

IV.-

ESTUDIOS PRECLÍNICOS (LATINA/PARK)

En 1995, Mark Latina y su colaborador Carl Park, aplicando los principios de la fototermolisis selectiva, compararon los efectos de radiaciones láser continuas y pulsadas sobre células pigmentadas y no pigmentadas cultivadas, a partir de malla trabecular bovina, y definieron los parámetros idóneos para hallar un régimen de láser cuya absorción quedase confinada a las células pigmentadas de la malla trabecular, sin afectar a las circundantes no pigmentadas, ni a los elementos de andamiaje tisular ²⁴.

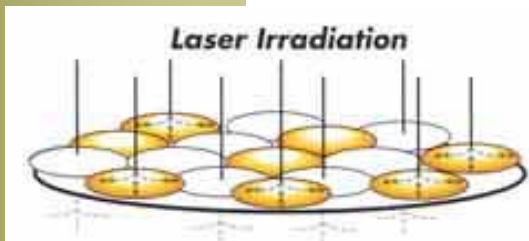


Fig. 7. Preparación mixta de células de MT bovina, con y sin pigmento, siendo sometidas a radiación láser.

El primer paso fue conseguir cultivos de células de malla trabecular bovina, parte de los cuales fueron teñidos con una suspensión uniforme de melanina procedente de tinta de calamar, a diferentes concentraciones conocidas. Prepararon también cultivos controles de células con inclusiones de látex, pero sin pigmento, para comprobar si el mero hecho de contener inclusiones celulares altera "per se" la absorción de la energía del láser. Finalmente, pues, obtuvieron cuatro clases de poblaciones

celulares, que distribuyeron en placas para ser irradiadas: a) Sin pigmento, b) Con pigmento a diferentes concentraciones conocidas (1 millón a 30 millones de partículas/ml), c) Con inclusiones de látex, sin pigmento y finalmente, d) Mixtas, con y sin pigmento, entremezcladas.

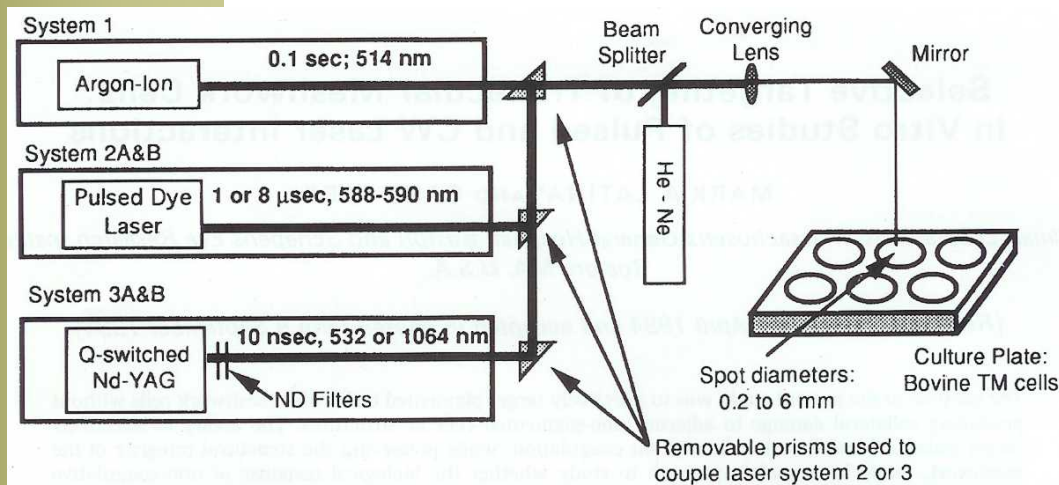


Fig. 8. Esquema del montaje del dispositivo único utilizado para los cuatro sistemas de láser, para irradiación de los cultivos celulares. Ver explicación en el texto.

