

# Discriminación Histológica mediante Espectroscopia Óptica de Onda Parcial de Muestras Tisulares de Cerebro

J.L. Ganoza-Quintana<sup>1</sup>, J.L. Arce-Diego<sup>1</sup>, F. Fanjul-Vélez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros 46, 39005 Santander (Cantabria), España

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

## Resumen

*Las técnicas de imagen ópticas existentes ofrecen herramientas para visualizar la estructura celular a microescala; sin embargo, su capacidad de sensibilidad a nanoescala está restringida por el límite de difracción. El análisis de la teoría del transporte de luz mesoscópica de los espectros de ondas parciales que se propagan dentro de un medio débilmente desordenado, como las células biológicas [esto es, la espectroscopia de onda parcial (PWS, Partial Wave Spectroscopy)] cuantifica las fluctuaciones del índice de refracción en escalas de longitud subdifraccionales. En este sentido, PWS permite detectar estos cambios nanoestructurales midiendo un parámetro estadístico llamado intensidad de desorden ( $L_d$ ). PWS utiliza una combinación de un filtro sintonizable y una cámara para adquirir los espectros de retroesparcimiento de cada píxel de la imagen, o de manera más compacta, un espectrómetro en fibra. En este trabajo se estudia y se evalúa la posibilidad de obtener una medida cuantitativa del desorden utilizando el espectro de la información espacial promediada. En lugar de utilizar información espacial y medir rangos espectrales secuencialmente, medimos la señal retroesparcida recogida por una fibra óptica mediante un espectrógrafo. Se aplicaron y evaluaron varios algoritmos de clasificación basados en inteligencia artificial. Se observó que para el tejido de cerebro con magnificaciones de 1X, 4X y 10X con el clasificador de árbol de decisiones se obtienen errores de resubstitución y de correlación cruzada muy bajos. Estos resultados muestran el potencial de proporcionar un diagnóstico significativo automático sin etiquetas de muestras histológicas frescas con el parámetro de desorden obtenido mediante PWS.*

## 1. Introducción

La espectroscopia de esparcimiento elástico se utiliza habitualmente para estudiar la morfología del tejido. Sin embargo, la sensibilidad de una señal de esparcimiento de la luz a las fluctuaciones del índice de refracción se reduce significativamente cuando el tamaño de las estructuras de esparcimiento cae por debajo de la longitud de onda. Recientemente, ha habido un gran interés en comprender los sistemas biológicos a nanoescala, lo que requiere la medición de fluctuaciones del índice de refracción por debajo de la longitud de onda. Según la teoría del transporte de luz mesoscópico, para un objeto ligeramente desordenado y con esparcimiento débil, es posible sondear fluctuaciones del índice de refracción de cualquier escala de longitud, incluidas aquellas muy por debajo de la longitud de onda, si se analiza una señal generada por la interferencia múltiple de ondas que se propagan unidimensionalmente (1D), reflejadas por las fluctuaciones

del índice de refracción dentro del objeto [1]. PWS permite detectar estos cambios nanoestructurales midiendo un parámetro estadístico llamado intensidad de desorden ( $L_d$ ). Este trabajo está dividido en las siguientes secciones: en la sección 2 se presenta el marco teórico de PWS. En la sección 3 se muestra el método de medición empleado y se detallan los materiales utilizados. En la sección 4 se obtienen los resultados de la investigación. Finalmente, en la sección 5 se discuten las conclusiones.

## 2. Espectroscopia de onda parcial

Se utiliza la técnica de espectroscopia de onda parcial (PWS, *Partial Wave Spectroscopy*) para medir las fluctuaciones espectrales en los espectros de retroesparcimiento con el fin de obtener el parámetro estadístico denominado intensidad de desorden ( $L_d$ ) [1,2]. PWS se basa en la idea de que el espectro de retroesparcimiento de un medio débilmente desordenado contiene fluctuaciones espectrales que pueden usarse para cuantificar la intensidad de desorden en función de las fluctuaciones del índice de refracción dentro de la célula,  $n$ . En una ubicación dada dentro de la célula,  $n$  es proporcional a la densidad local de macromoléculas con un incremento de su índice de refracción,  $\Delta n$ , prácticamente independiente de la composición química. Por tanto, las variaciones espaciales de la densidad macromolecular se pueden medir una vez que se conocen las fluctuaciones de  $n$ , suponiendo que estas fluctuaciones son aleatorias y dentro de una distancia de correlación  $l_c$ .

