



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa

Estudio de las alteraciones hepáticas
por fibrosis con técnicas de caracterización
foto-térmicas

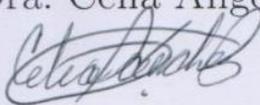
IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS:
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
(INGENIERÍA BIOMÉDICA)

Autora:

Ing. Nathalie ALEMÁN GARCÍA

Asesoras:

Dra. Martha Refugio ORTIZ POSADAS
UAM-IZTAPALAPA

Dra. Celia Angelina SÁNCHEZ PÉREZ

UNAM-CCADET

Jurado:

Presidente: Dra. Raquel VALDÉS CRISTERNA. UAM-IZTAPALAPA
Secretario: Dra. Martha Refugio ORTIZ POSADAS. UAM-IZTAPALAPA
Vocal: Dr. Joselín HERNÁNDEZ RUIZ. UME, HGMEL

29 de marzo de 2017



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Posgrado en Ingeniería Biomédica

“Estudio de las alteraciones hepáticas por fibrosis con técnicas de
caracterización foto-térmicas”

Tesis que presenta:
Ing. Nathalie Alemán García

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias (Ingeniería Biomédica)

Asesoras de tesis:
Dra. Martha Refugio Ortiz Posadas
Dra. Celia Angelina Sánchez Pérez

México, CDMX, 2017.

A mis padres Guadalupe y Agustín,

Siempre mi fortaleza, siempre mi ejemplo, siempre conmigo.
No tengo forma de agradecerles cada cosa que han construido en mí, aquí una más.
Estoy segura de que todo lo bello en mi interior lleva su marca.

A mi pequeño hermano, Agustín,

Fruto de la complicidad de toda la vida es que te amo tanto.
Porque siempre me das el aliento, la valentía, la claridad y el apoyo que me falta, para ti hermano.

A mi abuela,

Gracias porque con tu ejemplo sembraste aspiraciones dentro de mí.
Por darme seguridad y tener fe en mis sueños.
Porque tus manos sobre las mías me hacen sentir que no hay imposibles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana. Por abrirme sus puertas y ser pieza clave en mi formación. En especial, a mis profesores y coordinadores, quienes durante el posgrado, pusieron todo su empeño en transmitir sus conocimientos. A mis compañeros que brindaron su amistad, JP y Omar.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber otorgado el apoyo económico para la realización de los estudios de maestría.

A la Dirección General de Asuntos del Personal de Académico (DGAPA), de la UNAM, por el apoyo brindado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), en el proyecto IT100515.

A, la Dra. Raquel Valdés, por su tiempo y dedicación en la revisión de este documento. Al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico y a la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México, por las facilidades concedidas y la colaboración.

Al Dr. Joselín Hernández, al Dr. Enoch Gutiérrez y al M. en C. Adolfo Pérez, por el apoyo que recibí durante este proyecto y por la convivencia personal.

Dra. Martha Ortiz porque sus contribuciones fueron, incluso, más allá de lo académico.

Dra. Celia Sánchez. Por los años de aguantarme. Todas sus enseñanzas han sido fundamentales para mí y la recordaré con cariño siempre.

A mi tío Rafael y mis primos Rafa, Oswaldo e Irving. Gracias por estar al tanto y cerca de mí.

A Mabe. Por hacerse parte de mi familia.

A mis amigos:

A Rehabilitación. Cada momento con ustedes me da más de lo que imaginan. Principalmente gracias a Itzel y Mag, por ser tanto para mí. Deseo que, a través de los años sigamos juntas.

A los que, después de muchas estaciones, siguen firmes a mi lado: May, Karina, Erick y Mau.

A Carlos García por tu tan importante y completa presencia, por tu sincero e incondicional apoyo.

Nuestra complicidad te hace parte de esto. Gracias Came.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Alteraciones Hepáticas: Fibrosis y Cirrosis	4
1.1.1 Fibrosis Hepática.....	4
1.1.2. Evaluación del Grado de Fibrosis Hepática.....	5
1.1.3 Epidemiología de la Fibrosis y de la Cirrosis en México	7
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Caracterización de Materiales por Medio de sus Propiedades Termo-Físicas.....	10
2.1.1. Principio de Funcionamiento del Sensor de Flujo de Calor.....	11
2.1.2. Propiedades Termo-Físicas de los Materiales.....	13
2.1.3 Proceso de Tránsito del Calor.....	15
2.1.4 Conducción Unidimensional en Estado Estacionario	17
2.1.5 Transferencia de Calor a través de un Bloque Plano	18
2.2 Enfoque Lógico Combinatorio.....	19
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.	25
3.1 Modelo Animal de Inducción de Fibrosis con CCl ₄	25
3.1.1 Toma de Muestras Hepáticas y Metodología para Realizar los Cortes	26
3.2 Diagnóstico de Fibrosis Utilizando la Escala <i>Metavir</i>	27
3.3 Caracterización del Tejido Hepático por Medio de un Sensor Basado en la Foto-Deflexión ...	28