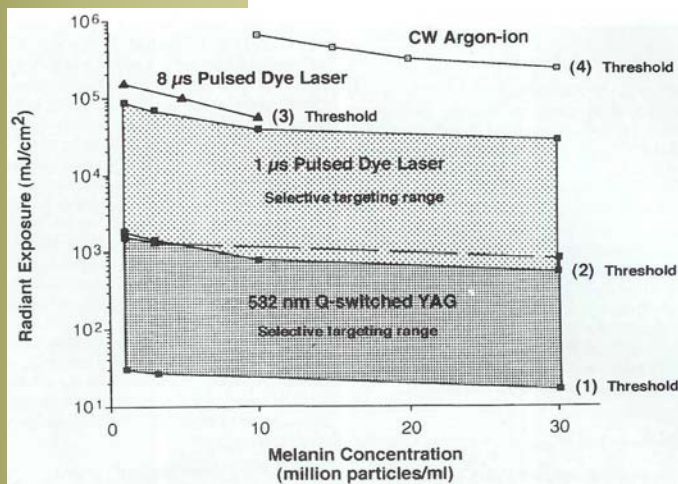


Fig. 9. Gráfico mostrando los umbrales de irradiación de los cuatro sistemas láser utilizados, en función de la cantidad de melanina de los cultivos celulares irradiados (Threshold 1,2,3 y 4). Puede verse también el rango selectivo de los dos sistemas láser que demostraron poseer esta cualidad, frente al láser de argón y al Dye pulsado a 8 microsegundos, que carecieron por completo de la misma, no distinguiendo entre células pigmentadas y no pigmentadas. Nótese que el láser Nd:YAG pulsado de 532 nm, necesita menos energía para obtener el mismo efecto.

Mientras tanto, seleccionaron cuatro sistemas láser a los que serían sometidas las diferentes poblaciones celulares: **1.)** Argón continuo, 514 nm, con un tiempo de exposición de 0,1s. **2.)** Dye, con dos modalidades: 2A) 590 nm, 8 μ s, 2B) 588 nm, 1 μ s. **3.)** Q-switched Nd:YAG frecuencia simple 1064 nm, 10 ns. **4.)** Q-switched Nd:YAG de doble frecuencia 532 nm, 10 ns. Los cuatro sistemas fueron montados en un mismo dispositivo para simplificar la tarea.

El primer problema a resolver, era saber la intensidad de irradiación adecuada para realizar el experimento, de manera que fuera posible obtener los resultados buscados. Un exceso de irradiación volatilizaría todas las células, independientemente de que contuvieran pigmento o no, y una intensidad baja, no produciría ningún

cambio en ninguna de ellas. Era necesario, por tanto, encontrar un nivel de energía que produjera daños objetivables en las células pigmentadas, sin producir su destrucción completa. Para ello, irradiaron en primer lugar las preparaciones celulares pigmentadas con los cuatro sistemas de láser, y seleccionaron para cada uno de ellos, aquella intensidad de irradiación con la que conseguían dañar al 50% de las células, denominando a dicha intensidad **umbral de irradiación**.

