

Determinación experimental de la variabilidad intra-clase en tejido adiposo porcino ex-vivo mediante espectroscopía de reflectancia difusa

L. A. Arévalo-Díaz, F. Fanjul-Vélez, J. L. Arce-Diego

Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av de los Castros s/n, 39005 Santander, España

arcedj@unican.es, fanjulf@unican.es

Resumen

En este trabajo se ha utilizado la técnica de espectroscopía óptica de reflectancia difusa para el estudio de tejidos biológicos. En numerosos trabajos se ha visto que la técnica tiene gran potencial en la detección de anomalías en tejidos. En estos trabajos se capturan datos de tejido sano y tejido enfermo con el fin de encontrar un modelo donde se distingan ambas clases. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio acerca de la variabilidad intra-clase en tejidos biológicos. En este trabajo se ha puesto en marcha un sistema de espectroscopía óptica y se han capturado espectros de reflectancia difusa de tejido adiposo para diferentes especímenes de cerdo. Los espectros resultantes permiten observar las bandas de absorción de la hemoglobina, el agua y los lípidos. Mediante un análisis de Componentes Principales, se ha encontrado que existe una variabilidad inter-clase (entre muestras de distintos especímenes), además de una variabilidad intra-clase (entre muestras de un mismo espécimen).

1. Introducción

La espectroscopía de reflectancia difusa ha demostrado tener un gran potencial como técnica óptica no invasiva para el estudio de tejidos biológicos. Como ya se sabe, la luz que absorbe y esparce una muestra depende de sus propiedades ópticas (coeficiente de absorción μ_a y de scattering reducido μ_s'). Esto hace que, con el espectro de reflectancia de un tejido, se pueda hallar información acerca de la muestra en estudio [1].

En la literatura se pueden encontrar medidas in-vitro, ex-vivo e in-vivo de las propiedades ópticas de diferentes tipos de tejidos, tanto en seres humanos como en animales [2]. Numerosos estudios han demostrado la viabilidad de la técnica para determinar el estado de un tejido y proporcionar información sobre la morfología, funcionalidad o composición bioquímica de la muestra. Esta capacidad de extraer información, más la posibilidad de ser integrada en fibra, hace de la técnica una buena opción para la detección clínica de anomalías en tejidos biológicos [3-9].

En la mayoría de los trabajos mencionados anteriormente, se realizan estudios estadísticos que permiten comparar espectros de tejido sano con los de tejido enfermo. Un abordaje muy común es la descomposición de los datos en componentes principales [10]. Mediante esta transformación matemática, en el nuevo espacio se aprecian diferencias entre tejido sano y tejido enfermo,

observándose una variabilidad inter-clase, siendo una de las clases tejido normal y la otra tejido anormal. En la realización de estos estudios es necesario acceder a datos que provienen de diferentes sujetos para tener una muestra estadísticamente significativa. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se realiza un estudio del comportamiento intra-clase. En este trabajo se pretende investigar qué sucede dentro de las clases al realizar una descomposición en componentes principales, para el caso de los tejidos biológicos. En este caso se estudiará tejido adiposo porcino sano, con lo que cada clase será cada espécimen. Los datos que vienen de cada animal se extraerán de diferentes regiones anatómicas. Una buena capacidad discriminativa entre clases dependerá de si la variabilidad intra-clase es suficientemente menor que la variabilidad inter-clase, de ahí la importancia de este trabajo.

El artículo se estructura de la siguiente forma. En la sección 2 se describe el montaje experimental utilizado y el procedimiento de extracción de las muestras. En la sección 3 se describe la forma en que los datos son tratados junto con los resultados. Y finalmente se presentan las conclusiones.

2. Métodos experimentales y materiales

A continuación se describe el montaje experimental junto con la descripción del material biológico utilizado.

