

SISTEMA DE EXCITACION Y DETECCION DE FLUORESCENCIA

José A. Delgado Atencio, Suren Stolik Isakina, Sandra Fernández Yanes, Margarita Cunill Rodríguez, Arlene M. Pérez González y Lino E. Borroto Rivero,
Centro de Desarrollo de Equipos e Instrumentos Científicos (CEDEIC)

RESUMEN

En este trabajo se presenta un prototipo funcional de sistema de excitación y detección de fluorescencia desarrollado para la investigación de las propiedades fluorescentes de fármacos fotosensibilizadores utilizados para el diagnóstico de tumores. El uso de un LED azul de alto brillo como fuente de excitación y de fibras ópticas para la transmisión de la señal luminosa hasta el cabezal sensor hace que el sistema presentado sea sencillo y práctico. Se describe también una fuente de excitación que emplea una lámpara de arco de mercurio de 200 W y filtros ópticos para garantizar una composición espectral adecuada. El sistema de detección está compuesto por dos bloques fundamentales, un cabezal sensor de alta sensibilidad y una unidad de lectura y selección del modo de medición. El sistema por su diseño resulta versátil por lo que puede utilizarse para el estudio de otras sustancias fluorescentes no necesariamente pertenecientes a la investigación oncológica.

ABSTRACT

A functional prototype system of excitation and detection of fluorescence was developed in order to do research of fluorescent properties of pharmacological products used in tumors diagnosis. A blue high intensity LED is used as exciting source and optic fiber for the transmission of the light signal which taken together produce a simple and practical system. Other sources as a mercury 200 W lamp and optical filters are also employed. Detection system is made of two fundamental blocks, which are described. We think the system might be used to study other kind of fluorescent substances.

INTRODUCCION

La terapia fotodinámica es una técnica novedosa para el tratamiento de los tumores, que aprovecha la reacción fotoquímica inducida en un marcador fotosensibilizador al irradiarlo con la luz roja de densidad de potencia y longitud de onda específica [1, 2, 3, 4]. Los fármacos fotosensibilizadores utilizados tienen la propiedad de fluorescer cuando son excitados con luz violeta, esto unido a su retención selectiva por los tejidos neoplásicos brinda la posibilidad de diagnosticar lesiones premalignas mediante la fluorescencia inducida [5, 6]. El estudio de las propiedades fluorescentes de fármacos obtenidos nacionalmente, así como la necesidad de contar con una herramienta para la investigación de las propiedades fluorescentes de los tejidos neoplásicos motivó a que nuestro grupo de investigación desarrollara un prototipo funcional de sistema de excitación y detección de fluorescencia para realizar investigaciones preliminares en el campo de la oncología, especialmente en el diagnóstico de tumores por fluorescencia inducida.

DESARROLLO

El sistema de excitación-detección que se presenta ha sido diseñado por módulos que tienen

cierto grado de independencia en cuanto a su funcionalidad. Este sistema en esencia está constituido por las siguientes partes y aditamentos:

1. Fuente de excitación
2. Portamuestras
3. Sistema de detección y lectura
4. Filtros y fibras ópticas

A continuación se presenta una descripción general y se precisan las posibilidades de operación de cada una de estas partes:

1. La fuente de excitación:

Una de las dos variantes de fuente de excitación se muestra en la Figura 1 (a) donde la fuente de luz es una lámpara de arco de mercurio (HBO 200F) de 200 W de consumo eléctrico, que se coloca dentro de un mueble metálico con una salida para la radiación óptica. Este puerto óptico está diseñado para colocar una lente colimadora, un filtro óptico para la excitación y una segunda lente para enfocar la radiación sobre una fibra óptica. Esta lámpara se soporta en un mecanismo de posicionamiento cuyo accionamiento permite que la descarga de la lámpara de mercurio sea colineal con el eje óptico del sistema.

