

Biopsia óptica. Descripción general y medidas preliminares por espectroscopía óptica de autofluorescencia

Optical Biopsy. General description and preliminary measures by autofluorescence optical spectroscopy

Agustina Corti ^{a,*} y Mario Garavaglia ^{a,b}

^a Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
49 y 115 – (1900) La Plata - Argentina

^b Centro de Investigaciones Ópticas CIOp (CCT-CONICET La Plata y CIC)
Camino Centenario y 506 – (1897) Gonnet - La Plata - Argentina

* agustinacorti@gmail.com

Recibido: 27/02/15; aceptado: 10/07/15

Usualmente llamamos “biopsia” a un procedimiento médico invasivo mediante el cual se toma una muestra de tejido y se remite al laboratorio de patología para su análisis con fines diagnósticos. A diferencia de ésta, una “biopsia óptica” es un procedimiento no invasivo de diagnóstico, en el que se realiza un análisis del tejido con un sistema óptico mediante técnicas láser, infrarrojo, fluorescencia, espectroscopías, microscopías, entre otras. Es decir, no se extrae una muestra del tejido del organismo. Al tejido a analizar se accede a través de la superficie del cuerpo, (incluido el análisis de la propia piel), o por vía endoscópica a la superficie de la mucosa de cualquier cavidad. Sus principales ventajas respecto de la biopsia convencional se centran en evitar tanto la posibilidad de diseminación de células malignas cuanto los retardos propios de la biopsia convencional. Esto es primordial en los casos que el diagnóstico rápido de malignidad permite un tratamiento inmediato, ya que esta técnica realiza *in-situ* el análisis de los cambios bioquímicos de los tejidos de pacientes. No obstante se requiere un exhaustivo trabajo de investigación para correlacionar los resultados de la biopsia convencional con los de la biopsia óptica antes de implementar un servicio que sólo atienda a los pacientes por biopsias ópticas. En el presente trabajo se describe la técnica de Espectroscopía Óptica de Fluorescencia y los resultados de algunos estudios preliminares de biopsias ópticas realizadas mediante ésta, (en particular la autofluorescencia), comparando la fluorescencia natural del tejido sano y del tejido patológico, de manera de contribuir al diagnóstico médico.

Palabras clave: biopsia, autofluorescencia, espectroscopía, fluorómetro

The invasive medical procedure in which a sample of human tissue is removed and sent to the pathology laboratory for analysis for diagnostic purposes is usually called “biopsy”. Instead, an optical biopsy is a noninvasive diagnostic procedure that performs an analysis of the tissue with an optical system using different techniques such as laser, infrared, fluorescence, spectroscopy, microscopy, among others. The sample of tissue of the body is not removed. The tissue to be analyzed is accessed through the body surface, including the analysis of the skin itself, or by endoscope to the mucosal surface of any cavity. Its main advantages over conventional biopsy are based on avoiding the possible spread of malignant cells by the latter, and avoid the intrinsic delays of conventional biopsy, in the cases in which the rapid diagnosis of malignancy allows immediate treatment, since this technique makes *in-situ* analysis of biochemical changes of patient’s tissues. However, significant research work is required to correlate the results of conventional biopsy with those resulting from optical biopsy before setting up a service that only treats patients by means of optical biopsies. In this paper the technique of Fluorescence Spectroscopy Optics, as well as the results of some preliminary studies of optical biopsies through it, (especially the autofluorescence) is described, comparing the natural fluorescence of healthy tissue and pathological tissue, way of contributing towards medical diagnosis.

Keywords: biopsy, autofluorescence, spectroscopy, fluorometer

I. INTRODUCCIÓN

Una biopsia óptica (BO), es una forma no invasiva de diagnóstico que por medio de un sistema óptico realiza un análisis del tejido en superficie o en profundidad. Diagnostica sin una biopsia intrusiva, ya que NO extrae el tejido del organismo. Al tejido a analizar se accede a través de la superficie del cuerpo, incluido el análisis de la propia piel, o por vía endoscópica a la superficie de la mucosa de cualquier cavidad como la boca, faringe, laringe, esófago, tráquea, estómago, vagina, útero, vejiga, ampolla rectal, colon, etc.