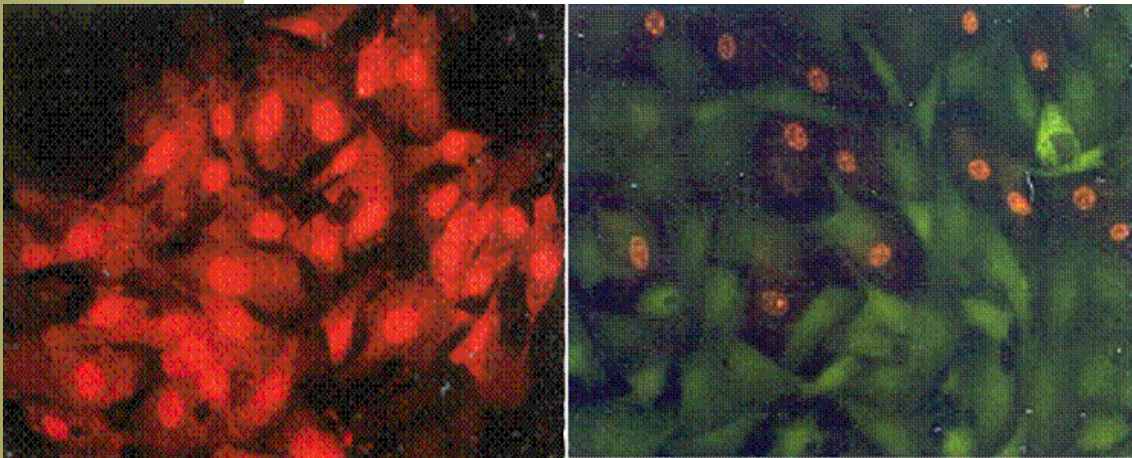


Fig. 10. Células irradiadas y posteriormente teñidas con colorantes de viabilidad (rojo nuclear para células dañadas y fluorescencia verde de membrana para células viables). Izquierda, ausencia de selectividad: todas las células aparecen dañadas. Derecha: Sólo algunas células muestran tinción nuclear, mientras que el resto exhiben fluorescencia de membrana.

Como a estas intensidades, los daños producidos en las células no se pueden observar mediante microscopía óptica convencional de contraste de fase (de manera que no se aprecian diferencias entre células dañadas y células intactas), una vez sometidas a la radiación, cada preparación era teñida con un set de colorantes de viabilidad/citotoxicidad, que utiliza Ethidium Homodímero (rojo nuclear) para células muertas, y Calceína AM (fluorescencia verde de membrana) para células vivas. Así, las células que resultaban dañadas presentaban núcleos rojos, sin tinción de membrana, mientras que las viables, sólo muestran tinción verde de membrana. De esta forma, resultaba sencillo realizar el conteo de células dañadas, seleccionando aquellas preparaciones con un 50% de núcleos teñidos de rojo, y registrando la intensidad a la cual habían sido sometidas, para determinar el **umbral de irradiación**.

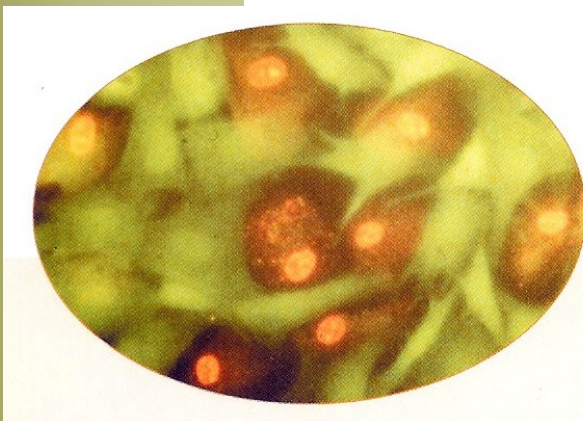


Fig. 11. Preparación mixta de células de MT bovina, con y sin pigmento, tras ser irradiadas con láser Nd:YAG 532 nm, y posteriormente teñidas con colorantes de viabilidad. Puede apreciarse el efecto de la selectividad, apareciendo células pigmentadas dañadas totalmente rodeadas de células no pigmentadas viables.

Una vez que determinaron el rango de potencia a utilizar, y la forma de cuantificar el efecto sobre las células irradiadas, sometieron a las diferentes poblaciones celulares a una intensidad umbral para cada uno de los sistemas láser, y encontraron que en las preparaciones sin pigmento no se produjo efecto alguno, y tampoco en las que contenían inclusiones de látex, mientras que en las preparaciones que contenían pigmento, se produjo daño celular en proporción variable. Como era de esperar, la cantidad de melanina contenida en el cultivo (1, 3 y 30 millones de partículas por ml) se mostró un factor determinante en el umbral de irradiación, de manera que a mayor contenido melánico, menor umbral, y viceversa, para todos los sistemas láser.

