

Estudio de efectos foto-inducidos en modelos de tejido-biológico usando pulsos láser de nanosegundos

Gerardo Salvador Romo Cárdenas, Santiago Camacho López

Departamento de óptica, División de física aplicada, CICESE. Carretera Tijuana- Ensenada, Km. 107 C.P. 22860
Ensenada, Baja California, México
gromo@cicese.mx, camachol@cicese.mx

Francisco Gerardo Pérez Gutierrez, Guillermo Aguilar

Mechanical Engineering, University of California, Riverside CA, USA, 92521.
fperezgu@engr.ucr.edu, gaguilar@engr.ucr.edu

RESUMEN

Estamos interesados en investigar la posible aplicación de pulsos láser en tratamientos médicos, para lo cual esperamos lograr una ablación controlada de material biológico con mínimos daños colaterales, ya sean estos térmicos o mecánicos.

En todo material irradiado con luz láser se presentan efectos térmicos debidos a la absorción y difusión de calor del material. De ahí que, con la intención de entender la interacción entre láseres pulsados y tejido biológico para fines de nuestra investigación; proponemos la siguiente serie de experimentos descrita en el trabajo. Esperamos obtener resultados, cuyo análisis, nos ayude a obtener conclusiones acerca de los efectos térmicos presentes en el material al ser irradiado por pulsos láser de nanosegundos

Palabras clave: Láseres pulsados, Tejido biológico, Aplicaciones médicas.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la misma invención del láser se reportó acerca de la ablación de materiales generando diversas investigaciones que a su vez trajeron consigo grandes avances tecnológicos. Estos estudios cada vez son más específicos y generalmente tratan problemáticas más complicadas.

Tal es el avance en dichas investigaciones, que ahora es bastante común escuchar acerca de cirugías láser en medicina, principalmente en oftalmología. Desde las primeras aplicaciones del láser en la medicina, se han hecho grandes esfuerzos por sustituir herramientas tradicionales de ese campo por láseres. Estos son fáciles de controlar, seguros, efectivos para cortar y remover tejido; el hecho de que en la industria se haya encontrado que los cortes hechos con láseres pulsados, tienen una gran precisión y generan menos daños colaterales, originó que se investigara sobre la interacción de láseres pulsados con tejido biológico, obteniéndose buenos resultados [1], ya que por ejemplo, se encontró que es posible llevar a cabo cirugías de cornea con mayor precisión [2]. La misma ventaja referente a los cortes, ha hecho que este tipo de láseres sea utilizado en otras ramas de la medicina, como en odontología y en neurocirugía [3,4].

Como en cualquier material, el tejido biológico se puede exponer a la irradiación de láser para estudiar los efectos de la interacción. En nuestro caso, estamos particularmente interesados en los efectos de la irradiación de un láser pulsado con el tejido biológico. También estamos interesados en investigar la posible aplicación de pulsos láser en tratamientos médicos, para lo cual esperamos lograr una ablación controlada de material biológico con mínimos daños colaterales, ya sean estos térmicos o mecánicos.

En nuestro caso, estudiamos la interacción de los láseres pulsados con tejido biológico orientados a un área específica de la dermatología; en particular se desea atacar las malformaciones vasculares conocidas como marcas de vino de oporto. Estas consisten en redes de vasos sanguíneos a profundidad que varía entre los 300 μ m y los 500 μ m, donde cada uno de estos vasos tiene un diámetro que varía de 30 μ m a 120 μ m. El paciente nace con estas malformaciones vasculares que nunca llegan a desaparecer; en algunos casos pueden generar glaucoma cuando la malformación está presente sobre los párpados [5]. También pueden generar hipertrofia de ciertos órganos cuando llegan a ser bloqueados por estos vasos sanguíneos y aunque no menos importante, llegan a generar una difícil carga psicológica en las personas que padecen de esta patología.

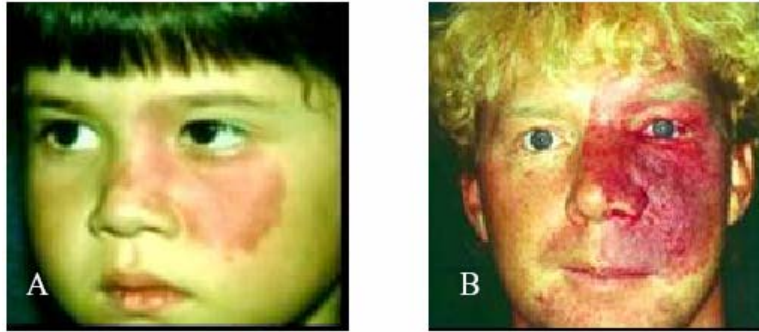


Figura 1. (A) Niña de 2 años de edad con marcas de nacimiento en el lado izquierdo de la cara. (B) Joven de 24 años con marcas de nacimiento en el rostro. Nótese la hipertrofia de los huesos y el tejido suave en (B).

En los tratamientos convencionales para este tipo de lesiones, el láser puede producir un sobrecalentamiento del tejido, resultado de las grandes cantidades de energía óptica transformadas en calor durante la interacción; y su propagación más allá del área ópticamente confinada (por medio difusión del calor) puede causar en el tejido un daño térmico colateral importante. La energía óptica se transfiere al tejido principalmente en función del coeficiente de absorción lineal, especialmente a bajas intensidades y este proceso es dependiente de la longitud de onda.