3.3.1 Configuración Experimental	28
3.3.2. Procedimiento para las Mediciones con el Sensor de Flujo de Calor	30
3.3.3. Mediciones de Repetibilidad y Calibración del Sensor de Flujo de Calor	32
3.4 Herramientas Morfométricas para la Cuantificación de Hallazgos Histológicos	34
3.4.1 Metodología para la Cuantificación de Fibrosis Hepática	34
3.4.2 Metodología para la Cuantificación de Esteatosis Hepática	35
3.5 Metodología para el Diagnóstico de Fibrosis Utilizando el Enfoque Lógico Combinatorio.....	37
3.5.1 Modelo Matemático.	37
3.5.2 Formalización del Algoritmo de Votación.....	38
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	40
4.1 Diagnóstico de Fibrosis Utilizando la Escala <i>Metavir</i>	40
4.2 Mediciones con el Sensor de Flujo de Calor.....	41
4.3 Cuantificación de Hallazgos Histológicos	44
4.3.1 Cuantificación de Fibrosis Hepática	44
4.3.2 Cuantificación de Esteatosis Hepática	47
4.4. Análisis de la Dispersión de Fibrosis Hepática.....	49
4.5 Diagnóstico de Fibrosis Utilizando el Enfoque Lógico Combinatorio.....	52
4.5.1 Modelo Matemático para el Cálculo de la Fibrosis	52
4.5.2 Matriz de Aprendizaje con Evaluación Metavir	57
4.5.3 Matriz de Aprendizaje con Porcentaje de Fibrosis	59
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	65
APÉNDICE A. TRABAJOS PUBLICADOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala Metavir para clasificar grados de fibrosis.....	6
Tabla 2. Información necesaria para la formulación del problema.....	22
Tabla 3. Modelo murino para experimentación.	25
Tabla 4. Características de los elementos presentes en el montaje del sensor.....	30
Tabla 5. Datos de los cortes tomados del modelo animal experimental para realizar mediciones de flujo de calor	41
Tabla 6. Resultados de la estimación del porcentaje de fibrosis utilizando herramientas morfométricas	46
Tabla 7. Resultados de la estimación del porcentaje de esteatosis utilizando herramientas morfométricas	48
Tabla 8. Variables, ponderación, dominio y criterio de comparación	56
Tabla 9. Resultados de la clasificación con evaluación Metavir	58
Tabla 10. Resultados de la clasificación con porcentaje de fibrosis	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del daño hepático.....	4
Figura 2. Esquema del sensor de flujo de calor, considerando el modelo de onda térmica.....	12
Figura 3. Flujo de calor a través de un bloque compuesto (resistencias térmicas en serie).....	14
Figura 4. Transferencia del calor Q , a lo largo de un material, de longitud L	15
Figura 5. Transmisión de calor a través de un elemento de materia de espesor infinitesimal dx	16
Figura 6. Diagrama para la conducción de calor en una dimensión.....	17
Figura 7. Condiciones de temperatura en las fronteras para un bloque.....	18
Figura 8. Distribución de temperatura a través de un bloque.....	19
Figura 9. Diagrama de las etapas para la formalización y solución del problema de clasificación.....	21
Figura 10. Estructura del hígado de rata y disposición de los cortes.....	26
Figura 11. Elementos en el montaje del sensor de flujo de calor para la caracterización de una corte de tejido.....	28
Figura 12. Esquema del área de intersección de los perfiles gaussianos desplazados una distancia h , acotados por el área del colimador de radio R	29
Figura 13. Interfaz en <i>LabVIEW</i> ® para el control del sistema y adquisición de datos.....	31
Figura 14. Calibración del sensor aplicando diferentes pulsos de calor.....	33
Figura 15. Diagrama de caja y bigote para las curvas obtenidas aplicando diferentes flujos de calor Q	34
Figura 16. Interfaz del programa para calcular el porcentaje de área con fibrosis.....	35
Figura 17. a) Imagen de una biopsia hepática de rata con tricrómica de Masson en un acercamiento 10x. b) Resultado del filtrado para fibrosis.....	35
Figura 18. Interfaz del programa para calcular el porcentaje de área con esteatosis.....	36
Figura 19. a) Imagen de una biopsia hepática de rata con tricrómica de Masson en un acercamiento 10x. b) Resultado del filtrado para esteatosis.....	36
Figura 20. Curvas de conducción de calor para los cortes tomados del modelo animal experimental, agrupados por evaluación Metavir.....	42
Figura 21. Curvas de conducción de calor obtenidas promediando por diagnóstico Metavir.....	43
Figura 22. Curvas de conducción de calor de las muestras con menos dispersión de la evaluación Metavir.....	43

Figura 23. Imágenes problema para el programa de cuantificación de fibrosis	45
Figura 24. Diagrama de caja y bigote para el porcentaje de fibrosis	47
Figura 25. Imágenes problema para el programa de cuantificación de esteatosis	48
Figura 26. Diagrama de caja y bigote para el porcentaje de esteatosis	49
Figura 27. Distribución de la evaluación de fibrosis por tiempo de inducción.....	50
Figura 28. Dispersión de diagnósticos Metavir para el Grupo T1 por individuo	51
Figura 29. Ganancia de peso por individuo	52
Figura 30. Diferencia de potencia normalizada por individuo.....	53
Figura 31. Porcentaje de fibrosis por individuo	53
Figura 32. Desviación estándar del porcentaje de fibrosis por individuo	54
Figura 33. Porcentaje de grasa por individuo	54
Figura 34. Desviación estándar del porcentaje de grasa por individuo.....	55

RESUMEN

La fibrosis hepática es la respuesta a estímulos dañinos al hígado y consiste en la deposición excesiva de matriz extracelular de manera progresiva. Es reversible si se trata y erradica la causa de la enfermedad y si las lesiones no son demasiado graves, es decir, si el diagnóstico es oportuno y se da un tratamiento efectivo, el hígado puede recuperar su estructura normal. Sin embargo, detectar la enfermedad en una etapa inicial es poco probable dado que un paciente presenta síntomas cuando se encuentra en la última fase: la cirrosis hepática.

El método de elección para determinar el grado de fibrosis es la biopsia hepática que consiste en la toma de una muestra y su posterior análisis morfológico por observación al microscopio. Esta muestra corresponde a 1/50,000 del hígado. Para evaluar la biopsia, se han propuesto múltiples escalas que evalúan distintos aspectos histopatológicos, la utilizada convencionalmente es Metavir. De acuerdo a esta escala, se define el grado fibrótico en cuatro fases: F1, fibrosis portal (leve); F2, fibrosis portal con septos (moderada); F3, fibrosis con numerosos septos y nódulos de regeneración incompletos (grave); F4, cirrosis, con nódulos de regeneración completos. Este método presenta varios problemas como variabilidad inter-observador, baja resolución entre los grados intermedios de fibrosis y la limitante de ser una prueba cualitativa. Recientes terapias y herramientas de diagnóstico para este problema demandan métodos para establecer un grado de avance en la enfermedad según aspectos cuantitativos. Existe incertidumbre en el diagnóstico que repercute en imprecisión en la calibración de nuevas técnicas.

Por lo anterior el objetivo general de este trabajo fue evaluar del comportamiento térmico del tejido hepático afectado por fibrosis, por medio de un sensor de flujo de calor. Así como la identificación de la fase de fibrosis del tejido hepático aplicando el enfoque lógico-combinatorio de la teoría de reconocimiento de patrones.

Para estudiar la enfermedad, se indujo fibrosis hepática en un modelo de ratas de la cepa Wistar con Tetracloruro de Carbono (CCl₄). Se realizó una hepatectomía en los individuos del modelo según los tiempos de inducción establecidos para coleccionar las muestras de tejido. Se estableció una metodología para la evaluación del avance de fibrosis en las muestras hepáticas, sustentada por tres observadores, basada en la escala Metavir. Se realizaron mediciones en las muestras para determinar su comportamiento térmico, utilizando un sensor de flujo de calor. También, se aplicó una herramienta morfométrica para la cuantificación de hallazgos

histopatológicos que entrega una medida cuantitativa en una escala continua del problema que se estudió. Finalmente, aplicando el enfoque lógico-combinatorio de la teoría de reconocimiento de patrones, se diseñó una función de semejanza usando siete características cuantitativas, que permitió la descripción de los individuos y la clasificación de los estadios de la fibrosis a través una descripción más integral de las muestras hepáticas.

Las mediciones para la caracterización de la conducción térmica muestran que existe una relación entre la progresión de la fibrosis hepática en ratas y las propiedades térmicas del tejido hepático, entre mayor es la progresión de la enfermedad, mayor es el flujo de calor en la muestra. Sin embargo, esta relación se encontró solo en muestras con diagnósticos contundentes de fibrosis, por lo que es deseable aumentar la sensibilidad del sensor de flujo de calor para continuar con la evaluación de esta metodología como herramienta para el análisis de las muestras hepáticas. La cuantificación de hallazgos histopatológicos muestra que la cantidad de fibrosis tiene un aumento progresivo conforme la evolución de la enfermedad. En los resultados de la cuantificación de esteatosis, se obtuvieron porcentajes acotados entre 0.06 y 0.87 % para 15 de los 16 individuos del modelo animal. Solamente en un individuo se contabilizó un valor atípico de 9.76%. No se encontró una correlación entre esta afección y las otras variables adquiridas.