En las técnicas de BO los datos se obtienen en tiempo real y van acompañados de una considerable

información complementaria que permite evaluar la enfermedad *in vivo*.

Según la técnica empleada, los métodos de biopsia óptica se dividen en dos grandes grupos:

1_ Métodos basados en imágenes: son aquellos en los que se obtiene una imagen, y por eso el análisis es a nivel morfológico. Ej: Tomografía de coherencia óptica (OCT), Imágenes de holografía digital (DHI), endomicroscopía confocal, microscopía foto-acústica (PAM), etc. En la figura 1 puede observarse el rango de resolución que alcanzan las técnicas de imagen hoy en día.

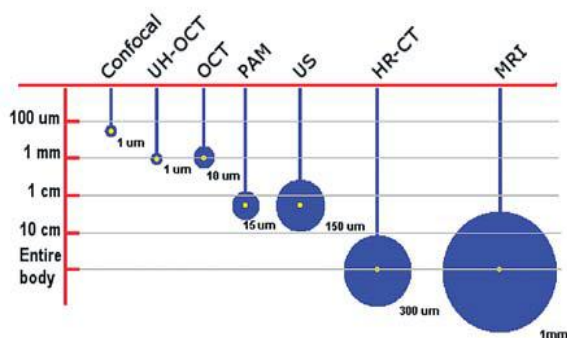


Fig. 1: Resolución espacial (círculos) y penetración axial (eje Y) de los sistemas de imágenes médicas. (UH-OCT=OCT Ultra Alta resolución, HR-CT=Tomografía computada de alta resolución, MRI=Resonancia magnética, el resto de las siglas en el texto) (1).

2_ Métodos no asociados a imágenes: se refiere al análisis espectral del tejido. Incluye la espectroscopía (fluorescencia, reflectancia, dispersión fotónica elástica, etc.) con luz coherente o no coherente. De hecho el término de Biopsia óptica se acuñó para estos últimos que quedan lejos del área de acción de los anatomopatólogos. Debido a que estas técnicas detectan características físicas y químicas de los tejidos, apartándose del análisis morfológico o imagenológico se sugiere para ellas también el nombre de *patología espectral*.

Otra definición de Biopsia óptica se refiere a *aquella que utiliza energía óptica para obtener información de la estructura y función de los tejidos sin ser disruptiva para los mismos* (1). En ella se encuentra incluida cualquiera de las técnicas no invasivas de obtención de imágenes de alta resolución mediante cortes ópticos. Esta definición está más cerca de la competencia de un anatomopatólogo por su formación, ya que el diagnóstico se basa o bien en las modificaciones de la histología normal o en la morfología de las células y el tejido.

II. ESPECTROSCOPIA OPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL ANALISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

Cuando la radiación electromagnética incide sobre las células, éstas absorben radiación y se producen transiciones entre los niveles de energía de algunas moléculas que forman la célula. Estas dependen de la longitud de onda de la radiación electromagnética y del tipo de moléculas. Una vez que las moléculas se han excitado, puede ocurrir algún proceso de desexcitación, radiativo o no radiativo. Nosotros trabajamos en los procesos de desexcitación radiativos y en particular en el fluorescente.

La emisión luminiscente producida por tejido irradiado con luz ultravioleta puede ser usada para localizar tumores, a través de la fluorescencia natural del tejido (autofluorescencia) o empleando marcadores tipo HpD (derivados hematoporfínicos).

Una de las razones más comunes para investigar especies fluorescentes, es la detección de enfermedades

sin necesidad de utilizar marcadores o fluoróforos exógenos.