2.1. Tejidos biológicos

Las muestras biológicas proceden de porcinos de la raza *Large White*, los cuales son utilizados en procedimientos médicos orientados a la práctica y adiestramiento de médicos cirujanos en el Hospital virtual de Valdecilla (HvV) de Santander, Cantabria. Después de estos procedimientos, el cerdo se eutanasia y tras la muerte, se procede inmediatamente a la extracción de los tejidos. Los cerdos tienen una edad de 2-4 meses, y un peso de 20-25 kg. Se extraen dos muestras del tejido adiposo ex-vivo de cada espécimen. En total se evaluaron tres especímenes de cerdos. Después de la extracción por parte del especialista veterinario, las muestras se almacenan en soportes diseñados especialmente para acoplarse en el sistema de medida. Los tejidos se envuelven con gasas empapadas con cloruro de sodio (9mg/ml) y se almacenan en el refrigerador, hasta que las muestras son procesadas.

2.2. Montaje experimental

Se ha diseñado y puesto en marcha un montaje óptico en volumen para espectroscopía de reflectancia [11]. Este incluye: 1) una fuente de luz blanca QTH de 250W de Newport, la cual emite un espectro suave y continuo entre 200 y 2400 nm. 2) Un espectrómetro (StellarNet Inc. BLK-CXR-SR-50) con un rango de medida entre 220-1100nm, una resolución óptica de 0.5nm, y un detector CCD/PDA de 2048 pixeles con un tamaño de pixel de 14x200 μm . 3) Lentes y filtros que trabajen adecuadamente en el rango de longitudes de onda de interés y con diámetros de haces de más de una pulgada, además la óptica se escogió cuidadosamente para reducir aberraciones y permitir versatilidad en el montaje. Para el registro de los espectros se utiliza una fibra óptica de $\Phi 1\text{mm}$. En la Figura 1 se muestra un esquema del montaje experimental. La muestra, colocada en vertical, se ilumina con la fuente de luz blanca y se colecta la luz esparcida por el tejido con una lente. La observación se hace a 30°. Para la captura con el espectrómetro se ha usado un tiempo de integración de 50ms, se escanea un promedio de 10 señales y un filtrado con un boxcar=4. En la figura 1 se puede observar una fotografía de la muestra de tejido adiposo iluminada con el haz de luz blanca.

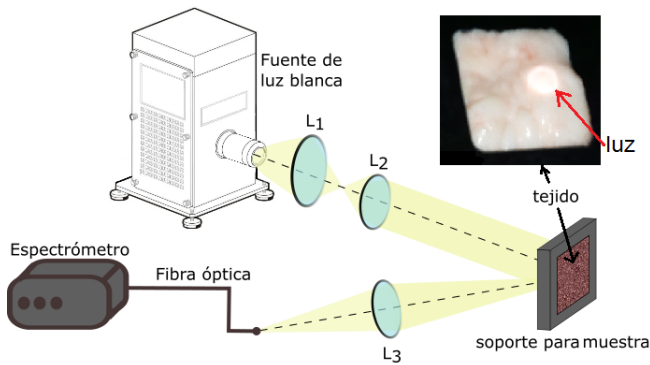


Figura 1. Montaje experimental para la espectroscopía óptica junto con una fotografía del tejido adiposo.

Para capturar los datos se seleccionan puntos sobre la muestra en una matriz 4x4 y se capturan 4 datos en cada punto. El tejido ocupa un área de 30x30mm², por lo tanto la separación de cada punto es de 6mm. El escaneo se realiza de forma manual mediante un tornillo micrométrico.

3. Resultados preliminares

3.1. Pre-tratamiento de los datos

El espectro de reflectancia de la muestra $R_m(\lambda)$ se encuentra a partir de la señal capturada $S_m(\lambda)$, el espectro de emisión de la fuente (capturada con un patrón blanco) $S_e(\lambda)$ y la señal de fondo $S_f(\lambda)$, de esta forma:

$$R_m(\lambda) = \frac{S_m(\lambda) - S_f(\lambda)}{S_e(\lambda) - S_f(\lambda)} \times 100\% \quad (1)$$

Antes de realizar el análisis de los datos, es necesario realizar un pre-tratamiento de los datos para remover ruido sistemático (debidas al instrumento de medida y a la muestra en sí). Para ello se remueven tendencias lineales

(detrend) y el ruido con un filtro de Savitzky-Golay. Antes de realizar alguna comparación, también es necesario normalizar los espectros haciendo que su media sea cero y su desviación típica 1.

