

## BIOPSIA OPTICA. DESCRIPCIÓN GENERAL Y RESULTADOS PRELIMINARES POR ESPECTROSCOPIA OPTICA DE AUTOFLORESCENCIA

Corti, Agustina\*<sup>1</sup>, Garavaglia, Mario<sup>1,2</sup>

1. Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. 2. Centro de Investigaciones Ópticas (CCT-CONICET La Plata y CIC), Gonnet, La Plata, Argentina. \* [agustinacorti@gmail.com](mailto:agustinacorti@gmail.com)

Palabras Claves: Biopsia, autofluorescencia, espectroscopía, fluorómetro.

### Resumen

Convencionalmente asociamos el término “biopsia” a un procedimiento médico invasivo por el cual, mediante cirugía o punción, se toma una muestra de tejido humano y se remite al laboratorio de patología para su análisis con fines diagnósticos. En cambio, una biopsia óptica es un procedimiento no invasivo de diagnóstico que 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 como la boca, faringe, laringe, esófago, tráquea, estómago, vagina, útero, vejiga, ampolla rectal, colon.

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 presentan algunos casos de biopsias ópticas realizadas mediante Espectroscopía Óptica de Fluorescencia, (en particular la Autofluorescencia), para realizar *in-situ* el análisis de los cambios bioquímicos de los tejidos de pacientes, comparando la fluorescencia natural del tejido sano y del tejido patológico, de manera de contribuir al diagnóstico médico.

### 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.

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*.

Desde el punto de vista técnico los métodos de biopsia óptica se dividen en dos grandes grupos:

**1- Métodos basados en imágenes** entre los que se encuentran todas las imágenes de luz coherente del tipo de la: Tomografía de coherencia óptica (OCT), Imágenes de coherencia óptica (OCI), Imágenes de holografía digital (DHI), etc. Las de iluminación estructurada como la endomicroscopía confocal o las mixtas como la microscopía foto-acústica (PAM). En la figura 1 puede observarse el rango de resolución que alcanzan las técnicas de imagen hoy en día.

**2- Métodos no asociados a imágenes** que incluye la espectroscopia de los tejidos (fluorescencia, reflectancia, dispersión fotónica elástica, etc.) con luz coherente o no coherente. En suma, se realiza el análisis espectral del tejido.

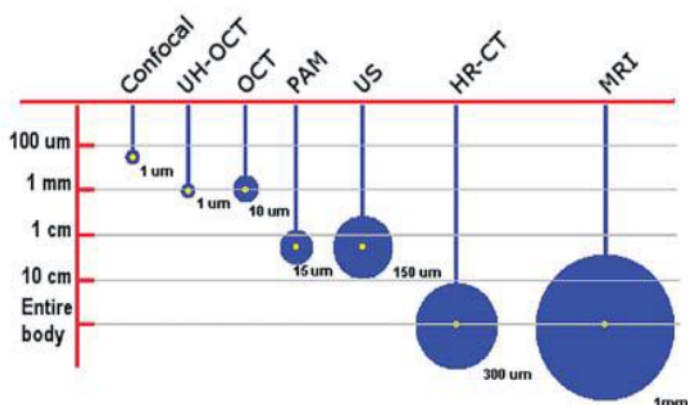


Fig. 1: Resolución espacial (círculos) y penetración axial (eje Y) de los sistemas de imágenes médicas. (HR-CT=High resolution computer tomography, MRI=Magnetic resonance, el resto de las siglas en el texto) (1).

En un principio el término Biopsia óptica se usó para mencionar a los métodos no asociados a imágenes, por encontrarse lejos del área de acción de los anatomopatólogos, que se basa en la observación de imágenes.

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.

La constante evolución del microscopio ha conseguido romper el límite de la resolución óptica con numerosas técnicas microscópicas sin especificidad física o química basadas en iluminación estructurada, interferometría u holografía. Mientras que las técnicas espectroscópicas como fluorescencia, infrarrojo-IR o Raman, detectan las características físicas y químicas de los especímenes por lo que algunos las llaman patología espectral.