El enfoque lógico combinatorio se aplicó bajo dos esquemas, uno donde la definición de las clases se hizo con el diagnóstico de la escala Metavir encontrando un 25% de acierto en esta clasificación y como resultado de aplicar el segundo esquema, con el porcentaje de fibrosis como clasificador, se obtuvo un 75% de acierto. Si bien, la muestra se limitó a 16 individuos, lo que puede no ser concluyente al utilizar este enfoque en un modelo animal, de los resultados destaca que la variable Metavir, utilizada en un inicio para definir las clases, es de tipo ordinal y cualitativa, y pretendía diferenciar a individuos definidos con variables físicas cuantitativas; es por ello que se obtuvo un resultado de clasificación más favorable cuando se utilizó el porcentaje de fibrosis.

Los resultados de este trabajo representan una contribución, no solamente para el desarrollo de herramientas para el diagnóstico de la fibrosis hepática, sino también, en la caracterización del tejido con parámetros físicos, de tal modo que se tenga mayor información que a su vez, coadyuvar en nuevas alternativas de tratamiento y prevención.

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is the response to harmful stimuli to the liver and consists of the progressive deposition of excessive extracellular matrix. It is reversible if the cause of the disease is treated and eradicated and also if the lesions are not too serious, meaning that there is a timely diagnosis and effective treatment, then the liver can regain its normal structure. However, detecting the disease at an early stage is unlikely since a patient presents symptoms when they are in the last phase: liver cirrhosis.

The method of choice to determine the degree of fibrosis is the liver biopsy consisting of taking a sample and its subsequent morphological analysis by observation under a microscope. This sample corresponds to 1 / 50,000 of the liver. To evaluate the biopsy, multiple scales have been proposed that evaluate different histopathological aspects, the most frequently used is Metavir. According to this scale, the fibrous grade is defined in four phases: F1, portal fibrosis (mild); F2, portal fibrosis with septa (moderate); F3, fibrosis with numerous septa and incomplete regeneration nodules (severe); F4, cirrhosis, with complete regeneration nodules. This method presents several problems such as inter-observer variability, low resolution between the intermediate degrees of fibrosis thus limiting this to be a qualitative test. Recent therapies and diagnostic tools for this problem require methods to establish a degree of progression in the disease according to quantitative aspects. There is uncertainty in the diagnosis that affects the imprecision in the calibration of new techniques.

Due to the above, the general objective of this study was to evaluate the thermal behavior of fibrous tissue with the use of a heat flux sensor. As well as the identification of the fibrosis phase of the hepatic tissue applying the logic-combinatorial approach of pattern recognition theory.

To study the disease, hepatic fibrosis was induced in a rat model of the Wistar strain with Carbon Tetrachloride (CCl₄). A hepatectomy was performed in the individuals of the model according to the established induction times to collect the tissue samples. A methodology was established for the evaluation of progression of fibrosis in the liver samples, based on the Metavir scale, supported by three observers. Measurements were made on the samples to determine their thermal behavior, using a heat flow sensor. Also, a morphometric tool is applied for the quantification of histopathological findings that send a quantitative measure on a continuous scale of the problem that was studied.

Finally, applying the logic-combinatorial approach of pattern recognition theory, a similarity

function was designed using seven quantitative characteristics, allowing the description of the individuals and the classification of the stages of fibrosis through a more descriptive integral of hepatic samples.

Heat flow measurements showed a relationship between the progression of liver fibrosis in rats and the thermal properties of hepatic tissue where, the greater the progression of the disease, the greater the heat flows in the sample. However, this relationship was found only in samples with strong diagnoses of fibrosis, so it is desirable to increase the sensitivity of the heat flow sensor to continue with the evaluation of this methodology as a tool for the analysis of liver samples. The quantification of histopathological findings shows that the amount of fibrosis has a progressive increase according to the evolution of the disease. In the results of the steatosis quantification, the percentages were limited between 0.06 and 0.87% for 15 of the 16 individuals in the rat model. Only an individual was counted an atypical value of 9.76%. No correlation was found between this condition and the other acquired variables.

The combinatorial-logic approach was applied under two schemes, one where the definition of the classes was made with the diagnosis of the Metavir scale finding a 25% success in this classification and as a result of applying the second scheme, with the percentage of fibrosis as classifier, a 75% success rate was obtained. Although the sample was limited to 16 individuals, which may not be conclusive when using this approach in an rat model, the results point out that the variable Metavir, initially used to define classes, is ordinal and qualitative, and intended to differentiate individuals defined with quantitative physical variables; that is why a more favorable classification result was obtained when the percentage of fibrosis was used.

The results of this work represent a contribution, not only for the development of tools for the diagnosis of hepatic fibrosis, but also, in the characterization of the tissue with physical parameters, in such a way that it has more information for the development of new alternatives of treatment and prevention.

INTRODUCCIÓN

El hígado, que es el órgano más voluminoso del cuerpo humano, desempeña funciones vitales indispensables para nuestro organismo, estas son la desintoxicación, la síntesis y el almacenamiento. Actúa como un filtro que recoge y elimina numerosas toxinas presentes de forma natural en los desechos producidos por nuestro organismo, como el amoníaco, o toxinas que ingerimos, como el alcohol. Se encarga del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, secretando la bilis, elemento esencial para nuestra digestión; además, evita hemorragias a través de un proceso de coagulación. El hígado es también un contenedor de vitaminas (A, D, E, K) y glucógeno (hidratos de carbono) almacenando energía en forma de azúcar, que se pone a disposición de nuestra organización funcional. Toda afección crónica del hígado tendrá como resultado una cicatriz fibrosa del tejido hepático, esta impide el buen funcionamiento del órgano y no presenta ningún síntoma específico. La fibrosis hepática constituye un proceso de cicatrización que sustituye las células del hígado dañadas; es reversible si se trata y erradica la causa de la enfermedad y si las lesiones no son demasiado graves, en ese caso, el hígado puede recuperar una estructura normal [1].

La cirrosis hepática es una causa importante de la pérdida de salud global, pero en gran medida prevenible y subestimada; ha surgido como una de las principales causas de la carga sanitaria mundial. Según el estudio *Global Burden of Disease 2010*, la cirrosis hepática causó 31 millones de discapacidades (*DALY, Disability Adjusted Life Years*), o 1.2% de los DALY globales, y un millón de muertes, o el 2% de todas las muertes en todo el mundo en ese año.

