

## ***Cuantificación tridimensional aplicada al análisis morfológico y de autofluorescencia como potencial herramienta de diagnóstico óptico.***

### **Motivación**

El cáncer colorrectal (CCR) tiene una alta incidencia y mortalidad a nivel mundial, con una proyección creciente para las próximas décadas. La mayoría de los casos son esporádicos y el lento crecimiento del pólipo adenomatoso, su lesión precursora, le confiere mayor posibilidad de prevención mediante la detección y resección colonoscópica. Los sistemas de endoscopia clásicos continúan siendo los métodos estándar de examinación, así como la estadificación TNM el sistema de uso generalizado para la clasificación y diagnóstico mediante el análisis de biopsias. Sin embargo, se han desarrollado técnicas de imágenes avanzadas y dispositivos complementarios que permiten mejorar la detección de pólipos y adenomas, como la endoscopia de alta resolución.

El procesamiento y análisis de imágenes adquiridas durante la inspección podría ofrecer una metodología alternativa para la detección de características patológicas y diagnóstico temprano. En el CCR, la morfología de las fosas de las criptas de Lieberkhün es un factor que define el estado del tejido. No obstante, la eficiencia de una metodología basada en este concepto dependerá de la caracterización de dichas estructuras, que debe sustentarse con medidas 3D que describan su forma en diferentes estadios de tiempo en la progresión de la enfermedad.

La mayoría de los estudios publicados sobre caracterización de criptas involucran el juicio de un endoscopista, utilizando por ejemplo la clasificación morfológica del patrón de fosas de Kudo como criterio de diagnóstico para predecir la histología de las lesiones colorrectales. Este método establece cinco patrones morfológicos de orificios en la mucosa superficial, permitiendo diferenciar bidimensionalmente lesiones neoplásicas de no neoplásicas. Sólo algunos reportes implementan métodos de procesamiento digital de imágenes para la misma actividad y/o para cuantificar y analizar descriptores geométricos y de forma, principalmente a nivel bidimensional (2D). Hasta el momento, la relación entre los patrones y la configuración tridimensional (3D) ha sido establecida y correlacionada mediante inspecciones visuales y mediciones de ancho y largo, informadas en escasos artículos de investigación.

Por otro lado, la variación de autofluorescencia es otro factor que puede utilizarse como marcador en la identificación de tejido epitelial patológico. El análisis conjunto, morfología y autofluorescencia, ofrecería información cuantitativa necesaria para proponer futuras metodologías de procesamiento de imágenes tendientes al diagnóstico temprano del CCR, evitando el uso de técnicas de tinción, y disminuyendo el tiempo de inspección y diagnóstico, así como de biopsias y recursos involucrados en el proceso de examinación.

### **Hipótesis**

La caracterización morfológica 3D de las fosas de las criptas de Lieberkhün y de la autofluorescencia de la mucosa de colon presentan diferencias entre muestras de tejido epitelial patológico y no patológico, como también entre las etapas de progresión del CCR.

### **Objetivo General**

- Desarrollar una metodología de procesamiento y análisis de imágenes que permita cuantificar en 3D los cambios morfológicos y de autofluorescencia producidos en tejidos no patológicos y patológicos.

### **Objetivos Específicos**

- Comprender el proceso de formación de la imagen en un microscopio y obtener representaciones tridimensionales de tejidos no patológicos y patológicos mediante seccionamiento óptico.
- Evaluar y aplicar técnicas de restauración como deconvolución digital.
- Implementar una metodología de cuantificación tridimensional para la caracterización morfológica y de autofluorescencia en la progresión de un modelo de cáncer.
- Evaluar la metodología implementada como posible herramienta de diagnóstico.

## Metodología

La carcinogénesis colorrectal fue inducida en dos estudios experimentales mediante el modelo azoximetano/dextrano sodio sulfato (AOM/DSS). Cada caso utilizó 24 ratones adultos de la cepa BALB/c, asignados a un grupo control y tres en tratamiento. La estrategia, aplicada a animales de grupos en tratamiento, empleó la inyección de AOM durante el día 1 de experimentación, y siete días de suministro de DSS en agua de beber a partir de la segunda semana (día 8). El grupo control sólo fue inyectado con solución salina.

Se adquirieron imágenes 3D (70 secciones ópticas: 1920×1440 píxeles, separadas 0,72  $\mu\text{m}$  entre sí) a partir de muestras frescas de tejido epitelial de colon distal en el día 1 (tiempo 0) para animales control, y en la 2<sup>da</sup>, 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semana para tratados, utilizando un microscopio invertido Olympus IX83. La configuración comprende una lente objetiva 20X/0,75 AN (UPLSAPO, Olympus), fuente de iluminación de fluorescencia (U-HGLGPS, Olympus), cubo de filtro de fluorescencia (U-3N41001, excitación: BP HQ 460-500, dicroico: Q505LP, emisión: BP 510-560) y cámara digital de alta sensibilidad basada en un sensor de imagen CMOS (3,63  $\mu\text{m}/\text{píxel}$ , ORCA Flash 2.8, Hamamatsu) con lente de magnificación 0,5X.

