

DISCRIMINACIÓN DE PATOLOGÍAS TUMORALES EN TEJIDOS CANCERÍGENOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE IMAGEN

P.B. Garcia-Allende⁽¹⁾, O.M. Conde⁽¹⁾, V. Krishnaswamy⁽²⁾, B.W. Pogue⁽²⁾, P. Albendea⁽¹⁾, J.M. Lopez-Higuera⁽¹⁾.

garcia pb@unican.es, olga.conde@unican.es, venkat.krishnaswamy@dartmouth.edu, brian.w.pogue@dartmouth.edu, lopezhjm@unican.es.

⁽¹⁾ Grupo de Ingeniería Fotónica, Universidad de Cantabria, Avda. Los Castros S/N, 39005 Santander, España.

⁽²⁾ Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, NH 03755, USA.

Abstract- Multi-spectral scatter visualization of tissue ultra-structure *in situ* can provide a unique tool for guiding surgical tumor resection. The variations in scattering parameters, i.e. scattering power, scattering amplitude and average scattered intensity, across different tissue types has been analyzed. Since scatter changes are subtle, tissue sub-type identification requires multiparametric analysis of optical data to help in tumor delineation. The proposed methodology has been validated on tissue types observed across pancreatic tumor samples that were pathologically classified under three major groups (epithelium, fibrosis and necrosis) with their corresponding subtypes. This methodology combines a statistical pre-processing of the scattering parameters and an ensemble segmentation method. The latter merges the predictions of *k*-nearest neighbors (kNN) and Artificial Neural Network (ANN) algorithms for tissue type classification. The classification accuracy inside some predefined regions of interest was determined. Results show a strong correlation between the automated and expert-based classifications.

I. INTRODUCCIÓN

La detección de los cambios en la dispersión o esparcimiento de la luz asociados a los límites de un tumor puede permitir al cirujano decidir en tiempo real los márgenes para la resección completa del mismo. En [1] se diseñó un dispositivo de imagen confocal multiespectral capaz de tomar muestras del espectro de la dispersión elástica sobre el tejido de forma localizada. Sin embargo, las variaciones asociadas a cada patología eran muy sutiles, lo cual hace necesario el desarrollo de una herramienta automática de interpretación de las mismas de forma que el sistema pueda ser empleado en cirugías para la resección de tumores. En este trabajo se presenta una metodología que cuantifica de forma automática las heterogeneidades de los coeficientes de dispersión y establece una correlación con las correspondientes morfologías de tejido. La herramienta de discriminación propuesta consta de dos etapas. En primer lugar se realiza un preprocesado de datos para la generación de información adicional a partir de los parámetros de esparcimiento medidos. Para ello, se calculan para cada posición espacial la media, la desviación estándar y los momentos estadísticos de tercer y cuarto orden (*skewness* y *kurtosis*, respectivamente) de cada uno de los parámetros de

esparcimiento en una región de vecindad de cada píxel. En una segunda etapa, se combinan los resultados de clasificación proporcionados por un algoritmo basado en los *k*-vecinos más cercanos (kNN, *k Nearest Neighbors*) [2] y los diagnosticados por una red neuronal artificial (ANN, *Artificial Neural Networks*) [3] para la clasificación de las diferentes patologías tumorales. La viabilidad de ambas técnicas para la detección de las distintas patologías se había demostrado previamente [4,5] de forma individual. Las muestras de tejido tumoral analizadas en [1] fueron sometidas a un proceso histológico y analizadas por un patólogo que identificó diversas regiones de interés en ellas junto con los tipos de tejido asociados. Dentro de éstos se distinguieron tres grandes grupos: tejido epitelial, fibrosis y necrosis. Dentro del primero se encuentran a su vez células de bajo y alto índice de proliferación (*LPI*, *Low Proliferation Index* y *HPI*, *High Proliferation Index*) según el cociente de tamaños del núcleo y el citoplasma. En el grupo de fibrosis se distinguieron tres fases: inicial, intermedia y madura. Mediante la combinación de las dos técnicas propuestas, basadas en métodos de clasificación de diferente naturaleza, se aumenta considerablemente la seguridad en el diagnóstico del tipo de tejido ampliando considerablemente el rango de decisión frente a lo estimado por el patólogo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Montaje experimental y ajuste de parámetros