En la Tabla 1 se listan algunos fluoróforos endógenos que juegan un rol fundamental en las transformaciones que ocurren en los tejidos durante la carcinogénesis (3).

TABLA 1: LONGITUDES DE ONDA DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN DE ALGUNOS FLUORÓFOROS

Fluoróforos	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
Triptófano (Aminoácido)	280nm	350nm
Colágeno y elastina (Estructuras proteínicas)	325nm y 320nm respectivamente.	390nm y 410nm, respectivamente.
NADH y FAD (Coenzimas)	365nm y 440nm, respectivamente.	470nm y 520nm, respectivamente.
Porfirinas	400nm y 450nm.	630nm y 690nm.

En un estudio por un método óptico, como la espectroscopía óptica de fluorescencia, se puede obtener información significativa acerca de varios fluoróforos presentes, como también de su ambiente local. Esto se debe a que la célula en estados de enfermedad generalmente posee velocidades de metabolismo diferentes o estructuras alteradas y por lo tanto hay variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia. Estas diferencias en los espectros están marcadas por la concentración de fluoróforos (o su distribución a lo largo del tejido), el ambiente local que rodea el fluoróforo, la arquitectura particular del tejido y la atenuación de la luz. Esta última depende de la longitud de onda y se debe a los cromóforos presentes en el tejido que absorben y no emiten fluorescencia.

La espectroscopía óptica de fluorescencia para el análisis de tejidos biológicos depende tanto de la concentración y distribución de fluoróforos presentes en los mismos como también de su entorno bioquímico/biofísico, ya que éste puede alterar la cantidad de fluorescencia cedida y el tiempo de vida de los fluoróforos. Los fluoróforos, como también su concentración y distribución, pueden variar significativamente entre capas de tejido, por lo que la espectroscopía de fluorescencia en tejidos también depende de la absorción y dispersión que resulta de la concentración y distribución dentro de sus diferentes capas. Las propiedades de absorción y distribución de la luz en los tejidos, afectarán tanto las longitudes de onda de excitación, como las de emisión. Por consiguiente, solo los fluoróforos contenidos en las capas de los tejidos en la cual la luz de excitación penetra y de la cual la luz de emisión fluorescente puede escapar, producirán fluorescencia medible.

Resumiendo, la espectroscopía óptica de fluorescencia, proporciona características discriminantes en el análisis de los cambios bioquímicos y estructurales de los tejidos en los estados de normalidad y patología, y es por ello que esta técnica, puede contribuir al diagnóstico médico a través de la observación *in-vivo* de pacientes (2).



Fig. 2: Esquema de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en el análisis de tejidos biológicos.

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

El equipo básico consiste de una fuente de luz, un conducto flexible que contiene la fibra óptica para la iluminación y recolección de la luz, un elemento de dispersión que separa la luz emitida entre las respectivas longitudes de onda y un detector que mide las intensidades a estas longitudes de onda. En este escenario, la emisión de fluorescencia, es medida en una reemisión geométrica en la cual la iluminación y recolección de la luz son representadas en la misma superficie del tejido biológico.

Las medidas del presente trabajo fueron realizadas con un espectrofluorómetro portátil, que emite en 405 nm y detecta entre los 500 y los 800 nm. La figura 3 muestra fotos del dispositivo completo, del cabezal de medición, cuya fibra óptica mide 200 μm de diámetro y de la pantalla del software del equipo en la que se grafica el espectro.

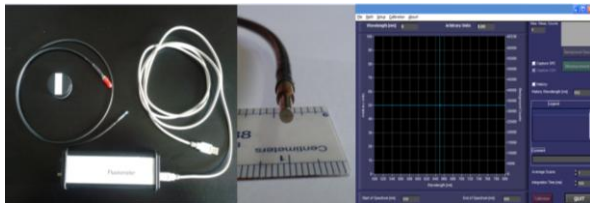


Fig.3: Espectrofluorómetro (Izquierda) - Cabezal (Centro) - Pantalla del software del fluorómetro (Derecha)

En la figura 4 se muestran representados espectros típicos para un caso de lesiones perianales por HPV6 *in-vivo*. Los números indicados en las curvas son los correspondientes a la ubicación espacial de las lesiones observadas, según la convención del “reloj”. Un esquema de dicha configuración, se muestra a continuación en la figura 5.

