

# Discriminación Histológica mediante Propiedades Ópticas de Fase de Muestras Tisulares de Colon

J. L. Ganoza-Quintana, F. Fanjul-Vélez, J. L. Arce-Diego

Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros 46, 39005 Santander (Cantabria), España

[fanjul@unican.es](mailto:fanjul@unican.es), [arcedj@unican.es](mailto:arcedj@unican.es)

## Resumen

*La biopsia convencional es el principal estándar del diagnóstico histológico. La histología digital incluye automatización y diagnóstico mejorado, digitaliza imágenes microscópicas de muestras histológicas y analiza parámetros similares. El presente enfoque propone el uso novedoso del contraste de fase en la histología digital clínica para mejorar el diagnóstico. El uso de cortes de tejido fresco sin etiquetas evita los dispositivos de procesamiento y reduce el tiempo de procesamiento. Los parámetros de contraste de fase que se implementan y calculan son: la escala externa, la dimensión fractal, el factor de anisotropía de esparcimiento, el coeficiente de esparcimiento y la varianza del índice de refracción. Se emplean imágenes de muestras sanas y tumorales de colon. Se han utilizado un total de 84 imágenes con aumentos de 10x, 20x y 40x. La importancia de la discriminación entre tejidos sanos y tumorales se evalúa estadísticamente con ANOVA (valor  $p < 0,005$ ). El análisis se realiza para diferentes aumentos. Se muestra una dependencia del tipo de parámetro y del aumento de la imagen. El p-valor de los parámetros más significativos está por debajo de  $10^{-5}$ . Las muestras de los tejidos de colon presentan un conjunto de parámetros de contraste de fase significativos. En concreto la dimensión fractal a 10x es significativa para este tipo de tejido bajo análisis. Estos resultados son prometedores para el uso del contraste de fase avanzado en la praxis clínica de histología digital.*

## 1. Introducción

La histopatología es el principal estándar para el diagnóstico [1]. Los métodos actuales se basan en la observación microscópica directa de cortes de tejido teñidos por parte del patólogo. La biopsia convencional está especialmente indicada para la discriminación de tejidos tumorales, incluso en estadios precoces. El procedimiento presenta varias limitaciones, que incluyen dispositivos para el procesamiento de tejidos, retrasos en el diagnóstico causados por el cribado manual o errores provocados por el sesgo del patólogo. La histología digital contribuye a la automatización del procedimiento y a la mejora del diagnóstico mediante parámetros más objetivos. La histología digital se implementa mediante la digitalización de imágenes microscópicas de intensidad de muestras de biopsias convencionales. Las imágenes sin etiquetas podrían mejorar aún más el análisis histológico digital. Eliminaría los dispositivos de procesamiento y reduciría el tiempo de procesamiento. Uno de los problemas es que los tejidos biológicos no proporcionan suficiente contraste intrínseco para distinguir las

estructuras de interés y se necesita la tinción. Los tejidos biológicos son intrínsecamente turbios y son medios de bajo contraste [2]. Este hecho complica la observación de estructuras internas sin cortes físicos.

En este trabajo, se propone un enfoque novedoso que consiste en explotar la variación del índice de refracción de los tejidos biológicos para el diagnóstico manteniendo una resolución muy alta. Se propone emplear cortes de tejido fresco sin etiquetas e imágenes de contraste de fase para el análisis de muestras biológicas. Este enfoque permite, en primer lugar, eliminar los artefactos que pueden aparecer en las etapas de fijación y tinción de los procedimientos de biopsia convencionales. Esos procedimientos se pueden evitar debido a la variación intrínseca del índice de refracción que explota el contraste de fase. También reduce el tiempo de procesamiento de la muestra. Las imágenes de contraste de fase proporcionan características tisulares novedosas que son particularmente relevantes en los cambios morfoestructurales, que son típicos en los tejidos tumorales, [3].