Una vez que la energía óptica se haya acoplado al material en forma de calor, este se propagará inmediatamente más allá del volumen de la irradiación; el proceso de la difusión del calor ocurre dentro de un tiempo característico determinado por las propiedades térmicas del material irradiado. En términos de desarrollo de tratamientos médicos láser para tejido biológico, como también de otros materiales para otros usos específicos, el tiempo de difusión de calor desempeña un papel muy relevante en la interacción del láser con el material. Cuando los láseres pulsados se utilizan para irradiar materiales hay algunos parámetros, relacionados con el pulso, que son de gran importancia para la interacción, esos parámetros son: la duración del pulso, energía por pulso, y en algunos con mayor relevancia, la frecuencia de repetición. Esta última adquiere su relevancia en función del tiempo característico de difusión de calor.

II. METODOS Y MATERIALES

En la etapa inicial de nuestro trabajo de investigación usamos sustitutos artificiales de tejido biológico llamados “*modelos de tejido*”. Diseñados por el Dr. Guillermo Aguilar (University of California Riverside), constituidos principalmente de agar y colorantes orgánicos.

El agar es un ficocoloide, es decir, un agente coloidal extraído principalmente de algas marinas. En estado sólido el agar es poroso, translucido y membranoso, presenta una coloración blanco-amarillento; es muy quebradizo cuando está seco y, prácticamente, insoluble en agua a 25°C, pero se solubiliza en agua a 100°C. La temperatura de gelificación varía entre 30°C y 40°C para soluciones al 1.5% en peso y se funde entre 60°C y 97°C. Esta característica térmica lo hace particularmente útil para hacer nuestros “*modelos de tejido*”, o sustitutos de tejido biológico, ya que al mantenerse en estado coloidal a altas temperaturas permitirá analizar los efectos de difusividad térmica al ser irradiado por un láser.

El tejido es un medio de cierta complejidad óptica en el que se presenta absorción óptica y esparcimiento. El tejido que constituye la piel está formado por varias capas cuya complejidad celular provoca que el tejido adquiera sus propiedades de esparcimiento de la luz. Por su parte, los diferentes componentes bioquímicos del tejido confieren a éste sus propiedades de absorción de la luz muy bien definidas (Fig. 2).

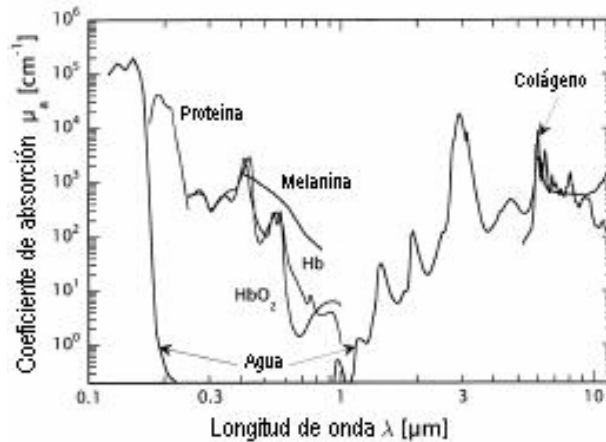


Figura 2. Espectro de absorción óptica para los principales cromóforos del tejido para distintas longitudes de onda [6].

Dado que uno de los objetivos principales es el de estudiar la irradiación de vasos sanguíneos, en la primera etapa diseñamos modelos de tejido agregando un colorante orgánico (Direct Red, Fisher Scientific), con propiedades de absorción que emulan las de la sangre. Se hicieron muestras con distintas concentraciones del colorante, de manera que se obtuvieron muestras con distintos coeficientes de absorción.

Usando un espectrofotómetro, (Elmer-Perkins, modelo 330) se obtuvo el espectro de absorción de una capa de agar de 500μm; dicho espesor fue el usado en nuestros experimentos.

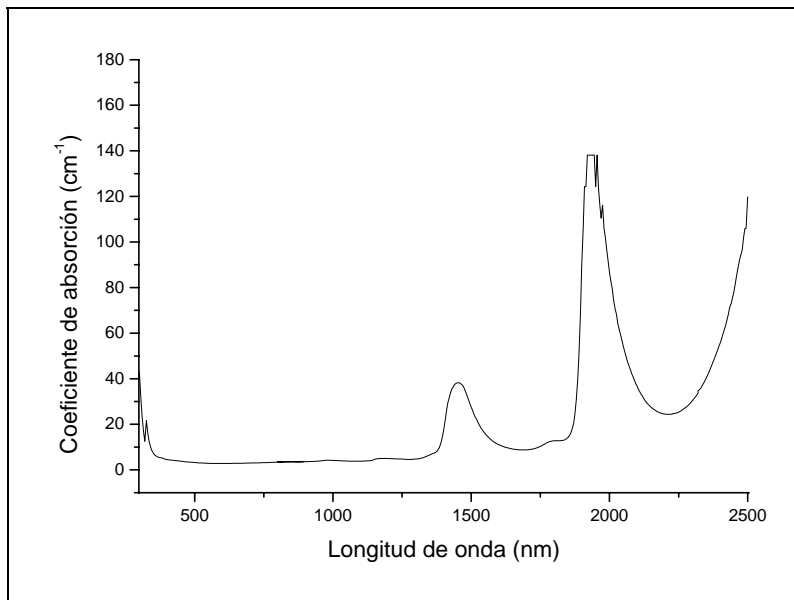


Figura 3. Espectro de absorción de agar transparente a distintas longitudes de onda