El sistema de imagen consta de un sistema espectroscópico confocal y una plataforma de soporte para el escaneado de la muestra. Los sistemas óptico y electromecánico se integraron mediante una interfaz LABVIEW. En la Figura 1 se muestra una fotografía y un esquema del montaje experimental. El sistema de iluminación consta de una fibra (F1) de 50 μm de diámetro acoplada a una fuente de luz blanca de tungsteno halógena. El extremo libre de la fibra está situado en el foco de una lente acromática (L1). El objetivo L2 se emplea para focalizar de nuevo la luz sobre la muestra. El sistema de iluminación se simuló con el software Zemax para asegurar que el tamaño

del área iluminada es inferior a la longitud de espaciamiento (típicamente 100 μm) en todo el rango de longitudes de onda de interés (de 510 a 785 nm). Para la detección se emplea el mismo objetivo L2 y los caminos de iluminación y detección e iluminación se separan mediante un divisor de haz 50/50. Mediante una tercera lente acromática (L3) los fotones detectados son focalizados en la cara anterior de una fibra de 100 μm . El tamaño del área de detección se controla mediante el diámetro de esta última fibra (F2) y el espectrómetro se calibra para operar en el rango de longitudes de onda mencionado, que comprende importantes picos de absorción debidos a la hemoglobina. La plataforma XY se emplea para el soporte y escaneado de la muestra y su inclinación, de aproximadamente 45° con respecto al eje óptico, evita la entrada de la reflexión especular en el camino de detección. En [1] se describen de forma más detallada tanto el sistema como los procedimientos de calibración del mismo.

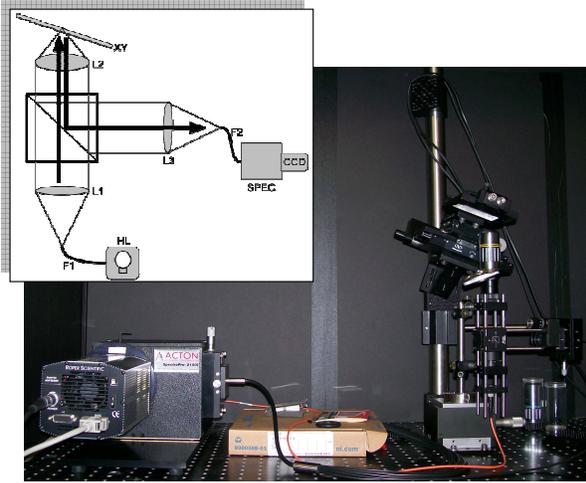


Fig. 1. Fotografía y diagrama de bloques del sistema de imagen.

La reflectancia medida se ajusta mediante la relación empírica (1) que tiene en cuenta la variación del espaciamiento en función de la longitud de onda y la atenuación exponencial debida a la absorción:

$$I_R = A\lambda^{-b} e^{(-k-c(d \cdot HbO_2(\lambda) + (1-d) \cdot Hb(\lambda)))} \quad (1)$$

donde A es la amplitud de scattering, b la potencia de scattering, c es proporcional a la concentración de sangre y d es la saturación de oxígeno. Esta relación empírica es válida para separaciones pequeñas fuente-detector y cuando los coeficientes de absorción y de scattering se encuentran entre los valores típicos de los tejidos [6,7]. Los espectros de extinción de la hemoglobina oxigenada, $HbO_2(\lambda)$, y desoxigenada, $Hb(\lambda)$, se obtuvieron de la base de datos del *Oregon Medical Laser Center* [8] y la absorción de otros cromóforos se considera despreciable en el rango de longitudes de onda de trabajo. La longitud de camino k se asume también constante para todas las longitudes de onda. La identificación de patologías se realiza a partir de la amplitud y potencia del espaciamiento al que se une un tercer parámetro, I_{avg} , obtenido integrando I_R para longitudes de onda mayores de 610 nm evitando así los picos de absorción de la hemoglobina.

B. Tumor de páncreas

En [1] se obtuvieron imágenes del espaciamiento de muestras de tumor pancreático. Para ello se inyectaron de forma subcutánea células humanas de tumor de páncreas i.e. células AsPC-1, en ratones. Los tumores se reseccionaron aproximadamente siete semanas después y se diseccionaron en porciones de aproximadamente 4-5 mm de espesor y se midió su espaciamiento. En un último proceso, y para tener elementos de validación, la sección superior de cada muestra fue sometida a evaluación histológica por el patólogo. Tal y como se especifica en [4], se analizaron cinco muestras de tumor pancreático.

C. Métodos de clasificación

Independientemente del tipo de clasificador empleado, cada píxel de las regiones de interés se considera como un vector en un espacio de 3 dimensiones dado por los tres parámetros de espaciamiento, A - b - I_{avg} , denominado espacio característico.