Este trabajo comienza con la descripción del modelo teórico que da lugar a la definición de los parámetros de contraste de fase bajo estudio. Posteriormente se describe el procedimiento experimental de toma de muestras e imágenes. A continuación, se obtienen los parámetros identificados y se analizan estadísticamente para comprobar su potencialidad discriminadora. Por último se discuten los resultados y se extraen conclusiones.

## 2. Modelo teórico

La microscopía de contraste de fase (PCM) presenta ventajas sobre la microscopía convencional. La microscopía de contraste de fase fue desarrollada por Zernike en la década de 1930. Permite obtener imágenes no invasivas y sin etiquetas de células vivas.

El estudio de los modelos de la distribución del índice de refracción comenzó con los modelos de los medios continuos atmosféricos y oceánicos y luego se extrapoló al modelo de medio continuo de los tejidos biológicos. La distribución del índice de refracción en un medio turbulento general requiere una descripción estadística del haz que se propaga. En este caso estamos ante muestras biológicas turbias, por lo que no se espera variación temporal. En consecuencia, el análisis de los parámetros de

contraste de fase debe basarse en la teoría de los procesos aleatorios [4].

De la distribución espacial del índice de refracción, las características estadísticas más relevantes son los dos primeros momentos: el valor medio

$$n_0(\vec{r}) = \langle n(\vec{r}) \rangle_M \quad (1)$$

Y su función de covarianza,

$$B_n(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \langle [n(\vec{r}_1) - n_0(\vec{r}_1)][n(\vec{r}_2) - n_0(\vec{r}_2)] \rangle_M \quad (2)$$

En un campo que se propaga a través de un medio de esparcimiento débil, la relación de dispersión asociada se puede expresar como,

$$\langle k^2 \rangle = n_0^2 \beta_0^2 \left( 1 + \frac{\sigma_n^2}{n_0^2} \right) \quad (3)$$

Donde  $\langle k^2 \rangle$  es el momento de segundo orden del vector de onda,  $\langle k^2 \rangle = \langle k_x^2 \rangle + \langle k_y^2 \rangle + \langle k_z^2 \rangle$ , con paréntesis angulares que indican el promedio del conjunto,  $n_0$  es el promedio del índice de refracción,  $\beta_0$  es el número de onda en el vacío,  $\beta_0 = \omega/c$ , y  $\sigma_n^2$  es la variación espacial del índice de refracción. La variación del índice de refracción de una muestra transparente se puede calcular a partir de la imagen de contraste de fase medida como [5],

$$\sigma_n^2 = \frac{1}{\beta_0^2} \langle |\nabla\phi|^2 \rangle \quad (4)$$

La ecuación (4) implica que la variación del índice de refracción se puede extraer de la intensidad media del gradiente de las imágenes de contraste de fase.

Otro parámetro de contraste de fase que se puede estimar es el coeficiente de esparcimiento ( $\mu_s$ ). El coeficiente de esparcimiento se puede calcular utilizando el teorema de fase de esparcimiento [6],

$$\mu_s = \frac{\langle \Delta\phi^2(r) \rangle_r}{L} \quad (5)$$

Donde  $\langle \Delta\phi^2(r) \rangle$  indica la variación espacial de la fase y  $L$  es el grosor de la muestra de tejido.

Además, considerando el carácter intrínsecamente esparcador de los tejidos biológicos, también se puede estimar el factor de anisotropía de esparcimiento. La estimación también hace uso del teorema de fase de esparcimiento y puede expresarse como,

$$g = 1 - \frac{1}{2k_0^2} \frac{\langle |\nabla[\phi(r)]|^2 \rangle_r}{\langle \Delta\phi^2(r) \rangle_r^2} \quad (6)$$

donde  $k_0$  es el vector de onda incidente y  $\nabla[\phi(r)]$  es el gradiente de fase.