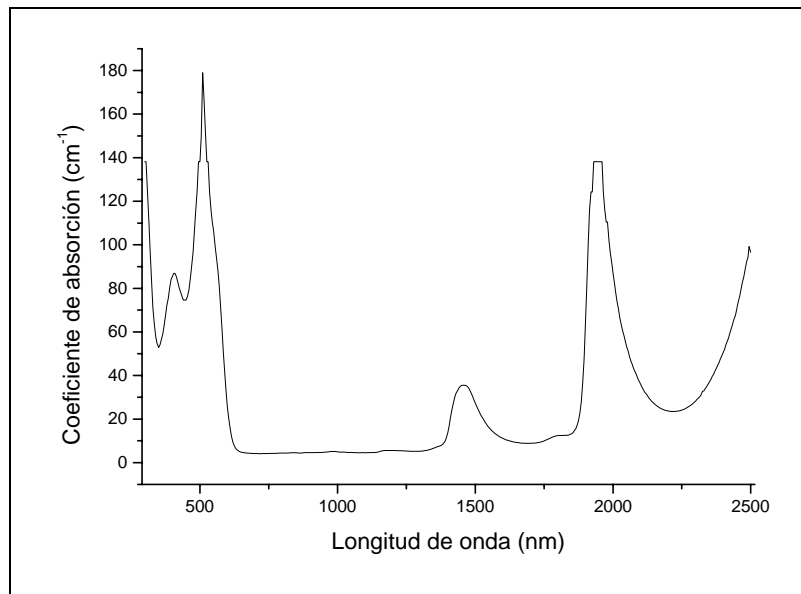


Figura 4. Espectro de absorción de agar con colorante (Direct Red) a una concentración de .001gr/ml , para distintas longitudes de onda

En nuestros experimentos usamos un láser Nd:YAG (Continuum) pulsado con una duración del pulso de $\tau=5\text{ns}$, doblado en frecuencia ($\lambda=532\text{nm}$); donde la energía por pulso depositada en el modelo de agar es medida por medio de un fotodiodo (Thorlabs, 201/579-77221), calibrado contra un medidor de energía (OPHIR Mod. PE10-SH), y monitoreada en un osciloscopio (Tektronix, TDS 520A)

El *modelo de tejido* a irradiar se coloca sobre un soporte x, y, z. Donde los movimientos en el plano x, y son controlados por computadora con una resolución de $0.1\mu\text{m}$, mientras Z se controla manualmente con una resolución de $5\mu\text{m}$; tal como se puede apreciar en la figura 6.

El haz se enfoca sobre el modelo de tejido usando una lente $f/\# = 1.27$, dando un diámetro en la cintura de $6.7\mu\text{m}$ en la horizontal y $6.1\mu\text{m}$ en la vertical. Por medio de la implementación de *plano objetivo equivalente* (ETP por sus siglas en inglés), es posible obtener una imagen ampliada del haz en la superficie del modelo de tejido. Esta imagen se obtiene por medio de una cámara CCD (figura 5).

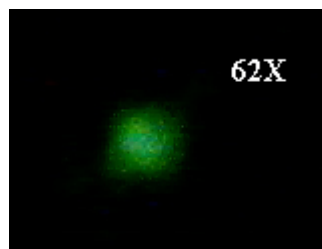


Figura 5. Imagen obtenida del ETP

Este arreglo ETP, cumple con tres funciones en el diseño de nuestro experimento; las cuales son: ubicar la cintura del haz, determinar la forma de la sección transversal del haz sobre la superficie del modelo de tejido y también nos permite monitorear el momento en que se tenga ablación.

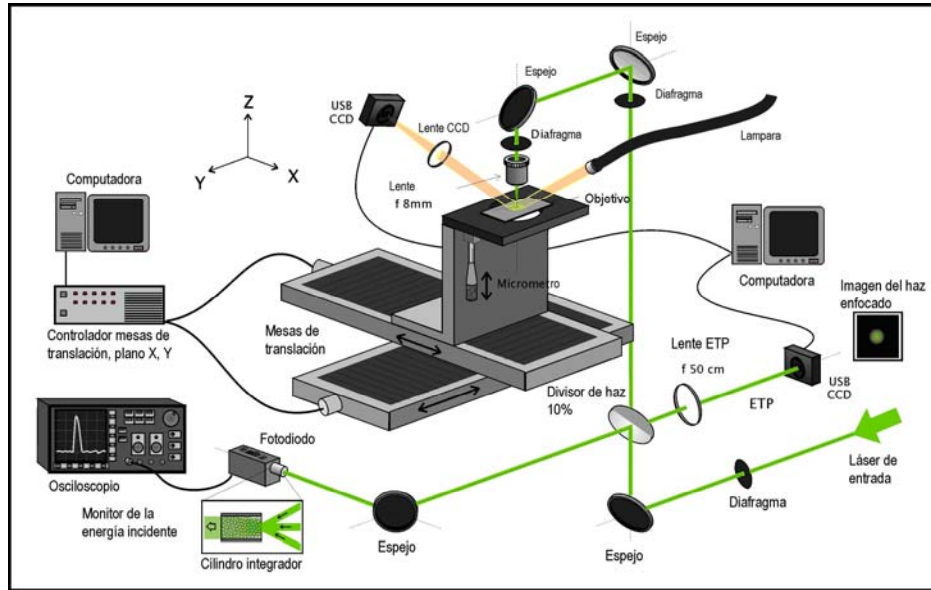


Figura 6. Estación de micromaquinado

Es de importancia crucial saber acerca de los efectos o del daño que se puede foto-inducir en el tejido, es por ello que los experimentos están diseñados para el estudio de:

a) Formación de burbuja en el tejido.