El espectro de retroesparcimiento  $I(\lambda; x, y)$  (para  $\lambda=390-750$  nm, con una resolución espectral  $\sim 3$  nm, muestreo espectral  $\sim 0,25$  nm; habitualmente sólo se analiza la señal de  $\lambda_1=450$  nm a  $\lambda_2=600$  nm debido a la baja iluminación y eficacia de transmisión del instrumento) se registra para cada píxel de celda  $(x, y)$ . Todos los espectros obtenidos de cada píxel celular son normalizados por los espectros de la luz incidente utilizando la reflexión especular. Para cada  $(x, y)$ ,  $I(\lambda) (\equiv I(\lambda; x, y))$  se procesa adicionalmente para eliminar el ruido espectral de alta frecuencia utilizando un filtro de Butterworth paso bajo de sexto orden con una frecuencia de corte normalizada de 0,08, y las variaciones en el espectro de la lámpara utilizando un polinomio de orden bajo  $I_p(\lambda)$  ajustado a  $I(\lambda)$ . La frecuencia de corte normalizada (frecuencia de corte/frecuencia de muestreo) se elige de tal manera que elimine todas las oscilaciones por debajo de la resolución espectral del espectrómetro. El

espectro resultante  $R(\lambda) = I(\lambda) - I_p(\lambda)$  se conoce como la parte fluctuante del coeficiente de reflexión. Es importante darse cuenta de que, a diferencia de los experimentos tradicionales de esparcimiento de la luz, donde una señal de esparcimiento está formada por todas las ondas que se propagan dentro de una partícula de esparcimiento e interfieren en el campo lejano, el espectro de retroesparcimiento analizado en PWS está formado por un subconjunto de ondas, en particular las ondas parciales 1D. Entonces,  $R(\lambda)$  se relaciona con las propiedades del objeto: espesor  $L$ , índice de refracción promedio  $n_0$ , o la varianza y la longitud de correlación de las fluctuaciones del índice de refracción ( $\langle \Delta n^2 \rangle$  y  $l_c$ ). En el régimen donde la aproximación de canales independientes 1D es válida,  $R(k)$  (donde  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda) se puede caracterizar usando la teoría del transporte de luz mesoscópica 1D. En consecuencia, el promedio rms de  $R(k)$  se puede escribir como [1],

$$\langle R \rangle \equiv \frac{L}{\xi} \quad (1)$$

Donde  $\xi^{-1}$  es el coeficiente de esparcimiento de un canal 1D,

$$\xi^{-1} \cong \frac{2k^2 L_d}{n_0^2} = \frac{2k^2 \langle \Delta n^2 \rangle l_c}{n_0^2} \quad (2)$$

Mediante la función de autocorrelación,  $\langle C(\Delta k) \rangle$

$$\langle C(\Delta k) \rangle = \frac{\langle R(k)R(k+\Delta k) \rangle}{\langle R(k)R(k) \rangle} \quad (3)$$

$\langle C(\Delta k) \rangle$  se calcula para todo el espectro con una longitud de onda central  $\lambda_{mean} = 550$  nm para cada píxel de celda. Por tanto, conociendo las cantidades obtenidas experimentalmente  $\langle R \rangle$  y  $C(\Delta k)$  para un píxel de celda dado  $(x, y)$  y  $n_0$  (se supone que es  $\sim 1.38$ ), se puede calcular  $L_d$ ,

$$L_d = -\beta \frac{n_0^2}{2k^2} \langle R \rangle \frac{(\Delta k)^2}{\ln \langle C(\Delta k) \rangle} \quad (4)$$

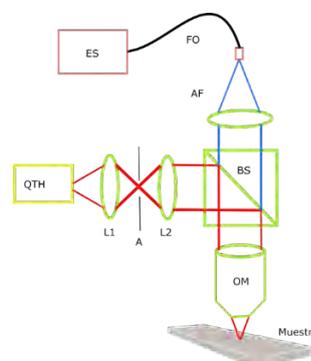
Donde  $\beta$  es una constante de calibración determinada experimentalmente y  $(\Delta k)^2 / \ln \langle C(\Delta k) \rangle$  se obtiene ajustando una pendiente lineal a  $\ln \langle C(\Delta k) \rangle$  frente a  $(\Delta k)^2$ .

### 3. Materiales y métodos

En primer lugar se mide la señal retroesparcida recogida por una fibra óptica por medio de un espectrómetro. Se evalúa la posibilidad de utilizar una configuración basada en un espectrómetro para calcular el parámetro  $L_d$  directamente a partir de la señal de retroesparcimiento recogida por una fibra óptica. Se implementa haciendo uso de un divisor de haz conectado a la salida del microscopio. La fibra óptica se utiliza para dirigir la luz de retroesparcimiento, recogida por un colimador de fibra. El esquema del montaje aparece en la Figura 1.