La turbulencia óptica suele explicarse por la presencia de irregularidades en el índice de refracción, los llamados “remolinos turbulentos”. Aparecen debido a fluctuaciones en varias propiedades físicas de la materia, como la temperatura, la presión y la concentración no homogénea de especies, y es de aplicación habitual en modelos atmosféricos o marinos. Las posibilidades de mezcla de

diferentes partes de la muestra por factores externos o internos, como el crecimiento celular o la transferencia de fluidos en tejidos biológicos, provocan transferencia de energía entre remolinos de diferentes tamaños. El mayor tamaño posible de un remolino se define como la escala exterior  $L_0$  de turbulencia. Los remolinos más grandes se descomponen en otros más pequeños hasta que su tamaño alcanza el límite inferior y la energía se disipa. Para estudiar estas características en muestras histológicas, el espectro de inhomogeneidades del índice se ajusta a la ecuación,

$$\Phi(\kappa) = \frac{4\pi\sigma_n^2 L_0^2 (m-1)}{(1+\kappa^2 L_0^2)^m} \quad (7)$$

que tiene la forma del espectro de Von Karman, con excepción del exponente  $m$ , que puede asumir valores distintos a  $4/3$ . En este caso,  $m$  es aproximadamente igual a la mitad de la pendiente medida en el rango de escala de ley de potencia [7]. Su magnitud está relacionada con la dimensión fractal de una superficie bidimensional,  $d_f = 4 - m$ .

Se ha demostrado que la distribución espacial de los principales componentes de los tejidos biológicos generales presenta autosimilitud. Esto hace posible el uso potencial del análisis fractal también en estas estructuras. El objetivo es tratar de identificar regularidades estadísticas espaciales que puedan ser descritas por leyes de potencia. En particular, la dimensión fractal define las características de estabilidad de una imagen, con respecto a las transformaciones de escala. La dimensión fractal de una imagen se puede estimar mediante varias técnicas: conteo de cajas; correlación; sandbox; o incluso el espectro de Fourier. El método de conteo de cajas consiste en una cuadrícula con cajas de tamaño  $\varepsilon$  superpuestas a una imagen. El número de casillas que contienen cualquier parte de la figura se registra como  $N(\varepsilon)$ . El procedimiento se repite para diferentes tamaños de  $\varepsilon$ , y la dimensión fractal  $d_f$  se calcula como,

$$d_f = -\frac{\log[N(\varepsilon)]}{\log(\varepsilon)} \quad (8)$$

La dimensión fractal  $d_f$  generalmente se calcula a partir del valor negativo de la pendiente de la regresión lineal de  $\log[N(\varepsilon)]$  en  $\log(\varepsilon)$ ,