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de algunos espectros medidos de una misma muestra antes y después del pre-tratamiento.

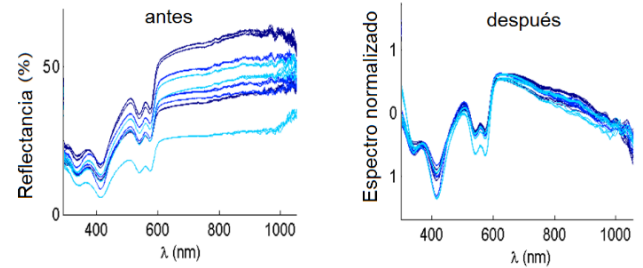


Figura 2. Espectros de una misma muestra antes y después del pre-tratamiento.

3.2. Espectro de reflectancia difusa para los tejidos biológicos

En los tejidos biológicos, la absorción es causada principalmente por la hemoglobina, las moléculas de agua o macromoléculas tales como proteínas y pigmentos. Mientras que la absorción en la región IR puede atribuirse principalmente a las moléculas de agua y algunos lípidos [12]. Tanto las proteínas como los pigmentos absorben principalmente en el espectro UV y el visible. Las proteínas, en particular, tienen un pico de absorción en aproximadamente 280 nm [13]. Uno de los agentes principales presentes en los tejidos es la hemoglobina. Las propiedades de absorción de la sangre las definen la absorción de las formas tanto oxi como desoxi. La hemoglobina (en estado desoxigenado) se caracteriza por dos bandas de absorción, con sus máximos situados en 425 y 555nm. En estado oxigenado, la hemoglobina tiene tres bandas de absorción, cuyos máximos se localizan en 415, 540 y 575nm. En el caso del tejido adiposo, en su espectro se observan bandas de absorción relacionadas con el agua (1210, 1400–1480 y 1900–1980 nm) y con los lípidos (1210, 1720–1760 y 2120–2140 nm) [14].

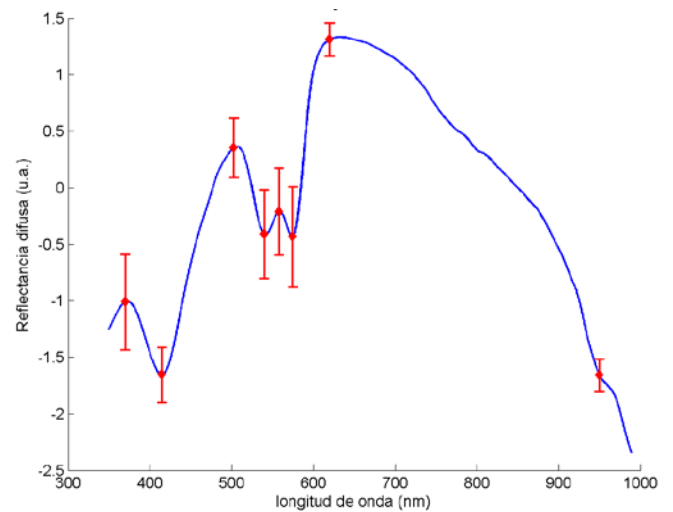


Figura 3. Espectro de reflectancia difusa para tejido adiposo porcino ex-vivo.

En la Figura 3 se muestra un ejemplo del espectro obtenido para el caso del tejido adiposo. La curva representada corresponde a un promedio de varios espectros capturados. Los puntos rojos han sido seleccionados ya que indican la absorción de la hemoglobina y del agua. Las líneas verticales rojas indican la varianza de los datos. Se observa que la señal disminuye con el aumento de la longitud de onda más allá de 650nm, comportamiento típico del coeficiente de scattering de los tejidos biológicos [15].