El conjunto de etapas del procesamiento digital de imágenes, tanto para el análisis morfológico como de autofluorescencia, fue ejecutado a través de FIJI, generalmente implementando cada una mediante el lenguaje Macro ImageJ. Inicialmente, se corrigieron efectos de fotoblanqueo y fluorescencia fuera de foco mediante un método de corrección de ajuste exponencial, seguido de deconvolución mediante el algoritmo Richardson-Lucy, estableciendo una condición de límite reflectante a los fines de evitar artefactos de borde generados por éste último.

El estudio morfológico continuó con procedimientos de segmentación y cuantificación. El primero aplica una secuencia de filtros y determina los objetos de interés finales utilizando parámetros de tamaño y circularidad definidos para cada punto de tiempo. La variabilidad de las características de las imágenes requirió la introducción de algunos pasos alternativos, discriminándolas en dos grupos en base a características visibles de autofluorescencia. Se filtraron los objetos segmentados, manteniendo sólo a representaciones presentes en al menos 25 secciones del volumen. Posteriormente a una interpolación y configuración de escala, se cuantificaron parámetros (2D y 3D) geométricos y de forma. De este modo, de cada orificio situado en la primera imagen del volumen, sección superficial de la mucosa, se obtuvo el perímetro, área, centroide, elongación, esfericidad y solidez. Por otro lado, se cuantificó volumen, superficie, compactibilidad, esfericidad, elongación, planitud e irregularidad como medidas geométricas y de forma 3D para cada fosa. El análisis final se restringió a datos de representaciones que comienzan entre la 1<sup>ra</sup> y 5<sup>ta</sup> sección, y finalizan desde la 66<sup>ta</sup> en adelante. La morfología 3D de fosas con longitudes relativamente equivalentes (43,9 a 49,7  $\mu\text{m}$  desde la superficie luminal de la mucosa hacia el interior), se describió a través de la mediana, rango intercuartil, media y desviación estándar de las medidas geométricas y de forma 3D en cada punto de tiempo de ambos estudios experimentales. La caracterización 2D se llevó a cabo utilizando las mismas medidas estadísticas.

Por último, se cuantificaron parámetros de intensidad para cada volumen, tales como media, desviación estándar, moda, mediana, mínimo y máximo. Al igual que en las situaciones previas, se realizó una caracterización de autofluorescencia a través de las medidas estadísticas mencionadas. El estudio requirió un ajuste de intensidad previo, a causa de la configuración de tiempos de exposición automáticos durante la adquisición de imágenes.

Para cada estudio experimental se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis determinando diferencias en las medias de cada parámetro entre todos los puntos de tiempo establecidos. Para resultados significativos se ejecutaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney con corrección del valor p por el método de Holm.

## Resultados

El cotejo de análisis estadísticos de la media de cada parámetro de ambos estudios experimentales, en complemento con la información cuantitativa obtenida, definieron particularidades específicas:

- En el análisis morfológico 2D se hallaron diferencias significativas entre todos los puntos de tiempo, en prácticamente todos los parámetros. Generalmente, los orificios reducen su área en la etapa inicial (2<sup>da</sup> semana), incrementándola en la 4<sup>ta</sup>, y reduciéndola nuevamente en la 8<sup>va</sup> en relación a esta última, con el perímetro siguiendo un comportamiento similar. Las representaciones control no son esferas perfectas, la irregularidad de sus bordes comienza a identificarse al inicio del tratamiento, y la esfericidad disminuye a partir de la 4<sup>ta</sup> semana, incrementándose o disminuyendo con la progresión de la patología.

- En el análisis morfológico 3D se hallaron diferencias significativas en volumen e irregularidad entre control y todos los puntos de tratamiento, mientras que las medidas restantes encontraron las mismas diferencias estadísticamente significativas exceptuando a tiempo cero y 2<sup>da</sup> semana. Prácticamente todos los parámetros presentaron diferencias significativas entre puntos de tiempo de tratamiento. Las fosas de tiempo cero y de 2<sup>da</sup> semana en tratamiento presentan similitudes morfológicas siendo, en general, más tubulares, rectas y menos irregulares que las restantes tratadas. El volumen se reduce en la etapa inicial (2<sup>da</sup> semana), incrementando su valor medio y variabilidad en la 4<sup>ta</sup> semana. Desde este punto, la configuración se altera, pudiendo incrementar su grosor y elongación en el plano XY, y su superficie se ve afectada, extendiéndose a causa del incremento de irregularidad externa, incidiendo también en la rectitud de la orientación de las fosas.
- La autofluorescencia sólo presentó diferencias significativas entre el tiempo cero y 2<sup>da</sup> semana respecto de la 4<sup>ta</sup>, para el valor medio, desviación estándar y mínimo de intensidad del primer estudio experimental. El comportamiento es diverso en las muestras tratadas. En general, la intensidad de fluorescencia y su variabilidad disminuyen al comienzo del tratamiento respecto de las muestras control, mientras que la 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semanas en tratamiento presentan un incremento (o gran reducción) de su valor, en relación al control y a la 2<sup>da</sup> semana.