El conocimiento de las bases celulares y moleculares de la fibrosis ha aumentado considerablemente en las dos últimas décadas, gracias a la disposición y desarrollo de equipo de instrumentación biomédica, que permite profundizar en el estudio de la enfermedad. Se han descrito factores ambientales y genéticos que influyen en su progresión, así como métodos que permiten estimar el grado de fibrosis. Pero, a pesar de ser considerada un problema de salud pública que requiere acciones claras para prevenirla, no se dispone de la suficiente información acerca de las características epidemiológicas y clínicas de la fibrosis hepática [2,3]. Esta situación limita las posibilidades de intervención, preventivas y asistenciales, más adecuadas para la eliminación o el control de los principales factores causales de esta enfermedad.

En la actualidad, los sensores tienen un papel fundamental en la implementación de múltiples sistemas de uso común en la vida cotidiana; permiten conocer variables de un entorno y por lo tanto resultan indispensables en el desarrollo de técnicas de instrumentación, procesos experimentales y nuevas tecnologías. El área de los sensores enfoca su utilidad a determinar parámetros importantes en la experimentación, control y monitorización de diferentes procesos y en la caracterización de los materiales. Particularmente, el área biomédica demanda nuevas técnicas para el diagnóstico temprano, tratamiento y profundización en el concomitamiento de diversas patologías.

Dado que la composición del tejido hepático y las propiedades físicas cambian conforme el proceso de fibrosis avanza, algunos métodos cuantitativos han sido desarrollados para obtener información y caracterizar diferentes tejidos, basados en la medición de alguna propiedad física. Se sabe que el estudio del estado de un material biológico puede realizarse por medio del análisis de sus propiedades termo-físicas. Las características térmicas, determinadas por los atributos físicos de los tejidos biológicos, pueden asociarse con alteraciones estructurales y de composición causadas por procesos degenerativos. Determinar la importancia y relevancia de las diferentes variables que definen el estado de un órgano, una muestra biológica o un tejido, es vital para profundizar en el estudio y conocimiento de algunas patologías, como la fibrosis hepática. La implementación de diferentes sensores en el área de la óptica, la electrónica, y la térmica, ha logrado determinar propiedades físicas de diferentes tejidos, sin embargo, esta metodología no se ha utilizado hasta ahora, para la caracterización de la evolución de la fibrosis hepática.

Por lo anterior, dada la creciente necesidad de estudiar a profundidad, con métodos cuantitativos, la progresión de la lesión hepática debido a la fibrosis, se propone el presente trabajo cuyo objetivo general es clasificar el tejido hepático, determinando las características térmicas de las muestras, alteradas en composición y estructura por fibrosis hepática, para identificar el grado de avance de esta enfermedad, de manera no destructiva y con alta sensibilidad por medio de un sistema de medición basado en la foto-deflexión. Conocer los valores de conducción de calor en una muestra de tejido hepático, permitirá diferenciarla y clasificarla en una de las etapas de fibrosis.

Este proyecto se desarrolló, en colaboración con el Grupo de Sensores Ópticos y Eléctricos del CCADET-UNAM, y el tratamiento y crecimiento del modelo animal, así como el análisis y pruebas histopatológicas se llevaron a cabo en la Unidad de Medicina Experimental, UNAM del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”.

La tesis está organizada en cuatro capítulos. En el primero se presentan los antecedentes relacionados con la descripción de la fibrosis hepática como un padecimiento clínico, el método para su estadificación y su epidemiología en México. En el segundo capítulo se aborda la posibilidad de caracterizar tejidos biológicos por medio de sus propiedades termo-físicas y se presenta el principio de funcionamiento del sensor de flujo de calor, describiendo el marco teórico relativo a la transferencia de calor y a las propiedades térmicas de los materiales; se explica también el enfoque lógico combinatorio que fue implementado para la clasificación de las muestras. En el tercero, se detalla la metodología utilizada para llegar a los objetivos propuestos, esta incluye el crecimiento de un modelo animal de inducción de fibrosis y la toma de muestras hepáticas, el diagnóstico de fibrosis, la caracterización por medio del sensor, la cuantificación de hallazgos histológicos y el diagnóstico de fibrosis utilizando el enfoque lógico combinatorio. Finalmente, en el capítulo 4 se presentan los resultados de haber seguido la metodología descrita, con dos variantes para la aplicación del algoritmo lógico combinatorio para la clasificación.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. ALTERACIONES HEPÁTICAS: FIBROSIS Y CIRROSIS

1.1.1 Fibrosis Hepática

Las enfermedades crónicas del hígado, cualquiera que fuera su etiología (infección crónica por virus B y C, abuso del alcohol, trastornos del metabolismo como hemocromatosis, déficit congénito de alfa-1-antitripsina, autoinmunidad, etc.), que cursan con un proceso inflamatorio crónico, producen una acumulación progresiva de fibras de colágeno en el parénquima hepático llamada fibrosis, cuyo estadio final es la cirrosis hepática. La progresión de la fibrosis hepática altera la arquitectura normal del hígado [4].

La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de matriz extracelular en el hígado. Para llegar a ella, hacen falta una sucesión de eventos que incluyen el proceso inflamatorio de la célula hepática y la muerte o daño de los hepatocitos. Es entonces cuando se liberan señales que activan el sistema inmunológico, haciendo que arranque el proceso de reparación, es decir, la lesión o necrosis de los hepatocitos estimula la liberación de citocinas, factores de crecimiento y otras sustancias. A su vez, estos mensajeros químicos activan las células estelares hepáticas, células de apoyo, que junto con otros tipos de estructuras, comienzan a producir colágeno. Todas estas sustancias se depositan en el hígado, provocando la acumulación de matriz extracelular. Este proceso de evolución de la patología se ilustra en la Figura 1.

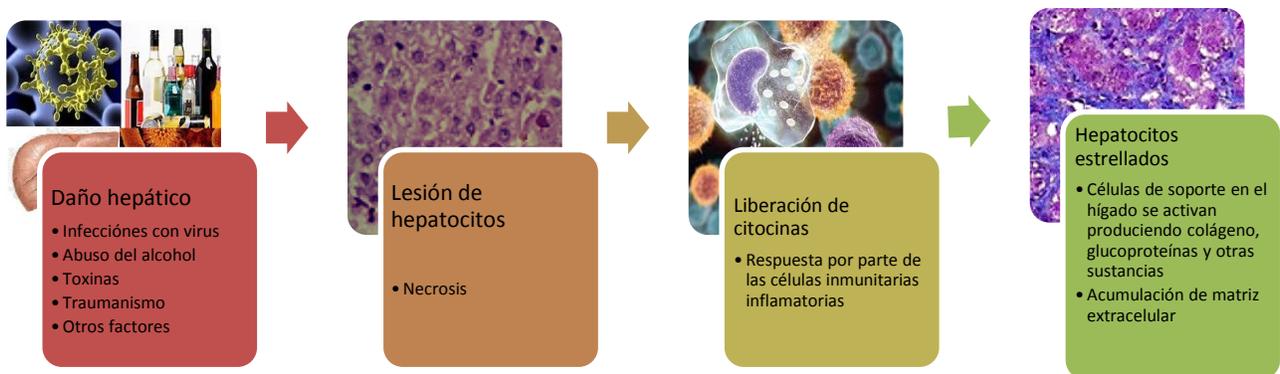


Figura 1. Evolución del daño hepático

En un tejido sano, existe equilibrio entre la síntesis y la degradación de la colágena. La fibrosis aparece cuando se altera ese equilibrio, es decir, cuando la colágena se acumula a un ritmo más rápido del que puede ser degradada por el hígado [5]. Con el transcurso del tiempo y la continuidad del fenómeno inflamatorio, la acumulación de la colágena aumentará en el hígado, lo que constituirá la fibrosis [6].