Los métodos de discriminación empleados son:

- kNN basado en la idea de que datos similares deben pertenecer a la misma clase o categoría. Por tanto, el primer paso para la clasificación de un píxel desconocido es buscar dentro del conjunto de datos de entrenamiento aquellas k posiciones espaciales cuyos parámetros ópticos son más similares al dado. Esta similitud se mide en función de la distancia Euclídea en el espacio característico:

$$D(p_1, p_2) = \sqrt{(A_1 - A_2)^2 + (b_1 - b_2)^2 + (I_{avg1} - I_{avg2})^2} \quad (2)$$

donde $p_1(A_1, b_1, I_{avg1})$ and $p_2(A_2, b_2, I_{avg2})$ son los píxeles que se están comparando. El píxel que se pretende clasificar se asignará a la clase más común (epitelio de bajo o alto índice de proliferación, necrosis, fibrosis inicial, fibrosis intermedia o fibrosis madura) entre los k vecinos más cercanos. kNN por tanto puede afrontar directamente problemas de clasificación multiclase mientras que otros clasificadores más evolucionados como las máquinas de vector soporte (*SVM, Support Vector Machines*) [9] requieren la combinación de varios clasificadores [10].

Puesto que como se ha mencionado anteriormente, kNN se basa en distancias Euclídeas calculadas en el espacio característico, los parámetros de espaciamiento se normalizan a media nula y varianza unidad (normalización estándar) de forma que todos tengan la misma importancia.

- ANN : en este caso la red neuronal constaba de dos capas ocultas (50 neuronas/capa) entre la capa de entrada y la de salida. Esta última contiene 6 neuronas correspondientes al número de patologías a distinguir [5]. El tipo de entrenamiento es *Backpropagation* y la función de transferencia de todas las neuronas es sigmoideal logarítmica.

Para la especificación de ambos métodos se empleó un proceso de entrenamiento y validación del tipo "leave-one-out" [4] y así evitar el condicionamiento del clasificador por los datos de entrenamiento. Para ello se empleó el conjunto

de regiones de interés sobre las muestras diagnosticadas por el patólogo (3360 píxeles).

En una primera aproximación se comprobó que la capacidad de segmentación de ambas metodologías en el espacio característico inicial de los parámetros de dispersión, $A-b-I_{avg}$, era reducida, de hecho en el caso de la red neuronal no se alcanzaba la convergencia al porcentaje de error objetivo del entrenamiento ($1e-5$). Estos resultados eran esperables puesto que se trata de un problema de discriminación de 6 clases en un espacio de tres dimensiones. Para mejorar la eficiencia se implementó un procedimiento de extracción de características [10]. De este modo se obtuvieron los cuatro primeros momentos estadísticos: media (\bar{p}), desviación estándar (σ_p), skewness (s_p) and kurtosis (K_p) de cada parámetro de dispersión p en una región de vecindad centrada en torno al píxel de interés [4]. Los estadísticos calculados se concatenaron con los parámetros iniciales para formar un espacio característico de 15 dimensiones. Esto incrementó la especificidad de ambas técnicas de discriminación de manera notable.

La fusión de resultados está basada en el concepto de acumulación, que es un procedimiento que consiste en la combinación de las predicciones de un conjunto de clasificadores [11]. La estabilidad de las dos metodologías desarrolladas previamente sólo se había podido demostrar en el interior de las regiones de interés definidas por el patólogo y aunque es razonable pensar que su comportamiento será válido también en el exterior de éstas no era posible demostrarlo. En esta nueva propuesta, la estabilidad del diagnóstico se cuantifica mediante la comparación de los resultados de ambas, ya que se ha llegado a ellos de forma independiente. En los píxeles donde los resultados de las dos metodologías coinciden, ésta es la patología concluida por el método propuesto. Si los resultados son diferentes se considera un píxel *enmascarado*, al igual que aquellos píxeles en los que no se pudieron medir los parámetros de esparcimiento de forma fiable.

III. SEGMENTACIÓN DE REGIONES TUMORALES

En la Figura 2 se representan todos los píxeles de las regiones de interés en el espacio $A-b-I_{avg}$. Solamente se puede observar cierto grado de agrupación de acuerdo a la clase en el caso de la necrosis. No existe por tanto una tendencia clara de los parámetros de esparcimiento en función del sub-tipo de tumor y de ahí surge la necesidad de desarrollar una herramienta automática para la discriminación de los mismos.