El paso siguiente fue la irradiación, con cada uno de los sistemas láser, de las preparaciones mixtas de células pigmentadas y no pigmentadas en proporción 1:1, para determinar el **rango selectivo de exposición radiante**, es decir, el rango de potencia que se puede utilizar para que sólo se produzca daño en las células pigmentadas, y permanezcan intactas las no pigmentadas, y así poder comparar los diferentes láseres.

Los resultados (Fig. 9) mostraron que, para el láser de argón continuo, no hubo rango selectivo. A cualquier intensidad el daño era sufrido tanto por células pigmentadas como no pigmentadas. Otro tanto sucedió con el Dye láser 590 nm a 8 μ s, que tampoco obtuvo rango selectivo. Por contra, los mejores resultados fueron para el Dye 588 nm a 1 μ s, y para el Nd:YAG 532 nm a 10 ns, que mostraron un rango selectivo de hasta 20 veces el umbral de irradiación; sin embargo, el Dye láser precisó de intensidades superiores a las del Nd:YAG. Por su peor absorción por parte de la melanina, el Nd:YAG de 1064 nm a 10 ns, a pesar de obtener un moderado rango selectivo, precisó de intensidades notablemente superiores a las de su homólogo de doble frecuencia, y se vio mucho más influido por la cantidad de melanina presente en el espécimen irradiado.

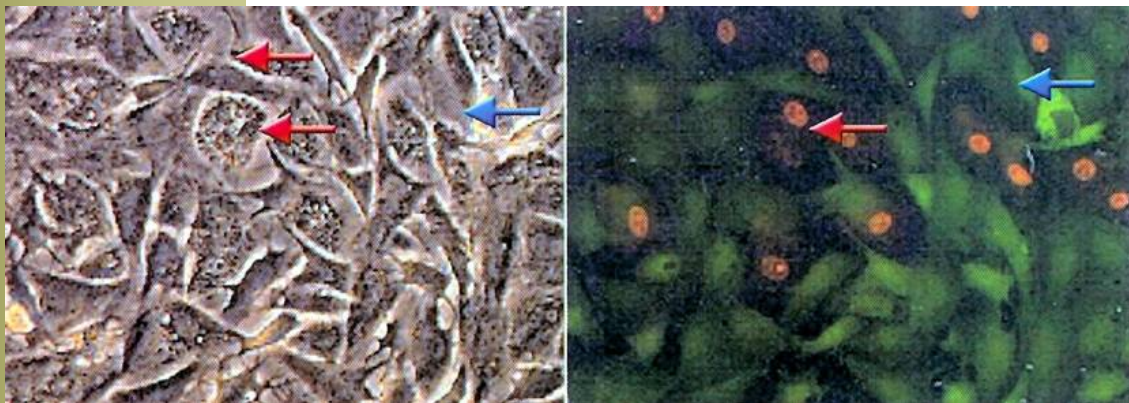


Fig. 12. Izquierda: Microscopia de contraste de fase, en la que no se pueden poner de manifiesto las diferencias de viabilidad entre células pigmentadas y no pigmentadas tras la irradiación con láser Nd:YAG 532 nm. Derecha: Las mismas células, tras ser teñidas con colorantes de viabilidad, muestran que las células dañadas corresponden a las células pigmentadas.

Al estudiar las células tratadas con Dye 588 nm a 1 μ s y con Nd:YAG 532 nm a 10 ns con microscopía de contraste de fase, no se apreciaron diferencias entre células dañadas y las sanas, pero la tinción viabilidad/citotoxicidad evidenció los cambios, apareciendo células pigmentadas teñidas de rojo, completamente rodeadas de células no pigmentadas con fluorescencia de membrana, demostrando la selectividad del procedimiento.