La Fig. 1 exhibe resultados obtenidos por segmentación (rojo), indicando la selección de los objetos cuantificables (azul), para un volumen de tiempo cero y uno de 4<sup>ta</sup> semana, mientras que la Fig. 2 ejemplifica cambios morfológicos observables entre fosas de los mismos puntos de tiempo.

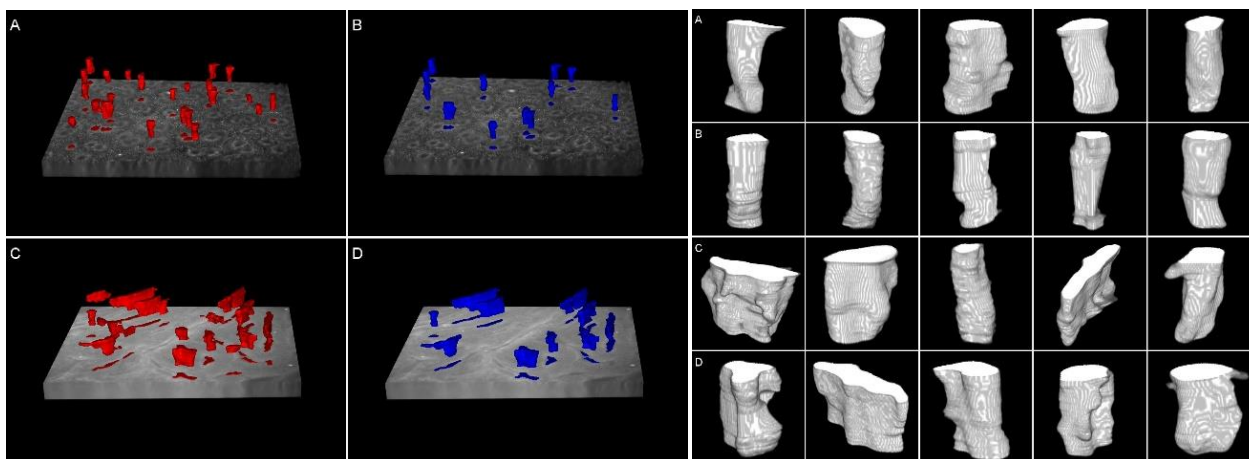


Fig. 1 – Segmentación. Tiempo cero (A-B) y 4<sup>ta</sup> semana (C-D).

Fig. 2 - Tiempo cero (Filas A-B) y 4<sup>ta</sup> semana (Filas C-D).

## Conclusiones

La caracterización 3D efectuada aporta información morfológica, no reportada hasta la actualidad, sobre un segmento de las fosas que representa aproximadamente a un tercio de una fosa no neoplásica según la longitud reportada para criptas colónicas distales de ratones. De los resultados obtenidos, y de lo reportado histopatológicamente, las fosas en tiempo cero y 2<sup>da</sup> semana podrían ser asociadas a lúmenes de criptas normales o no neoplásicas. Además, el tratamiento con AOM/DSS afectaría inmediatamente el volumen, pero se podría suponer que los cambios comenzarían luego de la 2<sup>da</sup> semana, siendo la 4<sup>ta</sup> el punto temporal que involucraría el mayor número de alteraciones morfológicas. Debido a que la progresión de la patología involucra cambios en la orientación de las criptas, sus estructuras tienden a variar su tamaño alargándose, elongándose o presentando bordes irregulares, se podría conjeturar que las fosas de 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semanas podrían estar relacionadas a adenomas o posibles criptas de cáncer.

Hasta el momento no se podría establecer un patrón entre las distintas etapas de tiempo estudiadas en autofluorescencia. Sin embargo, con menos evidencia que el aspecto morfológico, su intensidad también tiende a señalar a la 4<sup>ta</sup> semana como una etapa de cambio que debe seguir analizándose.

Este estudio preliminar establece la base para próximas investigaciones, que procurarán reconstruir fosas en su totalidad, incrementando la profundidad en la adquisición de imágenes, así como también aumentar el número de volúmenes analizables de intensidad.