$$\log[N(\varepsilon)] = -d_f \log(\varepsilon) \quad (9)$$

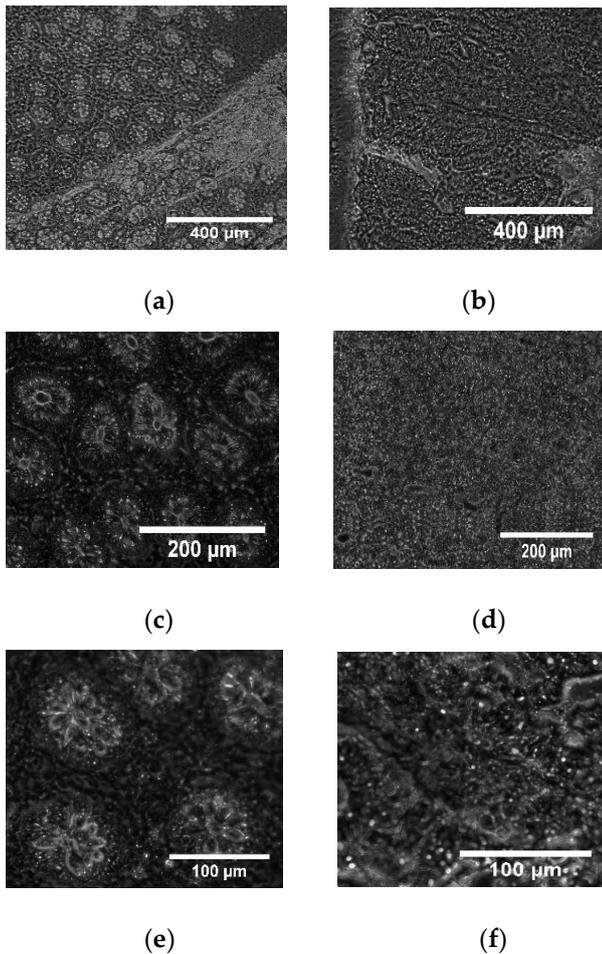
### 3. Materiales y métodos

Se empleó una configuración de microscopía de contraste de fase. Las muestras se colocaron en un escenario motorizado para el barrido espacial automático. El contraste de fase se implementó mediante un anillo de fase externo, combinado con varios objetivos de contraste de fase con aumentos de 10x, 20x y 40x (Nikon 10x Plan Fluor 0.30NA Ph1 DLL, 20x SPlan Fluor ELWD 0.45 NA ph1 ADM y 40x SPlan Fluor ELWD 0.60 NA ph2 ADM). Las imágenes se grabaron con una cámara CCD (Orca-R2,

Hamamatsu) y se almacenaron en formato de escala de grises de 12 bits [8].

Cada muestra histológica se visualiza mediante la configuración de microscopía de contraste de fase descrita anteriormente. Las imágenes se obtienen con aumentos de 10x (866x660  $\mu\text{m}$ ; tamaño de píxel 0,64  $\mu\text{m}$ ), 20x (433x330  $\mu\text{m}$ ; tamaño de píxel 0,3225  $\mu\text{m}$ ) y 40x (219x167  $\mu\text{m}$ ; tamaño de píxel 0,1632  $\mu\text{m}$ ). Se presta especial atención a la saturación de píxeles y al campo de visión. Se adquirieron un total de 84 imágenes.

Se emplearon muestras frescas de tejidos sanos y tumorales del biobanco de tejidos biológicos del Hospital Marqués de Valdecilla. Particularmente las muestras biológicas procedían de colon. Las muestras fueron congeladas y cortadas por microtomo, con un espesor menor a 6  $\mu\text{m}$ . No se aplicó ningún procedimiento de fijación o tinción a las muestras, ya que estos procesos podrían alterar las propiedades del tejido, en particular las propiedades del índice de refracción. Las muestras se recogieron sobre portaobjetos de vidrio de microscopía tratados para su medición. Las muestras se conservaron a 4°C durante dos horas antes de la medición por microscopía de contraste de fase. En la Figura 1 se presentan ejemplos de imágenes de tejido de colon sano y tumoral a 10x, 20x y 40x.