## ESPECTROSCOPIA OPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL ANALISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS (2)

Desde el punto de vista molecular, 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, dependiendo 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. En nuestro caso 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 hematoporfirínicos).

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.

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 tiene 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, que depende de la longitud de onda, debido a la cantidad de los cromóforos presentes en el tejido que absorben y no emiten fluorescencia.

La espectroscopía óptica de fluorescencia para el análisis de tejidos biológicos depende específicamente de la concentración y distribución de fluoróforos presentes en los mismos, como también, del entorno bioquímico/biofísico, el cual 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. En definitiva sus propósitos son evitar la posible diseminación de células malignas por la biopsia convencional, y evitar los retardos propios de la biopsia convencional en los casos que el diagnóstico rápido de malignidad propio de la biopsia óptica permite un tratamiento inmediato.



## 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 desde los 500 hasta los 800 nm. La figura 2 muestra fotos del dispositivo completo, del cabezal de medición, cuya fibra óptica mide 200  $\mu\text{m}$  de diámetro y de la pantalla del software del equipo en la que se grafica el espectro.

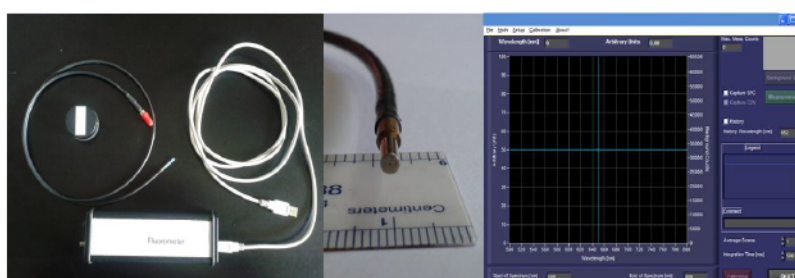


Fig.2: Espectrofluorómetro (Izquierda) - Cabezal (Centro) - Pantalla del software del fluorómetro (Derecha)

En la figura 3 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 4.

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.

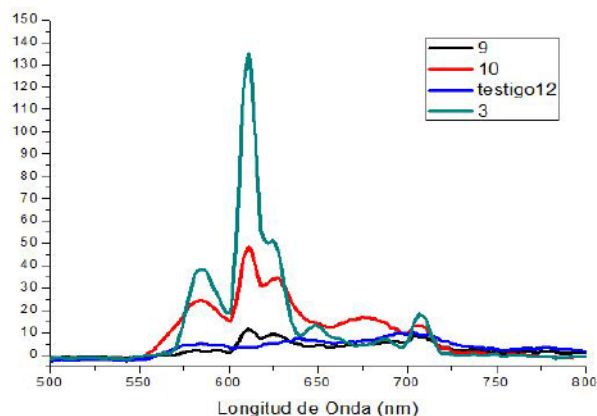


Fig 3: Espectros obtenidos para el caso de HPV6 perianal.

En la figura 3 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 5 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.

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.

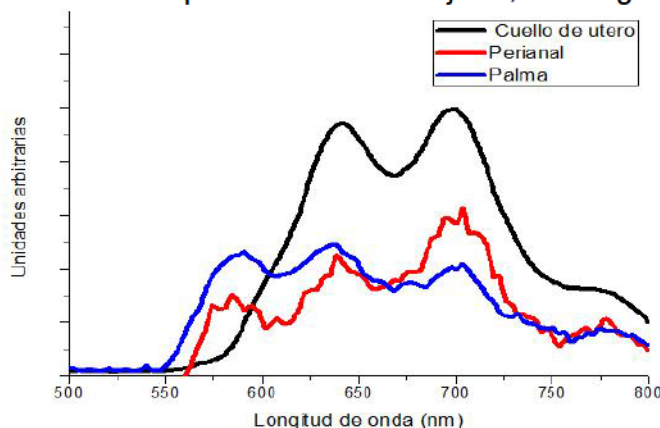


Fig.5: Espectro típicos de diferentes tejidos.

## AGRADECIMIENTOS

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

## 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.