Se sabe que al usar un láser pulsado al irradiar tejido, se experimenta un efecto termoelástico que se refleja en la generación de burbujas de cavitación en el volumen irradiado [7]. Este efecto tiene origen en una onda de presión (perturbación mecánica), que también ha sido observada en cirugías de oftalmología; donde los daños colaterales, como el rasgado de tejido generado por esta onda, son corregidos por medio de agentes químicos [8].

Al enfocar el haz dentro del *modelo de tejido*, estamos concentrando una gran cantidad de energía en un volumen muy pequeño. Haciendo que cierta cantidad de agar con colorante inicialmente en estado coloide, se evapore, generando así un cambio de presión que hace que esta burbuja se expanda y al mismo tiempo ceda calor al volumen circunvecino. De manera que cuando se estabiliza el efecto la presión por expansión de la burbuja y la presión hidrostática del agar; se llega a un radio que finalmente tendrá esta burbuja. [9]

Siendo la fluencia promedio la energía que acarrea pulso dividida por el área de la sección transversal en la cintura del haz enfocado en el *modelo de tejido*. Para nuestro estudio definimos la fluencia umbral de daño como la fluencia necesaria para generar un daño permanente en el material (burbuja) usando un solo pulso. Esta fluencia umbral será un parámetro de referencia de gran utilidad en el análisis de nuestros resultados.

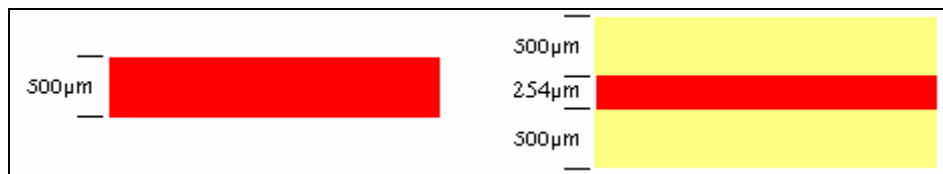


Figura. 7 Configuración de los modelos de tejido utilizados al estudiar la formación de burbuja bajo irradiación de un solo pulso

Para la determinación del umbral de generación de burbuja, se trabajó con dos configuraciones de *modelos de tejido* (figura 7). Estos se contenían una capa de agar de 500µm de espesor con distintos coeficientes de absorción óptica. Previamente sabíamos los coeficientes de absorción de concentraciones obtenidas a partir de una sustancia base formada de 1.4gr de colorante (Direct Red, Fisher Scientific) disueltos en 100ml de agua (figura 8).

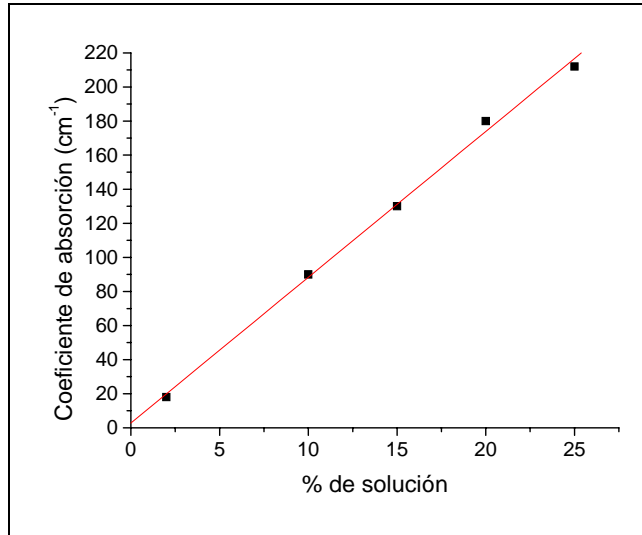


Figura 8. Coeficientes de absorción óptica para distintas concentraciones de colorante Direct Red en agua, para $\lambda = 532\text{nm}$.

Los *modelos de tejido* fueron irradiados por un solo pulso a distintas energías; colocando la cintura del haz a 100 μm de profundidad con respecto a la superficie del *modelo de tejido* (figura 9).

En cada muestra (distinto coeficiente de absorción) se hicieron secuencias de irradiación con pulsos cuya fluencia promedio fue cada vez menor hasta que se obtuvo el umbral de formación de burbuja.

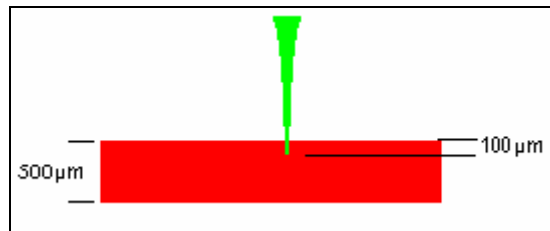


Figura 9. Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación del umbral de generación de burbuja en muestra de capa sencilla.

El otro modelo de *modelo de tejido*, compuesto por tres capas, emula un tejido biológico simplificado compuesto de varias capas. Donde se tiene una primer capa de agar sin colorante con un espesor de 500 μm , la siguiente capa de 254 μm de espesor se le llamó “capa absorbedora” la cual tiene un cierto coeficiente de absorción dado por la concentración de colorante (Direct Red, Fisher Scientific) en el agar; y finalmente una tercer capa de agar sin colorante de 500 μm de espesor (figura 7).