3.3. Reducción de las dimensiones del problema

Un algoritmo muy común para reducir las dimensiones de un problema es el análisis de componentes principales PCA (Principal Components Analysis). El análisis PCA transforma un número de variables posiblemente correlacionadas en un número de variables igual o menor, no correlacionadas (ortogonales) por medio de una proyección, el nuevo espacio se denomina el espacio de las componentes principales.

Cada espectro almacenado tiene 1750 datos, que equivalen a datos capturados en un rango de 225.5nm a 1100.5nm, cada 0.5nm. Por medio de la transformación PCA, se hace una reducción de 1750 dimensiones a 2 dimensiones. En la Figura 4 se muestra el resultado de aplicar el algoritmo a las observaciones medidas. Se ha representado en el eje x la primera componente principal (PC1) y en el eje y la segunda (PC2) de cada observación. Estas dos primeras componentes contienen el 84% de la variancia total de los datos.

En el gráfico de la Figura 4, cada color representa el espécimen de donde se extrajeron los espectros. En este nuevo espacio es posible observar una separación entre clases, existe un agrupamiento de los datos que provienen de un mismo espécimen. Los datos que vienen del cerdo 1, el cerdo 2 y el cerdo 3 se agrupan en cúmulos en el espacio, la región que le corresponde a cada animal está marcada con una elipse en la Figura 4.

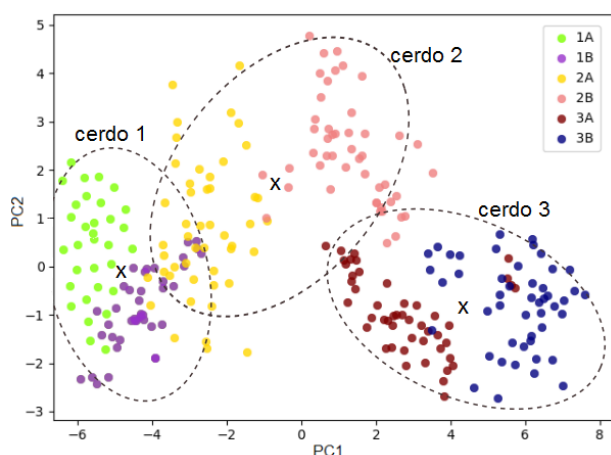


Figura 4. Primera y segunda Componente Principal de los espectros de reflectancia de diferentes muestras de tejido adiposo provenientes de distintos especímenes. Se observa agrupación de datos que vienen de distintos especímenes (1,2,3) y agrupación de datos que provienen de distintas regiones anatómicas (A,B) dentro de cada clase.

La elipse que encierra cada cúmulo se calcula a partir de la distancia de los puntos a la distribución a la que pertenecen, teniendo en cuenta las desviaciones típicas de la distribución [16]. Para cada espécimen, se calcula la distancia de cada punto a su centroide. La elipse corresponde a puntos del espacio que están a una misma distancia del centroide. La elipse contiene el tercer cuartil de la distribución de distancias de cada clase (75%). Esta separación de clases, reflejada en una mínima superposición de las elipses calculadas, indica que hay diferencias espectrales entre observaciones que provienen de diferentes especímenes (variabilidad inter-clase).

Por otro lado, en la Figura 4 también se observa que los datos de un mismo cerdo, pero provenientes de diferentes ubicaciones anatómicas (A y B), también se agrupan entre ellos. Lo que indica diferencias entre las observaciones de un mismo cerdo, pudiéndose concluir que existe una variabilidad dentro de las clases.

Estos interesantes resultados han demostrado que existe una variabilidad inter-clase (entre sujetos) e intra-clase (entre diferentes regiones anatómicas). Mientras la variabilidad intra-clase sea menor que la variabilidad inter-clase, es posible realizar una buena diferenciación entre clases.

