fase, se observó que todas las muestras presentaron el espectro característico de la melanina (línea segmentada), de la hemoglobina y PpIX (línea sólida) (figura 1). De acuerdo con los resultados del valor de $X_B - X_A$ ($86 \mu\text{m}$), se puede decir que la PpIX está localizada en la dermis cerca de la membrana basal, considerando que el grosor de la epidermis de ratón es de $37.5 \mu\text{m}$.

Los EFA de las diferentes concentraciones de ALA difieren en amplitud, siendo más evidente alrededor de la región de 400 nm (banda de solet y grupo hemo). De acuerdo con las diferentes concentraciones de PpIX que contienen las muestras provenientes de las diferentes exposiciones al ALA, las diferencias de la amplitud de los picos encontrados a 416 nm fueron obtenidas contra la exposición al ALA (figura 2).

Utilizando la ecuación 1 se obtuvo el espectro de absorción óptico y el coeficiente de absorción óptico (β) y se encontró que la presencia de la PpIX modifica a este último. La tabla 1 muestra los valores de β obtenidos a 630 nm, a las diferentes concentraciones de ALA administrados.

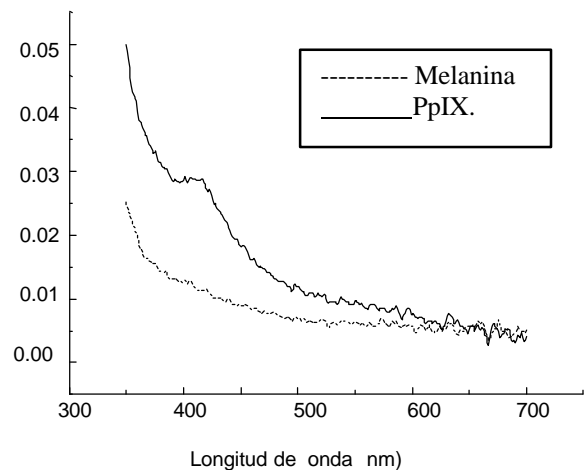


Figura 1. Separación en fase del EFA de la piel de ratones expuestos a 160 mg/kg de ALA.

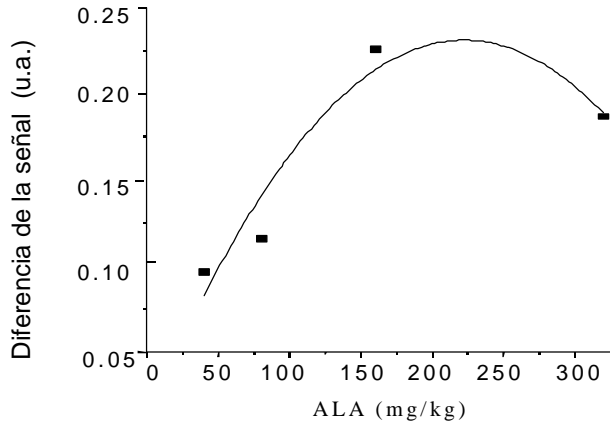


Figura 2. Diferencia de los EFA de la absorción de la PpIX a 416 nm en la piel de ratones, como una función de la administración del ALA.

Tabla 1. Coeficientes de absorción óptico a 630 nm en la piel de ratones tratados con ALA.

ALA administrado (mg/kg)	β (cm ⁻¹)
0	4.57
40	7.53
80	7.58
160	3.02
160+ α -tocoferol	3.20
320	4.68

DISCUSIÓN

Los EFA de la piel de los ratones tratados con ALA, fueron tomados por el lado de la epidermis, dado que por el lado de la dermis se presentan factores difíciles de controlar, como son la cantidad de vasos sanguíneos lo cual está relacionado con el número de centros de absorción. Las fracciones de piel se tomaron de la misma área y los espectros a la misma longitud de difusión térmica

$$m_T = \sqrt{\frac{a}{p}} f \text{ que es la profundidad de la piel}$$

en donde la onda térmica originada es registrada. Aplicando el *método de separación en la Fase* [4,6] (figura 1), a los pigmentos de la dermis (principalmente hemoglobina y protoporfirina IX), el espectro de la superficie (línea segmentada) corresponde al de la melanina en donde se ve que disminuye su absorbancia con el incremento de la longitud de onda. El espectro de la línea sólida corresponde al de la hemoglobina y PpIX en donde el pico de 400 nm corresponde al de las moléculas del grupo hemo. En este caso únicamente la banda de absorción máxima de ambos pigmentos (cromóforos con grupo hemo y melanina) puede ser separada por este método. La diferencia de fase entre los dos componentes (melanina y grupo hemo) obtenida por este método en promedio fue de $114^\circ \pm 5\%$ para todas las muestras. El corrimiento de fase Φ_A en la epidermis se puede escribir como $a_s X_A$ donde X_A es la profundidad media de la epidermis. Suponiendo que ambas capas (epidermis y dermis) tienen aproximadamente la misma difusividad térmica y si denotamos por X_B el espesor de la dermis, la diferencia de fase puede escribirse entonces [7],

$$\Phi_A = a_s(X_B - X_A) \quad (2)$$

De la ecuación 2, se puede obtener el valor de $X_B - X_A$, en este caso fue aproximadamente de 86 μm con base en esto, se puede proponer que la PpIX está localizada en la dermis cerca de la membrana basal.