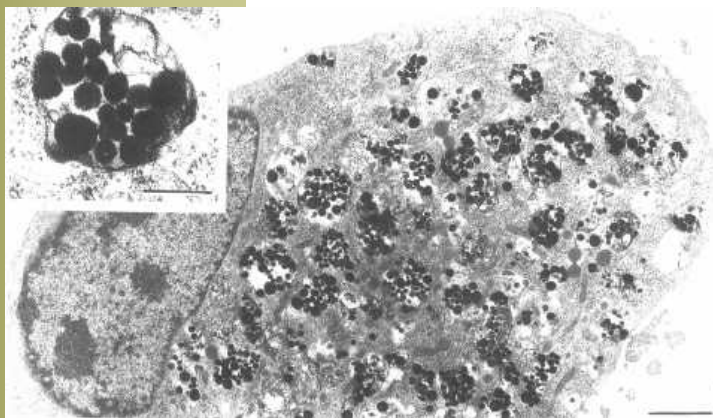


Fig. 13. Imagen de microscopia electrónica de una célula de MT bovina con inclusiones de pigmento en el interior de sus lisosomas, antes de ser irradiada.

Al estudiar las células irradiadas al microscopio electrónico, pudo comprobarse cómo el efecto de la radiación quedaba confinado en los fagolisosomas que contenían melanina, mientras que las organelas vecinas permanecían intactas (membrana nuclear, citoplasma, mitocondrias, etc), manteniéndose la arquitectura celular. Sin embargo, el daño producido en la célula, es lo suficientemente importante como para que, al cabo de

unas horas, la célula muera y se desprenda. Las alteraciones producidas por el láser Nd:YAG 532 nm fueron más selectivas desde el punto de vista de la microscopía electrónica.

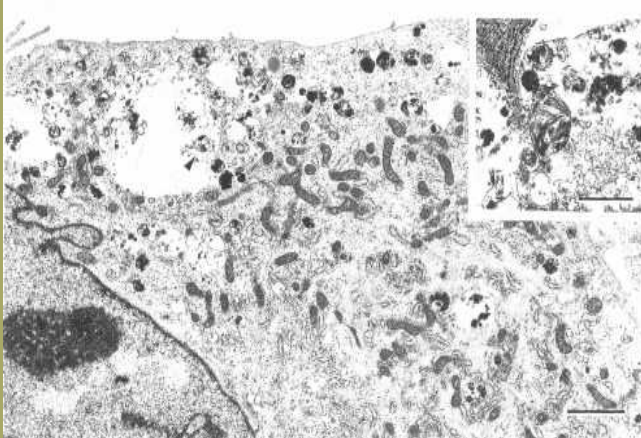


Fig. 14. Célula de MT bovina tras ser irradiada con láser Nd:YAG 532 nm, vista con microscopio electrónico. Obsérvese que el daño queda confinado en las áreas que ocupaban los lisosomas conteniendo la melanina, con respeto de las organelas citoplasmáticas circundantes. El pigmento se dispersa y sale al exterior de la célula. Esta muere horas más tarde como consecuencia de las alteraciones metabólicas que resultan de la absorción de la energía láser por los gránulos de pigmento. No hay evidencia de daño coagulativo.

Por todo ello, el sistema láser que obtuvo mejor rendimiento, con resultados óptimos en cuanto a rango selectivo e intensidad de irradiación, fue el Q-switched Nd:YAG de doble frecuencia 532 nm, 10 ns. Se comprobó además que el umbral de exposición radiante es altamente dependiente de la longitud de onda, como muestra la diferencia de comportamiento entre los dos sistemas Nd:YAG. Otra de las conclusiones es que a mayor número de cromóforos en la célula, menor umbral de exposición radiante, si bien, para el láser seleccionado, el rango de potencia es relativamente pequeño, lo cual supone una de sus ventajas, proporcionando una excelente tolerancia. Y finalmente, que **el tiempo de exposición para selectividad, ha de ser inferior a 1 μ s.**

NOTAS