4. Conclusiones

En este trabajo se puso en marcha un sistema de espectroscopía de reflectancia difusa para el estudio de tejidos biológicos. Las muestras provienen directamente de cerdos manipulados en el hospital virtual y que, después de su extracción, pasan a ser medidas con el sistema que se diseñó. Tras un pre-procesamiento de los datos se obtienen espectros de reflectancia difusa para tejido adiposo. Se encuentra que el espectro resultante está acorde con resultados obtenidos en trabajos reportados en la literatura. En el espectro se pueden encontrar picos correspondientes a las bandas de absorción de la hemoglobina, el agua y algunos lípidos. Se realiza un análisis de componentes principales (PCA) y se encuentra que existe una variabilidad entre las muestras (inter-clase). Más aún, se encuentra que también existe un agrupamiento de los datos que corresponden a diferentes muestras extraídas de un mismo animal (variabilidad intra-clase).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad de España “Nuevas fases activas en nano-óxidos de metales de transición y tierras raras estabilizadas a alta presión” (MAT2015-69508-P), cofinanciado con fondos FEDER, y por la Fundación San Cándido.

Referencias

- [1] Niemz MH. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Chap. 2. Springer Science & Business Media, 2013.

- [2] Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in medicine and biology*, vol 58, issue 11, 2013, pp R37.
- [3] Koenig F, Larne R, Enquist H, McGovern FJ, Schomacker KT, Kollias N, Deutsch TF. Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma. *Urology*, vol 51, issue 2, 1998, pp 342-345.
- [4] Zonios G, Perelman LT, Backman V, Manoharan R, Fitzmaurice M, Van Dam J, Feld MS. Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo. *Applied Optics*, vol 38, issue 31, 1999, pp 6628-6637.
- [5] Cerussi A, Shah N, Hsiang D, Durkin A, Butler J, Tromberg BJ. In vivo absorption, scattering, and physiologic properties of 58 malignant breast tumors determined by broadband diffuse optical spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, vol 11, issue 4, 2006, pp 044005-044005.
- [6] Bale G, Mitra S, Meek J, Robertson N, Tachtsidis I. A new broadband near-infrared spectroscopy system for in-vivo measurements of cerebral cytochrome-c-oxidase changes in neonatal brain injury. *Biomedical optics express*, vol 5, issue 10, 2014, pp 3450-3466.
- [7] Garcia-Uribe A, Kehtarnavaz N, Marquez G, Prieto V, Duvic M, Wang LV. Skin cancer detection by spectroscopic oblique-incidence reflectometry: classification and physiological origins. *Applied Optics*, vol 43, issue 13, 2004, pp 2643-2650.
- [8] Pifferi A, Torricelli A, Taroni P, Bassi A, Chikoidze E, Giambattistelli E, Cubeddu R. Optical biopsy of bone tissue: a step toward the diagnosis of bone pathologies. *Journal of biomedical optics*, vol 9, issue 3, 2004, pp 474-480.
- [9] Senapati AK, Radhakrishnan H, Liu H, Peng YB. Detection of degeneration in rat sciatic nerve by in vivo near infrared spectroscopy. *Brain research protocols*, vol 14, issue 2, 2005, pp 119-125.
- [10] Bishop CM. Pattern recognition and machine learning. Chap 12. Springer, 2006.
- [11] Vo-Dinh T. Biomedical photonics handbook: biomedical diagnostics. Chap. 6. CRC press, 2014.
- [12] Cao Q, Zhegalova NG, Wang ST, Akers WJ, Berezin MY. Multispectral imaging in the extended near-infrared window based on endogenous chromophores. *Journal of biomedical optics*, vol 18, issue 10, 2013, pp 101318-101318.
- [13] Boulnois JL. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science*, vol 1, issue 1, 1986, pp 47-66.
- [14] Zamora-Rojas E, Aernouts B, Garrido-Varo A, Pérez-Marín D, Guerrero-Ginel JE, Saeys W. Double integrating sphere measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol 19, 2013, pp 218-226.
- [15] Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol 38, issue 15, 2005, pp 2543-2555.
- [16] Goodpaster AM, Kennedy MA. Quantification and statistical significance analysis of group separation in