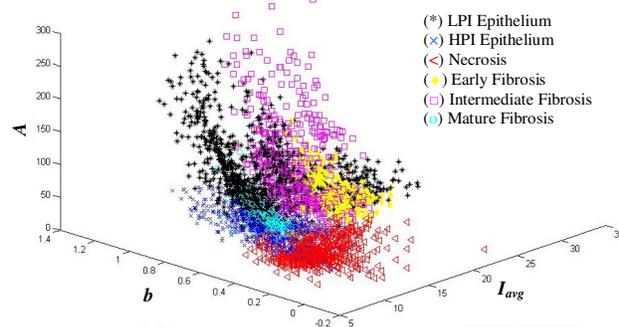


Fig. 2. Diagrama de dispersión de los píxeles en las distintas regiones tumorales.

Para mejorar esto se introdujo en la técnica el preprocesado de datos descrito en el Apartado 2.C. Para determinar el tamaño de la región de vecindad, tamaño de ventana, a emplear en el cálculo de los estadísticos se obtuvieron los histogramas de anchura y longitud de las regiones de interés que se muestran en la Figura 3. De este modo se pretende asegurar que el tamaño de ventana empleado es el mayor posible siempre y cuando la mayoría de los píxeles interiores a la misma pertenezcan al mismo tipo de tumor. Puesto que las dimensiones raramente son mayores de 15 píxeles, el tamaño de ventana empleado fue de 12 x 12 píxeles para que los estadísticos contuvieran información relevante.

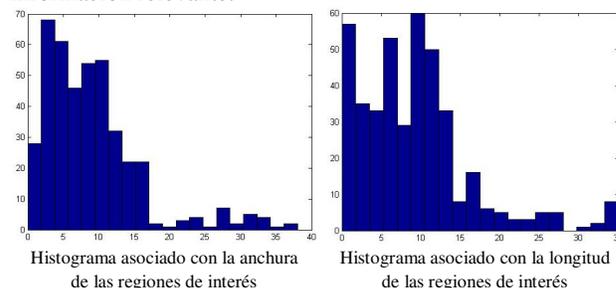


Fig. 3. Histogramas de los tamaños de las regiones de interés.

La segmentación de una de las muestras de tumor analizadas mediante kNN, ANN y el método agregado, el espacio característico de 15 dimensiones, se muestra en la Figura 4.

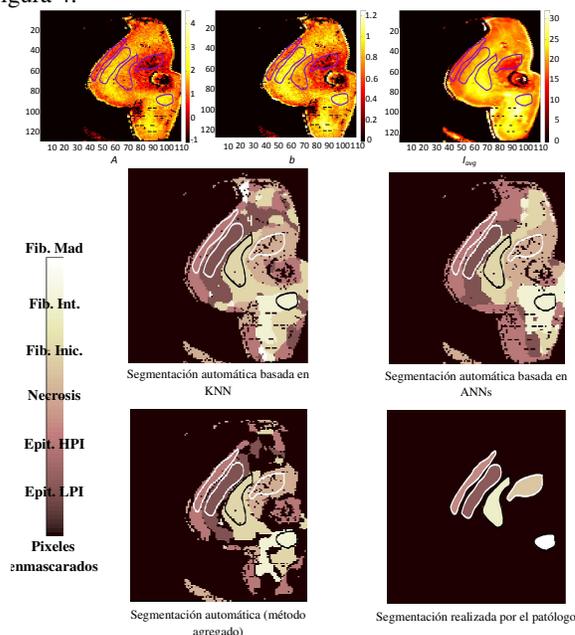


Fig. 4. Segmentación de tumores mediante metodologías automáticas independientes y agregada y comparación cualitativa con la realizada por el patólogo.

En el estudio de viabilidad de la técnica se han analizado cinco muestras tumorales, evaluando la herramienta de identificación automática sobre un total de 18509 píxeles. En los resultados obtenidos se observa una correlación perfecta entre las segmentaciones automáticas y la realizada por el patólogo para las regiones de interés (0% de error de clasificación en los 3360 píxeles anteriormente

mencionados). Queda por tanto demostrada la viabilidad de la técnica para la delimitación del tumor y su estado de evolución local. La limitación de las técnicas independientes viene dada porque no es posible asegurar de forma fiable los resultados de clasificación fuera de dichas regiones.