De igual manera, en las muestras se hicieron secuencias de irradiación con un pulso a diferentes energías colocando la cintura del haz a 100 μm de profundidad de la superficie de la capa absorbedora y a 600 μm de profundidad con respecto a la superficie del *modelo de tejido* (figura 10).

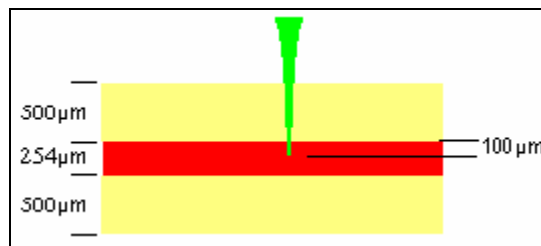


Figura 10. Esquema de irradiación del modelo de tejido para la determinación de umbral de generación de daño en una muestra de 3 capas.

b) Difusión de calor

Es de gran importancia analizar los efectos térmicos cuando el tejido es irradiado por láseres. Hay que empezar considerando que al irradiar una muestra de tejido, se genera calor a partir de la energía absorbida por la muestra. De ahí, según las características térmicas del tejido, se presentará un proceso de difusión de calor. Un exceso de calor según el tipo de tejido, puede llegar a producir daño importante en el mismo. Debe considerarse también que un rápido depósito de energía genera una perturbación mecánica, la cual también puede afectar el tejido circunvecino.

Cuando un tejido dérmico llega a los 45°C se presenta una hipertermia, a los 60°C se llega a una coagulación, a los 100°C se evapora y a mayores temperaturas, se carboniza.

Para analizar el comportamiento térmico del tejido al ser irradiado por pulsos láser, se construyeron *modelos de tejido* de cuatro capas, tal y como se aprecia en la figura 8.

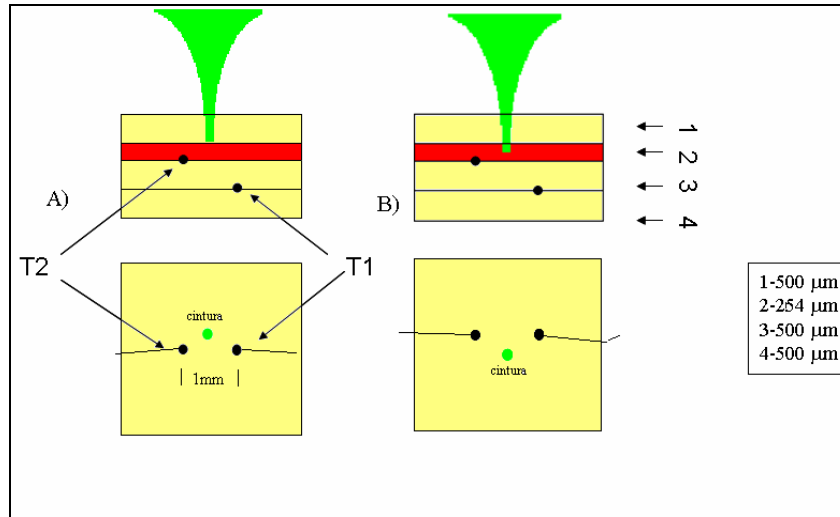


Figura 11. Esquema experimental para determinar el comportamiento térmico de modelo de tejido irradiado por pulsos láser directamente en la capa absorbedora. Las figuras inferiores tanto en A) como en B), corresponden a la vista superior del modelo de tejido; en donde se aprecian los puntos que fueron irradiados.

En donde irradiamos en dos posiciones. Como se aprecia en la parte A) de la figura 11 en donde se irradió en la superficie de la capa absorbedora; y como se puede ver en la parte B) de la misma figura, también se irradió a 100µm de profundidad en la capa absorbedora. En ambos experimentos se irradió durante un minuto con pulsos de 5ns de duración, a una frecuencia de repetición de 10Hz.

Para monitorear la temperatura alcanzada en la vecindad del volumen irradiado, se implementaron un par de termopares (tipo K, 127µm de diámetro Omega), uno de ellos T2, colocado entre la capa absorbedora y la capa inferior a esta; y el segundo T1, entre las capas tres y cuatro del *modelo de tejido*. Los termopares se conectaron a una tarjeta de adquisición de datos (Instrunet) a su vez conectada a una computadora en donde se almacenaron las mediciones.

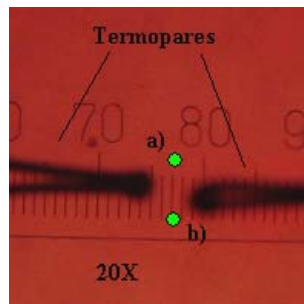


Figura 12. Modelo de tejido de $\alpha=251\text{cm}^{-1}$ antes de ser irradiado. Donde a) y b) representan los puntos en el modelo de tejido donde se llevaría a cabo la irradiación

Se hicieron irradiaciones a diferentes fluencias, teniendo como base la fluencia umbral de formación de burbuja para un solo pulso.

III. RESULTADOS

a) Determinación del umbral para formación de burbuja

Encontramos que el diámetro de la burbuja varía directamente como función de la fluencia, pero es independiente del coeficiente de absorción del modelo de tejido.

El diámetro de la burbuja formada a fluencia umbral se mantiene constante, $\sim 70\mu\text{m}$ independientemente del coeficiente de absorción y de la profundidad a la que se encuentre la cintura del haz, ya sea esta de $100\mu\text{m}$ o de $600\mu\text{m}$.

Las fluencias umbrales para la formación de burbuja a un solo pulso en un modelo de tejido de capa sencilla se presentan en la tabla 1.