Para aplicar la teoría PWS, la reflectancia media utilizada para extraer el parámetro  $L_d$  se calculó para un solo valor de intensidad media para cada longitud de onda en lugar de calcularlo para cada píxel. Por tanto, se ha denominado a este parámetro de desorden como  $\bar{L}_d$ , que es un parámetro de desorden de un solo valor que representa la intensidad

de desorden media de la muestra. Aunque no es posible construir un mapa 2D, se obtiene un parámetro que representa el desorden medio de la muestra. Para extraer este parámetro, se aplicaron las ecuaciones desarrolladas anteriormente. Esta información cualitativa, proporcional al tamaño y densidad de la arquitectura macromolecular, permitió la separación de diferentes muestras de tejido y diferentes áreas de un mismo tejido.



**Figura 1.** Esquema del sistema PWS: QTH: lámpara de cuarzo-tungsteno-halógeno; L1, L2: lentes de colimación; A: apertura; OM: objetivo de microscopio; BS: divisor de haz; AF: acoplador en fibra óptica; FO: fibra óptica; ES: espectrómetro.

Esta técnica hace uso de una fibra óptica con el fin de guiar la luz retroesparcida de una muestra a un espectrómetro para así analizar todo el espectro y proporciona un valor promediado espacialmente proporcional al campo de visión actual desordenado. Esta configuración hace posible adquirir el espectro de retroesparcimiento en una cámara CCD y en un espectrómetro, a través de una fibra óptica, [2].

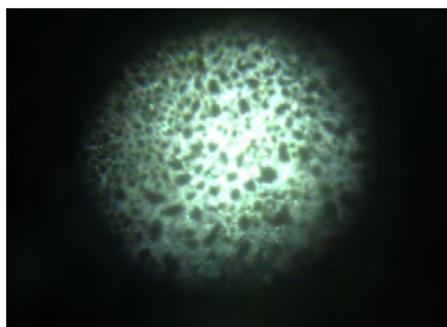
Se emplearon muestras frescas de tejidos sanos y tumorales del biobanco de tejidos biológicos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Particularmente las muestras biológicas procedían de cerebro. Las muestras fueron congeladas y cortadas por microtomo, con un espesor menor a 6  $\mu\text{m}$ . 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 [3].

En la Figura 2 se observa una imagen digital de un tejido al que posteriormente se aplica la espectroscopia óptica de onda parcial.

### 4. Resultados

Se han empleado varios algoritmos de clasificación de inteligencia artificial para realizar la discriminación histológica de muestras tisulares de cerebro [4]. Los algoritmos de clasificación empleados fueron: Análisis discriminante lineal (LDA) y cuadrático (QDA), normal Naïve Bayes (NBn), kernel Naïve Bayes (kNB), k vecinos

más próximos (kNN), máquina de vectores de soporte (SVM) y árbol de decisión (DT).



**Figura 2.** Imagen digital de un tejido al que se aplica la espectroscopia óptica de onda parcial.

En la Tabla 1 se muestran las tasas de errores de resubstitución de diferentes clasificadores de tejido de cerebro sano y tumoral a diferentes magnificaciones.

Algoritmo	Magnificación	Falso Positivo	Falso Negativo
LDA	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
QDA	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
NBn	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
AD	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.0833	0.0833
	10X	0.1250	0.0000
NBk	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
KNN	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.1667	0.0417
	10X	0.2083	0.0000
SVM	1X	0.3333	0.0000
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.3333	0.0000

**Tabla 1.** Tasas de errores de resubstitución de diferentes clasificadores de tejido de cerebro sano y tumoral a diferentes magnificaciones.

En la Tabla 2 se muestran las tasas de errores de correlación cruzada de diferentes clasificadores de tejido de cerebro sano y tumoral a diferentes magnificaciones.

Algoritmo	Magnificación	Falso Positivo	Falso Negativo
LDA	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
QDA	1X	0.0000	0.0833
	4X	0.2917	0.0833
	10X	0.1667	0.1250
NBn	1X	0.0417	0.0417
	4X	0.3333	0.0417
	10X	0.2083	0.1667
AD	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.3333
NBk	1X	0.0833	0.0417
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.2083	0.0000
KNN	1X	0.0000	0.0417
	4X	0.2083	0.2083
	10X	0.2500	0.0000
SVM	1X	0.3333	0.0000
	4X	0.3333	0.0000
	10X	0.3333	0.0000

**Tabla 2.** Tasas de errores de correlación cruzada de diferentes clasificadores de tejido de cerebro sano y tumoral a diferentes magnificaciones.