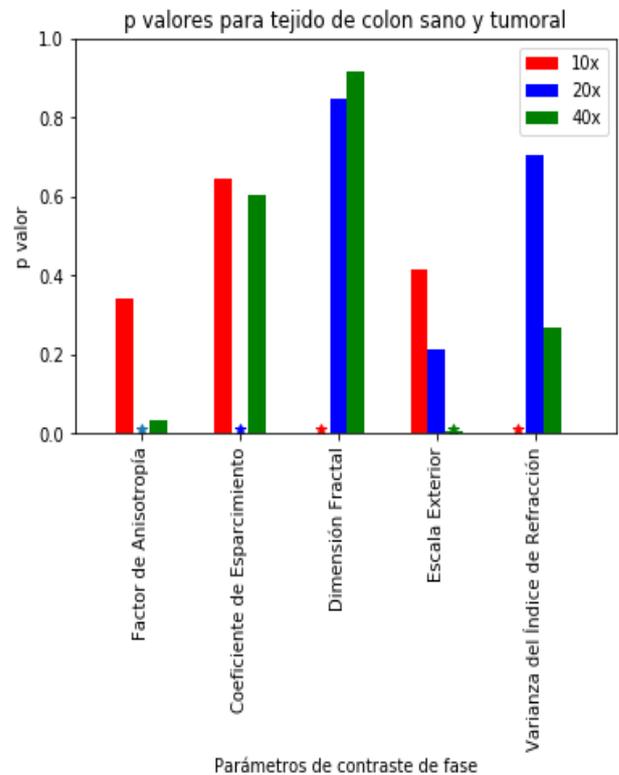


**Figura 1.** Imagen histológica de tejido de colon sano (a) y tumoral (b) con aumento de 10x; imagen histológica de tejido de colon sano (c) y tumoral (d) con aumento de 20x; imagen histológica de tejido de colon sano (e) y tumoral (f) con aumento de 40x.

#### 4. Obtención y análisis estadístico de parámetros ópticos de fase

A partir de las imágenes de contraste de fase obtenidas, se lleva a cabo una implementación del cálculo de los parámetros de contraste de fase identificados anteriormente, ya que estos parámetros influyen en el modelado matemático de la propagación óptica en los tejidos biológicos, [4]. Se han usado 42 imágenes de tejido de colon sano y 42 imágenes de tejido de colon tumoral. Particularmente, se lleva a cabo el cálculo del factor de anisotropía de esparcimiento, el coeficiente de esparcimiento, la dimensión fractal, la escala exterior y la varianza del índice de refracción. Se realiza el cálculo mediante una implementación propia para cada una de las imágenes obtenidas, y se separan los resultados en dos grupos, correspondientes a las muestras sanas y patológicas.

Se necesita un análisis más profundo para estudiar la relevancia estadística de los parámetros y su consiguiente potencialidad diagnóstica. Como estamos tratando de analizar la importancia de los posibles valores promedio de los parámetros, se realiza un análisis estadístico ANOVA. Estos análisis se realizan para tejidos sanos y tumorales en cada aumento, para los diferentes parámetros de contraste de fase obtenidos. La Figura 2 y la Tabla 1 muestran los resultados de los p-valores del análisis ANOVA para muestras de tejido de colon a diferentes aumentos. Como la prueba estadística verifica la hipótesis de medias iguales de los parámetros, habrá diferencias significativas para p-valores pequeños.



**Figura 2.** Resultados de p-valores del análisis ANOVA para parámetros de contraste de fase al comparar muestras de colon sano y tumoral, para diferentes aumentos. Los valores mostrados con un \* son valores inferiores a 0,009.

Parámetro de contraste	10x	20x	40x
FA	0.3401	0.0027	0.0349
CE	0.6446	0.0022	0.6036
DF	5.4414e-04	0.8466	0.9181
EE	0.4176	0.2155	0.0086
VIR	6.6435e-04	0.7047	0.2696

**Tabla 1.** Resultados de p-valores del análisis ANOVA para parámetros de los siguientes parámetros de contraste: Factor de Anisotropía (FA), Coeficiente de Esparcimiento (CE), Dimensión Fractal (DF), Escala Exterior (EE) y Varianza del Índice de Refracción (VIR), en muestras de colon sano y tumoral a diferentes magnificaciones.