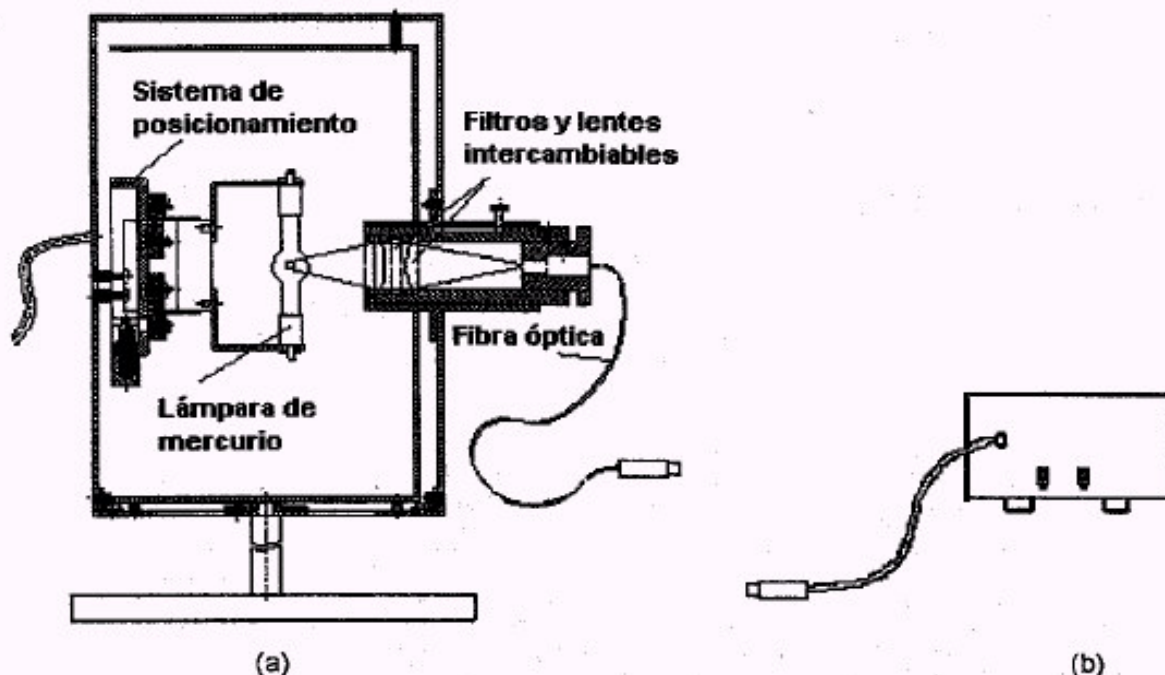


Figura 1. Fuentes para la excitación de fluorescencia.

(a) Lámpara de arco de mercurio.

(b) LED azul ultrabrillante.

El filtro óptico utilizado para la excitación es un filtro de color con una banda de transmisión centrada en 420 nm y un ancho de banda de 80 nm, la transmisión máxima es del 30 %.

La segunda variante de fuente de excitación se presenta en la Figura 1 (b) y consiste en un LED azul de alto brillo, alimentado por una fuente de corriente variable de 0-20 mA, con una longitud de onda de máxima emisión alrededor de 450 nm y una intensidad luminosa de 1 000 mCd a 20 mA de corriente de alimentación. La potencia radiante para esta corriente es de 4 mW. El LED se encuentra en el interior de un casquillo que lo protege y garantiza el acoplamiento mecánico con el portamuestras.

2. El portamuestras:

Es un mueble cerrado que impide la entrada de la luz del medio ambiente a su interior para que no se falsee la medición, como se muestra en la Figura 2. Está diseñado para realizar la detección de la fluorescencia a 90° con respecto a la dirección de excitación y definiendo ambas direcciones (excitación-detección) un plano horizontal. La radiación para la excitación penetra al portamuestras a través de un puerto de entrada que admite o bien una fibra óptica que trae la radiación excitatriz desde la fuente con lámpara de arco, como se observa en la Figura 1 (a), o el casquillo metálico que contiene al LED azul.

Para garantizar la repetibilidad de las mediciones se ha diseñado un sistema de posicionado para la

cubeta basado en el uso de una escuadra metálica contra la cual se presiona la cubeta mediante dos parejas de muelles mutuamente perpendiculares. Estos muelles contienen como elemento de contacto con la cubeta una esfera metálica.

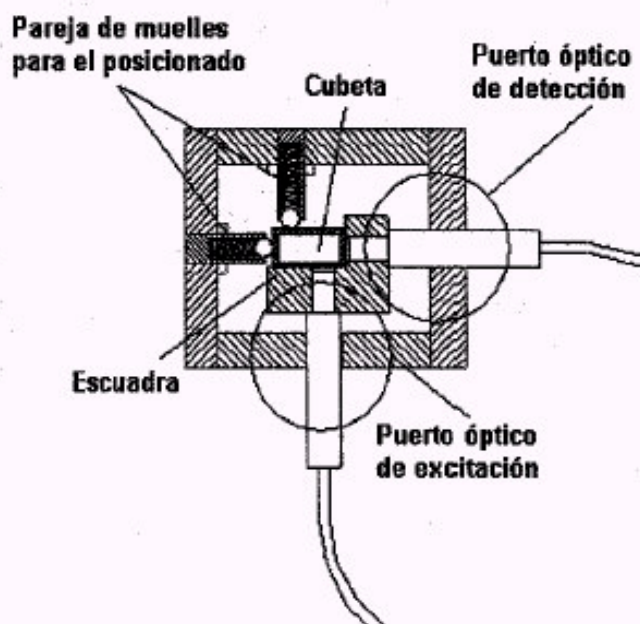


Figura 2. Vista superior del portamuestras, nótese que la detección se realiza a 90° de la dirección de excitación.