De acuerdo con las diferentes concentraciones de PpIX que contienen las muestras provenientes de las diferentes exposiciones al ALA, las diferencias de la amplitud de los picos obtenidos a 416 nm fueron obtenidos contra la exposición al ALA (figura 2). Los espectros fueron tomados de la epidermis, en donde se encuentra una homogeneidad en el número de vasos sanguíneos a la longitud de difusión térmica y diferencias de amplitud que pueden ser atribuidas a la PpIX acumulada cerca de la membrana basal.

Los espectros generados por espectroscopía fotoacústica tienen una ventaja particular sobre las técnicas convencionales en muestras heterogéneas, debido a que se generan espectros de diferentes compuestos a partir de un sólo espectro en un modo de corrimiento de fase; este

efecto lo presentan las muestras multicapas como lo es la piel. En este caso, también fue posible encontrar a que nivel se localiza la PpIX a partir del ángulo de separación en la fase de la señal fotoacústica.

Utilizando la ecuación 1 se obtuvo del espectro de absorción óptico, el coeficiente de absorción óptico (β) y se encontró que la presencia de la molécula de PpIX modifica a este último, lo que explica que a mayor dosis de ALA, existan más moléculas de PpIX y por lo mismo más centros de absorción. Se ha reportado que el coeficiente de absorción óptico en músculo de rata, varía con respecto al número de moléculas fotosensibles al ser administradas en el animal (tabla 1) [8]. Es necesario mencionar que los valores de β , son efectivos para un sistema complejo de láminas, en este caso la piel es una muestra que está compuesta por 3 láminas (epidermis, dermis y músculo), no se poseen referencias para la de piel de ratón, pues no han sido determinadas aún, pero se encontró en la literatura que el músculo de conejo tiene un β de 2.7 a 12.5 cm^{-1} y la dermis de piel humana caucásica de 7.08 cm^{-1} [9]. De tal forma que los valores obtenidos no están muy lejos de los citados por la literatura.

CONCLUSIONES

1. Con la espectroscopía fotoacústica se localizó a la PpIX en las diferentes capas de la piel, concluyendo que en la piel normal, se localiza en la dermis cerca de la membrana basal.
2. Los valores de β (coeficiente de absorción óptico) a 630 nm para las dosis de ALA probadas, muestran claramente que a dosis menores la penetración de la luz en la piel es mayor.

REFERENCIAS

- [1] Almond D., Patel P. Introduction and Elements of Photoacoustic Spectroscopy. Photothermal Science and Techniques, Ed. Chapman & Hall, London, 1996.
- [2] Kennedy J.C., Pottier R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for Photodynamic Therapy. J Photochem, Photobiol B: Biol., 14, 1992, 275-292
- [3] Batlle A.M. del C. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy a model for carcinogenesis. J Photochem Photobiol B Biol, 20, 1993, 5-22
- [4] Anjo M.D., Moore T.A., A Photoacoustic depth profile of β -carotene in skin. Photochem and Photobiol. 39, 1984, 635-640
- [5] Zegadi A., Slifkin M.A., Djamin M., Hill A.E., Tomlinson R.D. A Photoacoustic Study of CuInXGa1-XSe2 Alloys. Phys Stat. Sol. (a) 133, 1992, 533-540
- [6] Cesar C.L., Vargas H., Miranda L.C.M. Photoacoustic microscopy of layered samples: phase-detection technique. J Phys D: Appl Phys, 18, 1985, 599-608
- [7] Nery J.W., Pessoa O., Vargas H., Reis D. F.A.M., Gabrielli A.C., Miranda L.C.M., Vinha C.A. Photoacoustic Spectroscopy for Depth-profile Analysis and herbicide Monitoring in Leaves. Anal, 112, 1987, 1487-1489
- [8] Nilsson A.M.K., Berg R., Engels A. S. Measurements of the optical properties of tissue in conjunction with photodynamic therapy. App Opt, 34, 1995, 4609-4619
- [9] Wai F. C., Prah S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues. IEEE Journal of Quantum Electronics, 26, 1990, 2166-2185