Se observa que para el error de resubstitución, en la magnificación de 4X, se obtienen las tasas de falsos positivos y falsos negativos más bajas para los algoritmos de clasificación del árbol de decisión y de los k vecinos más próximos. La tasa de falsos positivos y falsos negativos más baja en la magnificación 10X se obtiene para el algoritmo de clasificación del árbol de decisión.

Se observa que para el error de correlación cruzada las tasas más bajas de falsos positivos y falsos negativos se obtienen en la magnificación de 1X.

Se observa que para todos los algoritmos de clasificación excepto SVM para una magnificación de 1X, tienen una tasa de falsos positivos muy pequeña de errores de resubstitución y de correlación cruzada, por lo que tendrán una especificidad alta, por tanto, menos probabilidades de

dar resultados positivos falsos en muestras de tejido de cerebro que no son tumorales.

Se observa que para todos los algoritmos de clasificación para las magnificaciones de 1X, 4X y 10X, tienen unas tasas de falsos negativos muy pequeñas de errores de resubstitución y de correlación cruzada, por lo que tendrán una sensibilidad alta, por tanto, menos probabilidades de perder muestras de tejido de cerebro que son tumorales.

Por tanto, se observa que una relación de alta especificidad y sensibilidad para el parámetro de intensidad de desorden del PWS se tendría para los algoritmos de clasificación de LDA, AD y kNN a una magnificación de 1X, teniendo en cuenta los errores de resubstitución y de correlación cruzada, por tanto, un alto rendimiento de estos algoritmos de clasificación en la discriminación histológica de muestras de tejidos de cerebro sano y tumoral.

## 5. Conclusiones

Se han obtenido muestras tisulares de tejido sano y tumoral de cerebro de un biobanco. Se ha utilizado la técnica PWS mediante fibra óptica para obtener el parámetro de desorden ( $L_d$ ) a las magnificaciones de 1X, 4X y 10X. Se aplicaron y evaluaron varios algoritmos de clasificación basados en inteligencia artificial. Se obtuvieron para algunos algoritmos de clasificación errores de resubstitución y de correlación cruzada muy bajos. Se ha observado que para los algoritmos de clasificación LDA, AD y kNN en 1X, se obtiene una relación de alta especificidad y sensibilidad, lo cual aumenta el rendimiento de discriminación histológica de tejido cerebral sano y tumoral. Esto brinda una alta expectativa de extender esta técnica que tiene en cuenta la intensidad de desorden en PWS, a muestras de tejido de otros tipos de órganos y realizar la discriminación histológica de tejido sano y tumoral en esas muestras de tejido de otros tipos de órganos. Estos resultados muestran el potencial de

proporcionar un diagnóstico significativo automático sin etiquetas de muestras histológicas frescas con el parámetro de desorden obtenido mediante PWS.

## Agradecimientos

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

## Referencias

- [1] Subramanian H, Pradhan P, Liu Y, Capoglu IR, Rogers JD, Roy HK, Brand RE, Backman V. Partial-wave microscopic spectroscopy detects subwavelength refractive index fluctuations: an application to cancer diagnosis. *Opt Lett*. 2009 Feb 15;34(4):518-20. doi: 10.1364/ol.34.000518. PMID: 19373360; PMCID: PMC2701738.
- [2] Fernández R, Marcos-Vidal A, Gallego S, Beléndez A, Desco M, Ripoll J. Qualitative disorder measurements from backscattering spectra through an optical fiber. *Biomed Opt Express*. 2020 Oct 1;11(10):6038-6048. doi: 10.1364/BOE.396013. PMID: 33150004; PMCID: PMC7587252.
- [3] Ganoza-Quintana JL, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Digital Histology by Phase Imaging Specific Biomarkers for Human Tumoral Tissues Discrimination. *Applied Sciences*. 2021; 11(13):6142. <https://doi.org/10.3390/app11136142>.
- [4] Ganoza-Quintana JL, Arce-Diego JL, Fanjul-Vélez F. Digital Histopathological Discrimination of Label-Free Tumoral Tissues by Artificial Intelligence Phase-Imaging Microscopy. *Sensors*. 2022; 22(23):9295. <https://doi.org/10.3390/s22239295>.