En el portamuestras existe el puerto de detección por donde se acopla una fibra óptica que lleva la señal de fluorescencia hasta el cabezal sensor.

Las dimensiones de la cubeta a emplear son las siguientes: $24 \times 11 \times 40 \text{ mm}^3$ siendo 40 mm la altura de la cubeta y 11 mm la longitud total en la dirección de la excitación, de esta longitud 5 mm corresponden al espesor del líquido y los restantes 6 mm a las caras de la cubeta.

3. Sistema de detección y lectura:

Este sistema está compuesto por dos partes fundamentales: el cabezal de detección de alta sensibilidad y la unidad de lectura.

El cabezal de alta sensibilidad está diseñado sobre la base de un sistema de detección con fotodiodo preamplificado en modo fotovoltáico, como se muestra en la Figura 3. La transimpedancia R_f de este circuito se puede variar en el intervalo de 10^3 a $10^9 \Omega$ por medio de un conmutador de posiciones. Todo el circuito de alta sensibilidad se encuentra contenido en un cabezal metálico cilíndrico que sirve de pantalla a las fuentes de ruido eléctrico y a las corrientes de aire. Además en este cabezal se pueden fijar filtros y fibras ópticas que garantizan la medición de la señal óptica deseada.

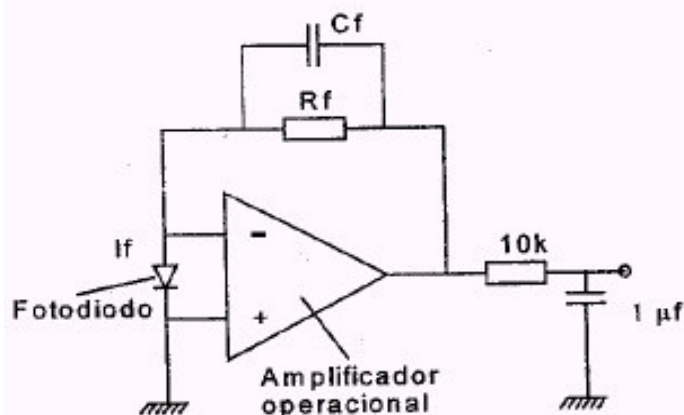


Figura 3. Esquema eléctrico básico del cabezal de alta sensibilidad.

La unidad de lectura muestra el valor de la señal eléctrica en un voltímetro digital de $3\frac{1}{2}$ dígitos con fondo de escala de 200 mV. Esta unidad contiene otro cabezal sensor para tomar una referencia ya sea de la fuente de excitación o de otra señal conveniente.

El flujo radiante umbral del sistema de detección está en el orden de 10^{-10} - 10^{-11} W.

4. Filtros y fibras ópticas:

El sistema de detección cuenta con un juego de filtros pasa altos definidos por las siguientes longitudes de onda de corte: 400, 450, 500, 600, 700 y 850 nm.

Las fibras ópticas que forman parte del sistema de excitación y detección de fluorescencia son de 2 tipos, una de ellas es de cuarzo con un núcleo de $1000 \mu\text{m}$ y cubierta de polímero (cuarzo-polímero) ésta preferiblemente se emplea para excitar cuando la fuente de luz es la lámpara de arco de mercurio. La otra fibra es plástica con un núcleo de 1 mm de diámetro, utilizada preferiblemente en el canal de detección.

CONCLUSIONES

- El prototipo funcional construido se puede emplear como herramienta de trabajo en la investigación oncológica.
- Cada módulo que conforma a este prototipo puede utilizarse de forma independiente para su aplicación en otras investigaciones o en laboratorios de óptica.
- Este primer prototipo sirve de base para el desarrollo de un fluorómetro de propósito general para las investigaciones en laboratorios y centros especializados en la aplicación de esta técnica

REFERENCIAS

1. PROFIO, A.E. (1984): "Laser excited Fluorescence of Hematoporphyrin Derivative for Diagnosis of cancer", *IEEE Journal of Quantum Electronic*, QE-20(12), December..
2. PROFIO, A.E. and D.R. DOIRON (1987): "Dose Measurements in Photodynamic Therapy of cancer", *Laser in Surgery and Medicine* 7, 1-5.
3. LAMS, S; J. HUNG and B. PALCIC (1990): "Detection of Lung Cancer by ratio fluorometry with and without photofrin II", *SPIE 1201, Optical Fibers in Medicine V*.
4. KATO, H. et al. (1990): "Photodynamic Diagnosis and Therapy in respiratory malignant tumors with and excimer dye Laser System", Presented at the symposium of the Spectroscopical Society of Japan, March.

6. MARX, B.R. (1999): "Endoscopic imaging detects cancer earlier." **Laser Focus World**, 35(2), 31-32.

7. DELGADO, J.A. (1996): "La fotodetección de alta sensibilidad en el diagnóstico de tumores por fluorescencia inducida"; Tesis de Maestría, Universidad de La Habana.