La fibrosis hepática no se desarrolla a la misma velocidad en todos los pacientes y de hecho en algunas personas con hepatitis C o B, permanece estable. Hay varios factores que influyen en la progresión de la fibrosis: el proceso avanza con más rapidez en los hombres que en las mujeres, y también en personas de más edad, especialmente a partir de los 50 años. La progresión no parece lineal, es decir, parece que se acelera en las etapas más avanzadas de la enfermedad. Además, se ha demostrado que la depresión del sistema inmunitario también agudiza la fibrosis. El abuso del alcohol está claramente asociado a un empeoramiento de la fibrosis y la cirrosis. Algunos estudios indican que la esteatosis (hígado graso) y la resistencia a la insulina, están vinculadas a una progresión más rápida y un grado más avanzado de fibrosis.

El tratamiento de la cirrosis depende de la causa de la enfermedad y de las complicaciones presentes. Los alcances del tratamiento son únicamente enlentecer el avance del tejido cicatricial en el hígado y prevenir o tratar las complicaciones de la enfermedad.

1.1.2. Evaluación del Grado de Fibrosis Hepática

Como se dijo anteriormente, conocer el grado de fibrosis hepática es útil para el pronóstico de una enfermedad hepática y evaluar la estrategia de su tratamiento. Existen varias pruebas para evaluar el alcance de la fibrosis, la más común es la biopsia de hígado percutánea. Este procedimiento ambulatorio consiste en introducir una aguja de biopsia a través de las costillas hasta el hígado. Suele ir precedido de una ecografía para detectar posibles nódulos y localizar una sección del hígado adecuada para extraer una pequeña cantidad de tejido hepático. La muestra de tejido se extrae del hígado y es examinada por un patólogo que elabora un informe sobre la salud del hígado.

Este método presenta problemas como variabilidad inter-observador, baja resolución entre los grados intermedios de fibrosis, es una prueba cualitativa y sobre todo, es una prueba invasiva. Si bien la biopsia hepática es un método de diagnóstico que presenta múltiples limitaciones, sigue siendo considerado el mejor para el diagnóstico y confirmación de la fibrosis, sobre todo en casos en los que las pruebas de laboratorio e imagen no son concluyentes [7].

Una de las escalas más utilizadas para evaluar el hígado después de haber tomado una biopsia es la *Metavir* [8]. Esta escala, desarrollada inicialmente para evaluar los estadios de fibrosis en individuos con hepatitis crónica, también puede usarse en pacientes con fibrosis para evaluar el avance de la patología de acuerdo con una clasificación de 5 estadios que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Escala Metavir para clasificar grados de fibrosis

Grados de fibrosis	Código
Sin fibrosis	F0
Fibrosis portal	F1
Fibrosis portal con septos	F2
Numerosos septos	F3
Cirrosis	F4

La fibrosis, componente esencial de las enfermedades hepáticas crónicas, a largo plazo produce complicaciones como la cirrosis. La cirrosis es la etapa final de las enfermedades crónicas del hígado, en la cual existe una distorsión generalizada del órgano. En 1977, expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), partiendo de los datos morfológicos, consideraron los siguientes criterios para definir la cirrosis [9]:

1. Que el proceso sea difuso para excluir lesiones locales o focales;
2. Que exista necrosis, con lo que queda excluida la fibrosis hepática congénita;
3. Que exista regeneración nodular y fibrosis difusa, quedando excluida la hiperplasia nodular regenerativa y
4. Que haya distorsión del patrón arquitectural y alteración vascular.

Estos dos últimos criterios son importantes, porque constituyen la base del diagnóstico histopatológico en las biopsias y porque motivan, en gran medida, la fisiopatología de la enfermedad.

En la evolución de la enfermedad, podemos distinguir dos fases: cirrosis compensada y descompensada. Esta diferenciación tiene en cuenta que los pacientes hayan o no desarrollado las complicaciones propias de la enfermedad. Mientras se encuentre compensada, los pacientes pueden no presentar ningún síntoma y vivir años. En esta fase hay un importante número de pacientes que todavía no han sido diagnosticados. Asimismo, los pacientes con cirrosis compensada tienen una supervivencia parecida a la de la población general.

1.1.3 Epidemiología de la Fibrosis y de la Cirrosis en México

La fibrosis hepática es un padecimiento con una alta tasa de morbilidad y mortalidad en su etapa final que es la cirrosis. Constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo. En algunos países de América Latina, la cirrosis hepática ocupa entre el 3° y 6° lugar como causa de muerte general [10]. En México, la morbilidad por cirrosis hepática en 2005 fue de 11.7 casos por cien mil habitantes y en 2006 de 12.4, lo que representa un incremento del 6%. La distribución por sexo de esta enfermedad muestra que la población masculina es más afectada al concentrar el 67.5% del total de casos a nivel nacional; de acuerdo con los datos epidemiológicos, se ha observado que esta situación puede estar relacionada con el mayor consumo de alcohol entre los hombres. Por lo que respecta a la mortalidad por cirrosis hepática, tanto en 2001 como 2005, esta causa ocupaba la posición número tres dentro de las principales causas de muerte en el país. Entre los hombres, también ocupa el tercer lugar como causa de muerte, mientras que en mujeres se ubica como la séptima causa en 2005. Por grupos de edad, la mortalidad por cirrosis hepática ocupó el sexto lugar en 2005 dentro de las principales causas de muerte para la población en edad post-productiva (mayores de 65 años), y para el grupo de 15 a 64 años ocupa la segunda posición dentro de las principales causas de muerte. En 2006, en el país la tasa de mortalidad estandarizada para esta causa fue de 28.9 defunciones por cien mil habitantes, observando que el riesgo de morir por esta causa entre los hombres es 3 veces mayor que el de las mujeres (mortalidad de 45.2 en hombres y de 13.9 en mujeres) [11].

Aproximadamente el 90% de las causas de cirrosis hepática en países occidentales son el abuso de alcohol, la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés, NonAlcoholic Fatty Liver Disease) y la hepatitis crónica vírica. A escala mundial, la hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), con más de 400 millones de enfermos infectados, representa la etiología más importante [12]. La causa de la cirrosis permanece desconocida en cerca del 10% de los casos (cirrosis *criptogénica*) y aproximadamente el 70% de estos casos, se cree que en la actualidad están relacionados con la NAFLD, dentro del contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, mientras que el resto puede estar en relación con mecanismos autoinmunes [13]. En este sentido, tomando en cuenta que la obesidad es considerada uno de los principales factores de riesgo para NAFLD y que la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) determinó que México es el país con el mayor nivel de obesidad

en el mundo, nos enfrentamos ante una enfermedad frecuente pero poco diagnosticada para la cual, la población mexicana tiene un alto riesgo de incrementar la frecuencia de incidencia.