Sin embargo, la propuesta de combinar los resultados de kNN y ANN (método agregado) refuerza la seguridad en la identificación del tejido fuera de las regiones de interés (diagnosticadas por el patólogo) al provenir de dos métodos totalmente independientes cuya validez es total en las zonas diagnosticadas por el patólogo. Así, en la Tabla 1 se pueden observar las tasas de predicción mejoradas por el diagnóstico agregado respecto al diagnóstico patológico para las 5 muestras analizadas.

Muestra	Nº Píxeles totales	Diagnóstico patólogo	Diagnóstico automático
1	5476	9.843% (539)	55.1315 % (3019)
2	5893	17.5632% (1035)	64.619% (3808)
3	8450	15.1124% (1277)	64.0237% (5410)
4	6900	2.5072% (173)	45.1449% (3115)
5	5966	10.6772% (637)	52.9165% (3157)
MEDIA		11.1406%	56.3671%

Tabla 1. Indicadores de efectividad de la herramienta propuesta frente al diagnóstico realizado por el patólogo.

IV. CONCLUSIONES

Se ha diseñado una herramienta automática capaz de establecer una correlación entre distintos tipos de tumores y sus cambios correspondientes en los parámetros de esparcimiento. Para ello se combinan las predicciones de dos algoritmos independientes desarrollados previamente y basados en kNN y ANNs respectivamente. En el espacio vectorial de tres dimensiones dado por los tres parámetros de esparcimiento solamente se logró una alta similitud entre la segmentación automática y la identificación de regiones de interés realizada por un patólogo sólo en el caso de kNN. Por ello, y para mejorar la capacidad de la técnica para la delineación del tumor, se incluyó en el procesado un método de cálculo estadístico para la generación de información adicional. De este modo se estimaron la media, desviación estándar y los momentos de tercer y cuarto orden, de cada parámetro de esparcimiento en una región de vecindad centrada en cada píxel de interés. Esto, unido a la combinación de los resultados de clasificación de ambos métodos, aumentó en más del triple el número de píxeles diagnosticados por el patólogo. La identificación en tiempo real del tipo de tejido proporciona un método adicional de contraste quirúrgico que ayudará en la resección eficaz del tumor.

AGRADECIMIENTOS

P.B. Garcia-Allende agradece la financiación obtenida del proyecto TEC2007-67987-C02-01 que le permitió realizar una estancia de investigación de tres meses de

duración en el *Thayer School of Engineering* en el *Dartmouth College*.

REFERENCIAS

- [1] V. Krishnaswamy, P.J. Hoopes, K. Samkoe, J.A. O'Hara, T. Hasan and B.W. Pogue, "Quantitative imaging of scattering changes associated with epithelial proliferation, necrosis and fibrosis in tumors using microsampling reflectance spectroscopy", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14 (1), pp. 014004, 2009.
- [2] K. Fukunaga, *Introduction to statistical pattern recognition*, Academic Press, San Diego, 2nd Edition, 1990.
- [3] C.H. Chen, *Fuzzy logic and neural network handbook*, McGraw Hill, New York, 1996.
- [4] P.B. Garcia-Allende, V. Krishnaswamy, K.S. Samkoe, P.J. Hoopes, B.W. Pogue, O.M. Conde, "Automated identification of tumor microscopic morphology, based upon macroscopically measured scatter signatures", *Journal of Biomedical Optics*, *In press*.
- [5] P.B. Garcia-Allende, V. Krishnaswamy, K.S. Samkoe, P.J. Hoopes, B.W. Pogue, O.M. Conde, J.M. Lopez-Higuera, "Automated interpretation of scatter signatures aimed at tissue morphology identification", *Proc. ECBO*, *In press*.
- [6] A. Amelink and H.J. Sterenborg, "Measurement of the local optical properties of turbid media by different path-length spectroscopy", *Applied Optics*, vol. 43, pp. 3048-54, 2004.
- [7] A. Amelink, H.J. Sterenborg, M.P. Bard and S.A. Burgers, "In vivo measurement of the local optical properties of tissue by use of differential path-length spectroscopy", *Optics Letters*, vol. 29, pp. 1087-9, 2004.
- [8] S.A. Prahl, "Oregon Medical Laser Center website," <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/>, 2007.
- [9] V. Vapnik, *The nature of statistical learning theory*, Springer, New York, 1995.
- [10] A. Oliver, J. Freixenet R. Martí, J. Pont, E. Pérez, E.R.E. Denton and R. Zwigelaar, "A novel breast tissue density classification methodology", *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, vol. 12 (1), pp. 55-65, 2008.
- [11] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites and R. Salzer, "Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy", *Journal of Biophotonics*, vol. 2 (1-2), pp. 13-28, 2009.