Coeficiente de absorción (cm^{-1})	Umbral de generación de burbuja (kJ/cm^2)
0	.26
45.	.34
130	1.3
215	5.7

Tabla 1. Umbrales de generación de burbuja para modelos de tejido de capa sencilla; para distintos coeficientes de absorción óptica

Al graficar estos valores, podemos apreciar que existe una relación exponencial entre la fluencia umbral de generación de burbuja y el coeficiente de absorción óptica del modelo de tejido (figura 13).

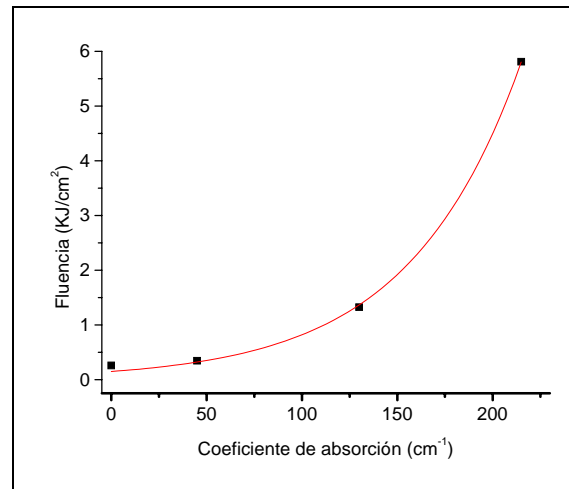


Figura 13. Fluencia umbral de daño a $100\mu\text{m}$ de profundidad en un modelo de tejido de capa sencilla para distintas concentraciones de colorante

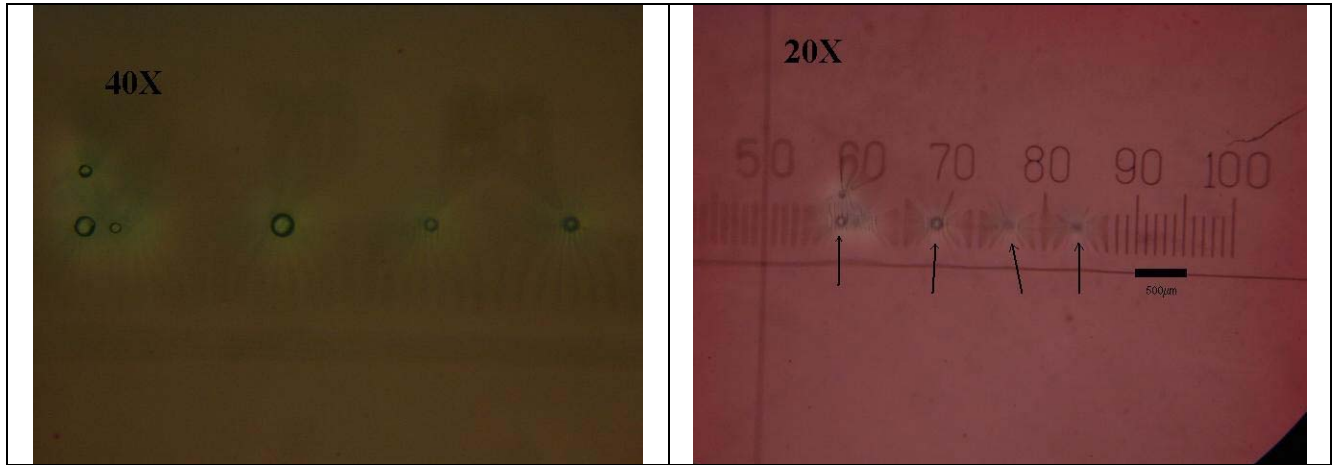


Figura 14. Imágenes del microscopio de las burbujas generadas en un modelo de tejido de $\alpha=45\text{cm}^{-1}$. En la figura de la derecha se colocó una escala por detrás de la muestra.

Si observamos la figura 15; podemos apreciar que es posible que al enfocar la cintura del haz a $100\mu\text{m}$ de profundidad con respecto a la superficie, se puede tener la suficiente fluencia en la superficie del modelo para generar daño en la superficie de *modelo de tejido*.

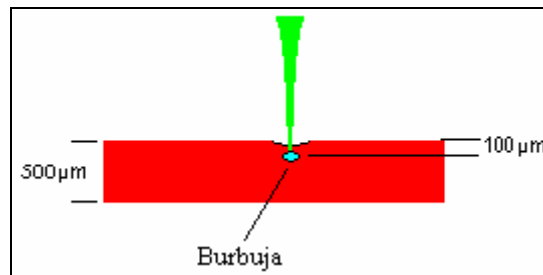


Figura 15. Esquema de formación de daño en la superficie del modelo de tejido al ser irradiado por un pulso láser de nanosegundos

Por otro lado, como era de esperarse, para el modelo de tejido de tres capas, los umbrales tienen que ser mayores, dados el ya mencionado efecto de absorción. Podemos apreciar también la relación exponencial que existe entre la fluencia umbral de generación de burbuja y el coeficiente de absorción de la capa absorbidora (figura 16).