En el caso del alcohol, se ha identificado que los factores de riesgo que aumentan la posibilidad de desarrollar cirrosis hepática son el consumo riesgoso diario; el consumo de cinco bebidas en hombres o cuatro bebidas en mujeres en el lapso de dos horas; y el consumo de más de 120 g al día. Es importante señalar que el consumo de alcohol como causa de muerte se identifica en el 44% de los casos de cirrosis hepática. En relación con la hepatitis C, la frecuencia de cirrosis hepática por este virus ha ido en aumento. Aproximadamente 150 millones de personas en el mundo están crónicamente infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC) y su prevalencia global estimada para el año 2020 podría aumentar tres veces, debido al número de casos que tenemos en la actualidad, ya que se requieren entre 20 y 30 años de exposición al virus para que aparezca la cirrosis hepática [14].

Por otro lado, en México el costo de la atención de un paciente con cirrosis hepática varía de acuerdo con el grado de severidad de la misma, que generalmente se cataloga como grados A, B y C con base en parámetros clínicos y de laboratorio bien definidos. El costo anual estimado en el servicio público para un paciente cirrótico estadio A es de \$4,296 dólares, en estadio B \$16,950 dólares y en estadio C \$30, 250 dólares [15].

A pesar de los avances importantes en el conocimiento de la fisiopatología de la cirrosis hepática, no se cuenta aún con un tratamiento efectivo que permita su curación. Una opción terapéutica en casos de cirrosis hepática avanzada, es el de ofrecer al paciente la posibilidad de un trasplante de hígado cadavérico. México cuenta con las instalaciones y el personal quirúrgico y médico para hacer que ésta sea una opción viable.

El impacto social y económico de la cirrosis hepática probablemente ha sido desestimado en favor de otro tipo de padecimientos y, a pesar de que ésta es considerada como un problema de salud pública, no se le ha estudiado formalmente en épocas recientes. No se cuenta con suficiente información epidemiológica acerca de esta enfermedad en la población mexicana, y la que existe se encuentra habitualmente fragmentada. De igual manera, no existe un análisis que permita establecer pautas adecuadas de prevención y tratamiento, como la evaluación de los métodos de diagnóstico, el diseño de campañas de prevención y el establecimiento de programas de trasplante de hígado. Por otro lado, informes preliminares indican que podría haber diferencias epidemiológicas importantes de la enfermedad, según el género y los factores de riesgo, aparte de las ya conocidas en relación con

las diversas áreas geográficas o con el tipo de bebida que consumen los pacientes con cirrosis alcohólica.

El conocimiento epidemiológico de esta enfermedad puede ser de gran valor para establecer medidas de prevención y proponer alternativas de tratamiento. Las contribuciones en el avance de las herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, con el consecuente desarrollo de tecnologías para la salud, dependen totalmente del dominio de la generación de nuevo conocimiento sobre las características de una patología y su evolución. En este sentido, si se cuenta con más información acerca de las características y estado de un órgano o tejido cuando es afectado por una enfermedad, será posible mejorar las metodologías de diagnóstico, las herramientas para el tratamiento clínico y las posibles alternativas de prevención, ante padecimientos comunes que afectan a la población mundial, como es el caso de la cirrosis hepática.

Por todo lo anterior, es de gran importancia profundizar en el conocimiento acerca de cómo el tejido hepático se ve afectado y modificado por la progresión de la fibrosis hepática. En este sentido, definir cuantitativamente las características térmicas del hígado conforme la enfermedad va progresando, será una herramienta valiosa para el estudio de este padecimiento. Por ello, es necesario desarrollar y poner en marcha una técnica no destructiva, con alta sensibilidad y repetibilidad, que permita la caracterización de tejido biológico. De este modo, será posible profundizar en la comprensión de la fibrosis hepática y su desarrollo.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES POR MEDIO DE SUS PROPIEDADES TERMO-FÍSICAS

Existen estudios que reportan propiedades térmicas de tejidos animales y humanos medidos con distintas técnicas. La mayoría de estos estudios, usan técnicas de medición invasivas y destructivas que requieren periodos prolongados de calentamiento, exponiendo el tejido analizado a temperaturas superiores a los 45°C [16, 17]. El uso de los métodos propuestos y el manejo de los materiales biológicos requieren de repeticiones extendidas, en donde las muestras son expuestas a un ambiente con variaciones de temperatura y humedad que degradan significativamente el estado del material biológico. Se han encontrado también trabajos que buscan caracterizar propiedades térmicas con métodos no destructivos y no invasivos, como la determinación de la difusividad térmica en materiales biológicos sin contacto con la aplicación de la técnica de imágenes por infrarrojo y mediciones obtenidas a partir del método de calentamiento sinusoidal [18, 19]. En general, se distinguen inconvenientes como la necesidad de implementar sistemas de medición costosos y complejos. Otro inconveniente es que en algunos estudios, se observan también mediciones con falta de repetibilidad por efectos no controlados en la conducción de calor [20]. Por ejemplo, existen sistemas de sensado para la medición de flujo de calor basados en termopares y termopilas [21, 22], que efectúan una medición de temperatura en varios puntos de una muestra, lo que implica disponer de un corte de material biológico con dimensiones específicas, para obtener de manera indirecta el parámetro de interés. El uso de termopares para medir temperatura se ve limitado por efectos indeseables e inherentes al sistema que se desea medir, ejemplo de ello es la radiación de interferencia.

En el caso del tejido hepático, existen métodos desarrollados para caracterizar alguna propiedad térmica, basados en calorimetría diferencial de barrido (*Modulated-differential scanning calorimetry, mDSC*), esta metodología permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia o material, cuando es sometida a una modulación de temperatura en un intervalo determinado, durante un lapso específico [23]. Los trabajos basados en la técnica de mDSC [23, 24] reportan resultados con diferencias representativas obtenidas a partir de los 70°C y hasta los 90°C, lo que implica que esta metodología de medición es destructiva para el tejido analizado, ya que existe

un proceso de degradación en las muestras cuando se someten a estas temperaturas. Aunado a esto, la determinación de propiedades térmicas por calorimetría requiere de otras mediciones paralelas, por ejemplo densidad másica y/o conductividad térmica, e involucra una radiación directa, lo cual modifica la estructura y la composición del material biológico y por ende, sus propiedades térmicas naturales.