## 5. Resultados y discusión

Los resultados mostrados en las secciones anteriores permiten estimar la potencialidad de los nuevos parámetros de contraste de fase propuestos para el diagnóstico de tejidos. La principal diferencia entre el análisis histológico convencional, incluida la histología digital, se basa en el hecho de que se recopila y emplea la información de fase de la señal óptica. Este hecho permite el uso de cortes de tejido fresco, que se pueden obtener más rápidamente, ya que no requieren procesamiento adicional, al contrario de las muestras fijas convencionales. Cada una de las imágenes, correspondientes a colon, ya sea sano o tumoral, y con diferentes aumentos a 10x, 20x y 40x, se procesó para calcular los parámetros de contraste de fase propuestos: factor de anisotropía de esparcimiento, coeficiente de esparcimiento, dimensión fractal, escala exterior y varianza del índice de refracción. Se observan unas tendencias que indican que la validez de los parámetros parece depender del factor de magnificación de las imágenes. Se ha realizado un análisis estadístico utilizando ANOVA de los parámetros de contraste en los diferentes tejidos a diferentes magnificaciones. Se debe prestar atención a los p-valores bajos. Estos valores indican que los grupos sanos y tumorales son estadísticamente significativos, en la medida expresada por el p-valor. Se establece un criterio de un p valor inferior a 0,005 para ser considerado estadísticamente significativo. Por ejemplo, en el caso de las muestras de colon, los parámetros de contraste de fase significativos, según la Figura 2, serían el factor de anisotropía de esparcimiento a 20x, el coeficiente de esparcimiento a 20x, la dimensión fractal a 10x, la escala exterior a 40x y la varianza del índice de refracción a 10x. Los resultados más significativos son para la dimensión fractal a 10x y la variación del índice de refracción a 10x. Las variaciones con respecto al aumento tienen que ver con la diferencia estructural del tejido en relación con el factor de magnificación. Estos resultados muestran una aplicabilidad prometedora de los parámetros de contraste de fase en histología digital en muestras de tejido fresco. En particular, para las muestras de tejido bajo análisis, existe una coincidencia significativa en varios parámetros con un aumento de 10x. Aun así, la aplicación

clínica de estos parámetros para un conjunto general de muestras biológicas probablemente requeriría la consideración de aumentos y parámetros combinados en un algoritmo de clasificación sofisticado. El hecho de que las muestras sean frescas podría ser, por un lado, una ventaja, ya que se elimina el procesamiento de las muestras y el procedimiento resulta más rápido, pero por otro lado dificultaría la conservación, que solo podría hacerse por congelación. También, se tendría como futura investigación, estudiar como los cambios morfoestructurales de los tejidos tumorales de colon en las diferentes magnificaciones, afectan a los parámetros de contraste. Los resultados de este trabajo muestran la potencialidad de los parámetros de contraste de fase para la histología digital en tejido de colon.

## Agradecimientos

Este Trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Cribado diagnóstico de microorganismos mediante microscopía avanzada e inteligencia artificial en patologías humana” (PID2021-127691OB-I00), del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado con fondos FEDER.

## Referencias

- [1] Tortora G. J., Derrickson B. H. *Principles of Anatomy and Physiology*; 15th ed.; Wiley, 2018.
- [2] Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*; Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015; ISBN 978-1-62841-516-2.
- [3] Wang Z, Tangella K, Balla A, Popescu G. Tissue refractive index as marker of disease. *J Biomed Opt.* 2011 Nov;16(11):116017. doi: 10.1117/1.3656732. PMID: 22112122; PMCID: PMC3223513.
- [4] Chen X, Korotkova O. Optical beam propagation in soft anisotropic biological tissues. *OSA Continuum Vol. 1, Issue 3*, pp. 1055-1067 (2018)
- [5] Shan M., Kandel M. E., Popescu G., Refractive index variance of cells and tissues measured by quantitative phase imaging. *Optics Express* 25, 1573-1581 (2017).
- [6] Wang, Z., Ding, H., Popescu, G. Scattering-Phase Theorem. *Opt. Lett.* 2011, 36, 1215–1217, doi:10.1364/OL.36.001215.
- [7] Schmitt J. M., Kumar, G., Turbulent nature of refractive-index variations in biological tissue, OSA Publishing, *Optics Letters*, Vol. 21, Issue 16, pp. 1310-1312 (1996).
- [8] Ganoza-Quintana, J.L., Fanjul-Vélez, F., Arce-Diego, J.L. Digital Histology by Phase Imaging Specific Biomarkers for Human Tumoral Tissues Discrimination. *Appl. Sci.* 2021, 11, 6142. <https://doi.org/10.3390/app11136142>.