Coeficiente de absorción (cm^{-1})	Umbral de generación de burbuja (kJ/cm^2)
0	.24
45	.95
13	4
215	25

Tabla 2. Umbrales de generación de burbuja para un modelo de tejido de 3 capas para distintos coeficientes de absorción en la capa absorbidora

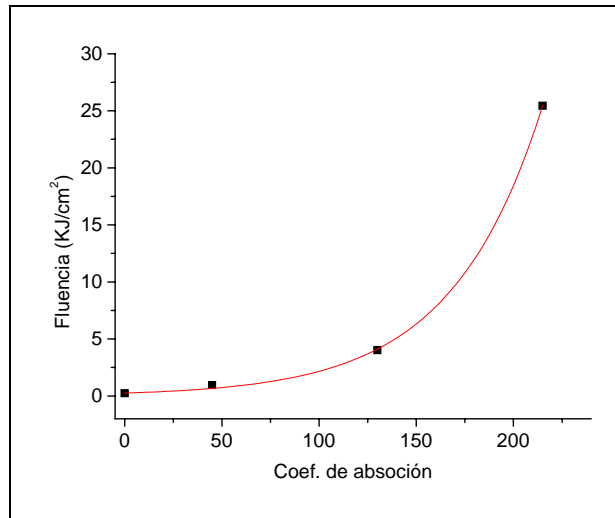
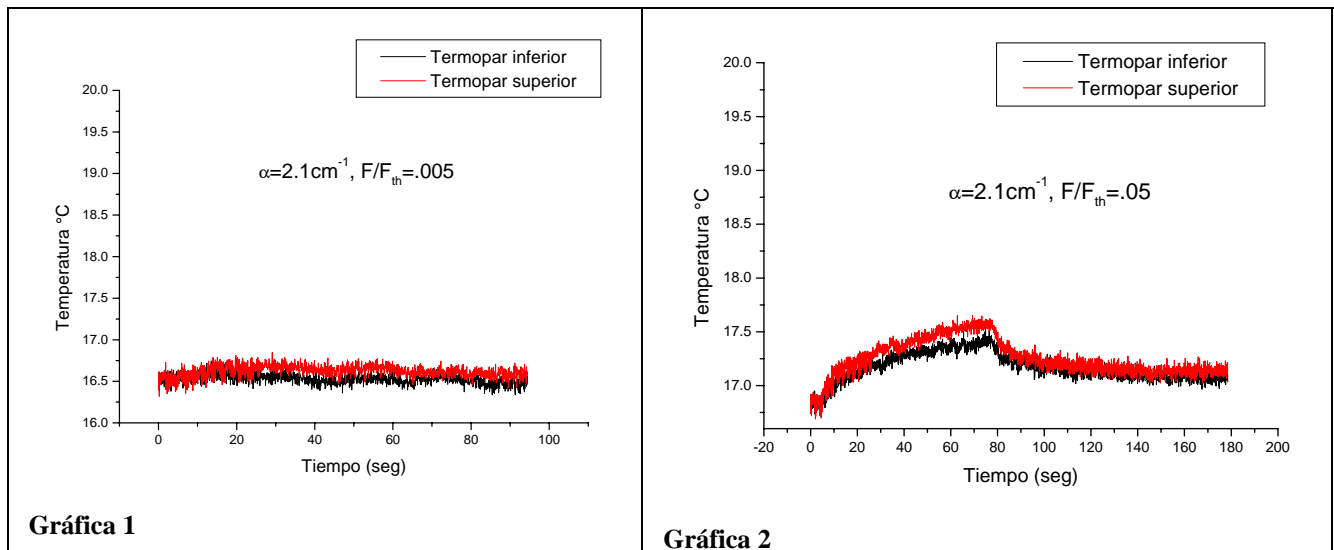


Figura 16. Umbral de daño en agar a 600µm de profundidad en un modelo de tejido de tres capas para distintos coeficientes de absorción de la capa absorbadora.

b) Difusión de calor

Las gráficas de la figura 17 y 18, presentan los resultados en las mediciones de temperatura de una muestra de $\alpha = 215\text{cm}^{-1}$. En donde es posible apreciar el comportamiento térmico del modelo de tejido a distintas fluencias.