La caracterización del tejido hepático por medio de atributos físicos, como sus propiedades térmicas, es un método útil para el estudio de la fibrosis en sus diferentes fases, ya que este padecimiento altera la composición y estructura natural del hígado. El estudio de propiedades térmicas de distintos materiales es un tema estudiado ampliamente y existe una gran variedad de métodos para llevar a cabo estas mediciones, la elección del método más adecuado depende de la especificidad y la precisión que se requiera para los resultados. Sin embargo, la complejidad de los sensores reportados varía dependiendo del transductor utilizado. Por esto, es necesario desarrollar un sistema capaz de medir y caracterizar este tejido permitiendo encontrar diferencias en las características térmicas de cada muestra. Es de notar que no se ha encontrado reportado algún trabajo que hable del uso de un sensor óptico para la caracterización de materiales biológicos que sea sencillo, no invasivo y no destructivo. En este trabajo se plantea el uso de un sensor de flujo de calor, basado en fibra óptica, para poder determinar el comportamiento térmico de muestras hepáticas afectadas por fibrosis.

2.1.1. Principio de Funcionamiento del Sensor de Flujo de Calor

El sensor de flujo de calor se basa en la aplicación de un pulso de calor en la frontera de un medio, por el que se transmite un haz de luz láser. Este pulso de calor genera un gradiente térmico o campo de temperatura, T_x , en el medio que defleca el haz un cierto ángulo θ , dependiente de las condiciones en la frontera contraria a la que se le aplicó el escalón de temperatura. Se tiene entonces un sistema mostrado en la Figura 2, en el que existen tres medios contiguos. El calor, Q , es aplicado en un Medio 0 externo, mientras que la onda térmica se propagará por el Medio 1: un bloque de acrílico, con un valor de conductividad conocida. La impedancia térmica entre el Medio 1 y el Medio 2 será definida por la relación entre las propiedades térmicas de cada medio.

Inicialmente, se asume un flujo de calor tal que el gradiente de temperatura varía únicamente a lo largo de la dirección x (constante en el plano y - z). Si el haz óptico se transmite paralelamente respecto de la superficie del bloque, éste se deflectará hacia la región más fría, indicando de esta

manera la dirección del flujo de calor [25]. Esta configuración del sensor permite abordar el problema del calentamiento desde el punto de vista de la propagación de una onda térmica, en donde, al llegar al Medio 2, una porción del calor aplicado se propaga en éste y otra se refleja nuevamente al Medio 1. La onda reflejada contribuirá también al gradiente térmico en el medio.

Una onda térmica es la respuesta de un medio a una fuente de calentamiento periódico. Cuando una fuente de energía incide sobre la superficie de un sólido opaco, el sólido absorberá parte de esta energía y producirá un flujo localizado de calor. Si la fuente de calor es modulada, un flujo periódico es producido por la muestra. El resultado de este flujo de calor se llama onda térmica. Las ondas térmicas pueden ser producidas en el interior de un material que haya absorbido energía. Estas ondas interactuarán con las características térmicas de un material de una manera análoga como la luz interacciona con las características ópticas en los procesos de dispersión, reflexión y refracción en las interfaces. De esta manera, las ondas térmicas pueden ser usadas para la evaluación y mapeo de materiales [26].

Cada medio de la Figura 2 se caracteriza por tener propiedades térmicas que dependen de su conformación física. Tales propiedades (efusividad e , difusividad α , conductividad k , resistencia R), intervienen de manera independiente en la propagación de calor. Otras cualidades físicas que también afectan al campo son las dimensiones del medio de propagación (L, d) y la distancia a la cual se propaga el haz (x). Los coeficientes de reflexión (η) regulan la intensidad en la propagación del calor a través del medio analizado. Al final, la onda térmica realizará un número finito de reflexiones en el Medio 1 y será de esta manera que el campo T_x se propague dentro del bloque. A continuación se hace una breve descripción de las propiedades térmicas de los medios considerados en el diseño del sensor.

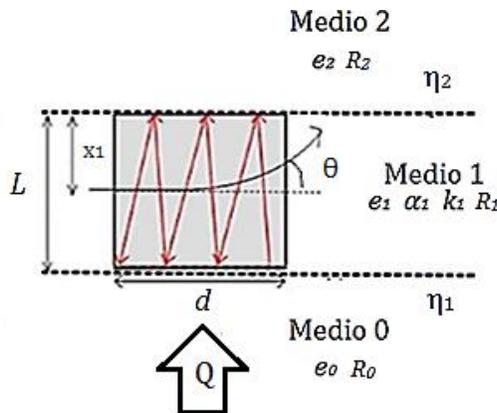


Figura 2. Esquema del sensor de flujo de calor, considerando el modelo de onda térmica

2.1.2. Propiedades Termo-Físicas de los Materiales

Las propiedades térmicas de los materiales, en general, se denominan propiedades termo físicas e incluyen dos categorías: las propiedades de transporte y las termodinámicas. Las propiedades de transporte incluyen coeficientes de la variación de difusión como la conductividad térmica (para la transferencia de calor). Las propiedades termodinámicas, por otro lado, se relacionan con el estado de equilibrio de un sistema [27].

Conductividad térmica. Es una propiedad de los cuerpos debida al fenómeno de conducción y puede definirse como la cantidad de calor que atraviesa un cuerpo o superficie de espesor unitario [28]. Es una propiedad de transporte que provee una indicación de la velocidad a la cual la energía es transferida por el proceso de conducción; cuanto más rápido se muevan las moléculas, estas transportarán energía más rápido. Comúnmente se representa con la letra k y sus unidades en el Sistema Internacional se describen en la expresión (1):

$$k = \left[\frac{W}{K \cdot m} \right] \quad (1)$$

En los sólidos no metálicos, el orden de magnitud de la conductividad térmica se encuentra alrededor de los 10^{-1} [W/K·m], mientras que para los metales muy conductores oscila entre los 10^2 [W/K·m]. Las impurezas presentes en los materiales pueden provocar una variación en su conductividad térmica de hasta el 75% [28].

Efusividad térmica. Es la magnitud que cuantifica la capacidad de un material para intercambiar calor con el entorno en condiciones transitorias por ello se considera como una medida de la impedancia térmica. Expresa la capacidad de un material para absorber o restituir un flujo de calor o potencia térmica [27]. La expresión que la describe es:

$$e = \sqrt{\rho ck} \left[\frac{J}{m^2 K s^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (2)$$

Donde ρ es la densidad del material, c es el calor específico y k es la conductividad térmica.

Cabe señalar que el flujo de calor es proporcional a esta propiedad en condiciones transitorias, en contraste del estado estacionario en donde es proporcional a la conductividad térmica [25].

Difusividad térmica. Es una propiedad específica de cada material para caracterizar conducción de calor en condiciones no estacionarias. Este valor describe cuán rápido un material reacciona a un cambio de temperatura, y, por lo tanto, está asociada con el tiempo en que el que se

alcanza el equilibrio térmico [29]. Esta propiedad depende de la conductividad térmica k , la densidad de material ρ y calor específico c :

$$\alpha = \frac{k}{\rho c} \left[\frac{m^2}{s} \right] \quad (3)$$

El calor que se propaga en los medios y sus fronteras sigue diferentes procesos de transferencia, estudiados a continuación.