Las muestras autofluorescentes denominadas como 3, 9 y 10 corresponden a lesiones patológicas, mientras que la muestra 12 es el testigo tomado sobre piel sana.

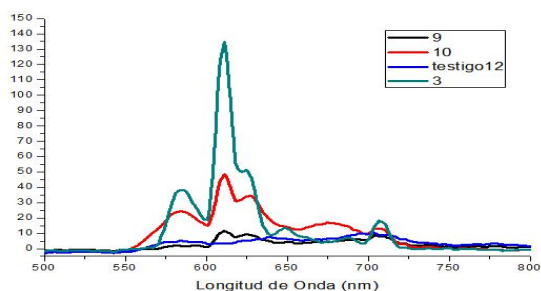


Fig 4: Espectros obtenidos para el caso de HPV6 perianal.

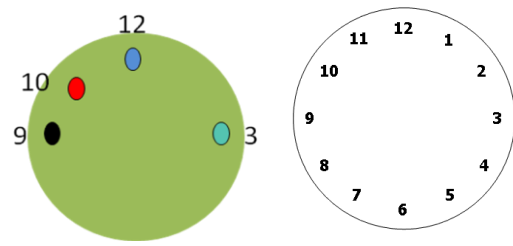


Fig.5: Esquema representativo de la convención de “reloj”, y de la ubicación de las curvas representadas en la figura 3.

En la figura 4 se observa claramente que a pesar de que las señales patológicas se ven afectadas en su intensidad debido a la topografía corporal (efecto del factor angular de observación: $\cos \theta$), poseen la misma estructura espectral.

Para ilustrar las diferencias en los espectros dadas por los diferentes tejidos, en la figura 6 se muestra un espectro correspondiente a epitelio sano de cuello de útero tomado *in-vivo*, uno de tejido perianal y uno de la palma de la mano.

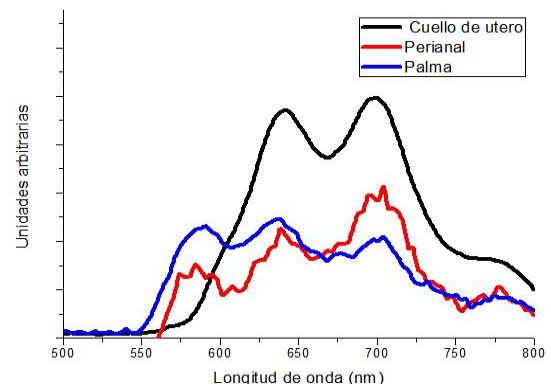


Fig.6: Espectro típicos de diferentes tejidos.

Si bien el fluorómetro es de baja resolución, los espectros observados que muestran nuestros resultados preliminares y su eficaz correlación con su origen (en el caso expuesto, HPV6) indican un buen camino a ser seguido relacionando Investigación-Clinica-Tratamiento.

IV. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Horacio Poteca por su amplia colaboración en el presente trabajo.

V. REFERENCIAS

- (1) Olga Ferrer-Roca. REV ESP PATOL 2009; Vol 42, n.º 3: 167-181
- (2) Belarmino S. Giraldo. “Espectroscopía Óptica de Fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino”. Universidad Nacional de Colombia. Fac. de Ingeniería y Arquitectura. Doctorado en Ingeniería. Manizales, 2009.
- (3) S. Andersson-Engels et al., Photochem. Photobiol., 53 (1991) 807-814.
- (4) R. R. Alfano, et al., IEEE Journal of Quantum Electronics 20 (1984) 1512-1515.