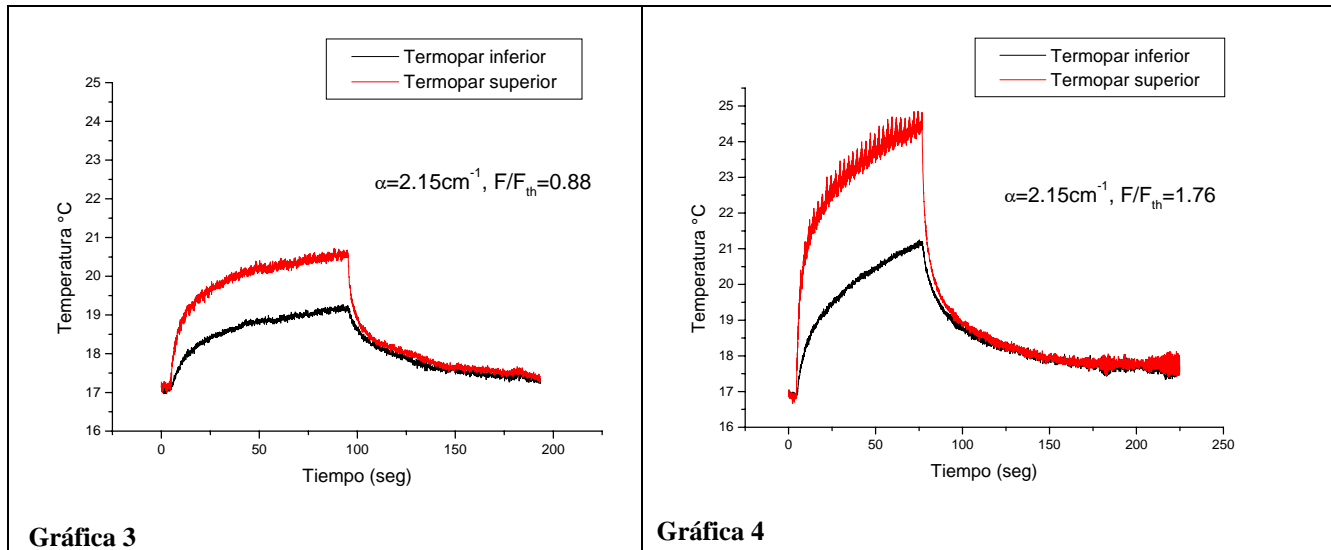


Figura 17. Graficas de temperatura durante y después de irradiación apuntando la cintura en la superficie de la capa absorbadora. F_{th} = fluencia umbral de generación de burbuja.

En los resultados presentados en las gráficas de la figura 17 nos servirán para una vez aplicando la teoría de difusión de calor, podamos encontrar la temperatura en el volumen de irradiación.

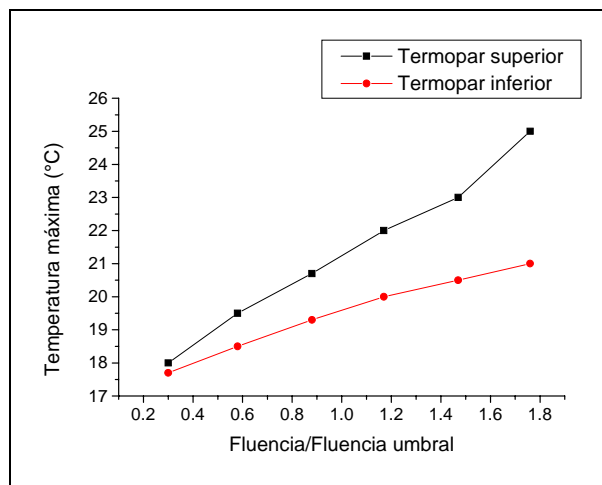


Figura 18. Temperatura máxima medida al enfocar la cintura del haz a $100\mu\text{m}$ al interior de la capa absorbadora para distintas fluencias.

De la figura 18 podemos observar que existe una relación lineal entre la temperatura máxima medida por los termopares y las distintas fluencias. Cuando se enfoca la cintura del haz dentro de la capa absorbadora, la diferencia entre las temperaturas medidas por los termopares, se hace cada vez mayor conforme se aumenta la fluencia, como se aprecia en la misma figura.

III. CONCLUSIONES

La determinación explícita de un umbral de formación de burbuja es de gran utilidad, ya que esto sirve como base para analizar con más detalle la interacción entre láseres pulsados y tejido biológico.

Pudimos determinar la relación que existe entre la fluencia umbral de formación de burbuja y el coeficiente de absorción óptica del tejido (figuras 13 y 16). Esta relación exponencial nos permitirá obtener teóricamente el umbral de formación de burbuja para tejidos con diferentes coeficientes de absorción.

Es interesante recalcar que encontramos que el diámetro de la burbuja a la fluencia umbral es constante para cualquier coeficiente de absorción. Este resultado es muy interesante y es necesario un análisis detallado de éste efecto.

Logramos obtener una buena colección de datos de la evolución térmica del tejido en función de los parámetros de irradiación. Estos en combinación con un algoritmo inverso de difusión de calor, nos llevarán a determinar las temperaturas alcanzadas en el volumen de material irradiado como función de la fluencia y del coeficiente de absorción del tejido.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico proporcionado por UCMEXUS y CONACyT para el desarrollo del proyecto: "Studies of ultrashort laser pulse interaction with vascular and pigmented dermatologic lesions" y de UCMEXUS para el proyecto UCR-Mexico Initiatives: "Effects of ultrashort laser pulse irradiation on melanocyte viability".

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kim, et al, "*Optical feedback signal for ultrashort laser pulse ablation of tissue*", Applied Surface Science, (1998), 127—129.
- [2] Juhasz, et al "*Corneal Refractive Surgery with Femtosecond Lasers*" IEEE Journal of selected topics in quantum electronics, Vol. 5, No. 4, july/august; (1999).
- [3] Loesel et al, "*Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses*" Appl. Phys. B, **66**, (1998), 121—128.
- [4] Matthews et al, "*Surgical applications of ultrashort pulse laser technology*", Advance solid state lasers, (1999). [9] Banks et al. "*Material effects in ultra-short pulse laser drilling of metals*", Applied physics, **69**, (1999), 377-380.
- [5] Kimel, Sol, et al, "*Vascular response to laser photothermolysis as a function of pulse duration, vessel type and diameter: Implications for por wine satín therapy*", Lasers in Surgery and Medicine vol, **30**, (2002, 160-169).
- [6] Vogel, A. Venugopalan, V. "*Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues*". Chemical Review, **103**, (2003), 577-644.
- [7] Paltauf, "*Model study to investigate the contribution of spallation to pulsed laser ablation of tissue*", Laser in surgery and medicine, No. 16, (1995), 277-287.
- [8] Lu, "*Action and reaction of plasma shock wave in the operation of ophthalmology*", Ophthalmology technologies III, SPIE vol. **1877**, (1993).
- [9] Vogel, A. "*Shock wave emission and cavitation bubble generated by picosecond and nanosecond optical breakdown in water*", Journal of the Acoustical Association of America, vol **100**, (1996), 148-165