Resistencia térmica. Es posible hacer una analogía eléctrica con la transferencia de calor por conducción. El análogo de la tasa de transferencia de calor, \dot{Q} , es la corriente, el de la diferencia de temperatura, $T_1 - T_2$, es la diferencia de voltaje. Desde esta perspectiva, el bloque se comportaría como una resistencia pura en la transferencia de calor y podemos definir la relación:

$$\dot{Q} = \frac{T_1 - T_2}{R} \quad (4)$$

Donde R representa la resistencia térmica, expresada en la ecuación 4. Como se observa, esta propiedad de los materiales es proporcional a la longitud del bloque e inversamente proporcional al área de la sección transversal y a la conductividad térmica del material.

$$R = \frac{L}{kA} \quad (5)$$

El concepto de un circuito de resistencia térmica permite un fácil análisis de problemas como el de un bloque mixto (compuesto de superficie plana de transferencia de calor). En la configuración mostrada en la Figura 3, formada por un bloque compuesto de dos materiales (1 y 2), el flujo de calor es constante con x . El arreglo se considera entonces como resistencias en serie, por lo que la resistencia total de la configuración será igual a la suma de las resistencias de cada material, como se expresa en la ecuación:

$$R_{TOTAL} = R_1 + R_2 \quad (6)$$

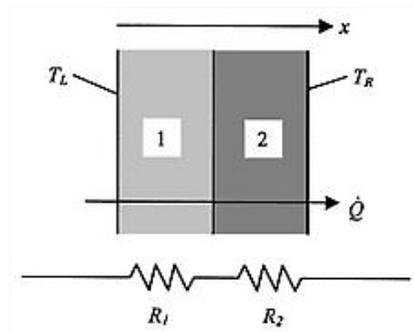


Figura 3. Flujo de calor a través de un bloque compuesto (resistencias térmicas en serie)

Si T_L es la temperatura en la frontera izquierda y T_R en la frontera derecha, la transferencia de calor está dada por la igualdad:

$$\dot{Q} = \frac{T_L - T_R}{R_{TOTAL}} = \frac{T_L - T_R}{R_1 + R_2} \quad (7)$$

La igualdad 7 expresa la transferencia de calor en estado estable. Sustituyendo la expresión 5 en la ecuación anterior, tenemos que:

$$\dot{Q} = (T_L - T_R) \frac{k_{TOTAL} A}{L} \quad (8)$$

2.1.3 Proceso de Trasterencia del Calor.

El calor se transfiere básicamente por tres procesos distintos: conducción, convección y radiación. En un medio sólido a temperaturas no muy altas, el mecanismo dominante es la conducción [30].

Considerando una barra de material sólido, como el mostrado en la Figura 4 el mecanismo principal de propagación de calor es la conducción; la transferencia de calor, \dot{Q} , será una función de la diferencia de temperaturas en los extremos de la barra y de la geometría y las propiedades del material, tal que [31]:

$$\dot{Q} = f(T_A, T_B, \text{geometría de la barra, propiedades del material})$$

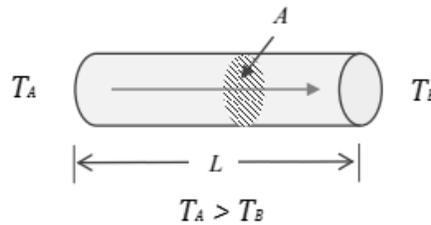


Figura 4. Transferencia del calor \dot{Q} , a lo largo de un material, de longitud L

Por otro lado, ya que \dot{Q} depende de la diferencia de temperaturas, si $T_A - T_B = 0$, entonces la transferencia de calor será también igual a cero. Esta dependencia con la diferencia de temperatura puede ser expresada, a partir de las consideraciones físicas, como se muestra en la ecuación 9:

$$f(\Delta T) = f(0) + \left. \frac{\partial f}{\partial (\Delta T)} \right|_0 \Delta T + \dots \quad (9)$$

Sabemos que $f(0) = 0$, derivado de la evaluación en $T_A = T_B$ (equilibrio térmico). Además, $\dot{Q} > 0$ si $T_A > T_B$. Por último, a medida que aumenta la longitud, L , de la barra, \dot{Q} debe hacerse más pequeño. Todo ello conduce a la generalización:

$$\left. \frac{\partial f_2}{\partial (T_A - T_B)} \right|_{T_A - T_B = 0} = \frac{kA}{L} \quad (10)$$

En la ecuación 10, k es un factor de proporcionalidad, función del material y la temperatura; A es el área de la sección transversal y L es la longitud de la barra. En el límite para cualquier diferencia de temperatura ΔT a través de una longitud Δx , tanto L , como ΔT tienden a cero, por lo que podemos establecer la ecuación 11 [32]:

$$\dot{Q} = kA \frac{(T_A - T_B)}{L} = -kA \frac{(T_B - T_A)}{L} = -kA \frac{dT}{dx} \quad (11)$$

La expresión 11 se conoce como la Ley de Fourier, donde \dot{Q} es la transferencia de calor a través del área, A , transversal al eje de la muestra (Figura 3), dT/dx es el gradiente térmico y k es la constante de conductividad térmica de la barra. Considerando el elemento infinitesimal, de longitud dx ilustrado en la Figura 5, la temperatura del mismo en un dado instante t es $T(x,t)$. Más usualmente, se define la transferencia de calor por unidad de área como se muestra en la expresión (11).

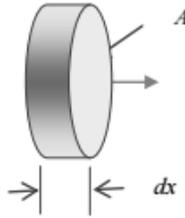


Figura 5. Transmisión de calor a través de un elemento de materia de espesor infinitesimal dx

$$\dot{q} = \frac{\dot{Q}}{A} \quad (12)$$

En la ecuación (12), \dot{q} conocida como flujo de calor y sus unidades son $[\text{W}/\text{m}^2]$ [28]. La expresión (12) puede reescribirse en términos del gradiente térmico:

$$\dot{q} = -k \frac{dT}{dx} \quad (13)$$

Donde, la constante de proporcionalidad, k , es la conductividad térmica, ρ y c a la densidad y calor específico del material del que está hecha la barra, respectivamente.

Del balance de energía tenemos:

$$\frac{dQ}{dt} = (\rho A dx) c \frac{dT}{dt} = -k \cdot A \left[\left. \frac{dT}{dx} \right|_x - \left. \frac{dT}{dx} \right|_{x+dx} \right] \quad (14)$$

Que puede reescribirse como:

$$\frac{\delta T}{\delta t} = \frac{k}{\rho \cdot c} \cdot \left[\frac{\delta^2 T}{dx^2} \right] \quad (15)$$

O bien:

$$\frac{\delta T}{\delta t} = \alpha \left[\frac{\delta^2 T}{dx^2} \right] \quad (16)$$

Donde $\alpha = k/\rho c$ es la difusividad del material que depende de la conductividad térmica, densidad y calor específico. En el caso tridimensional, esta expresión puede generalizarse como en la expresión (17), que se conoce como ecuación de difusión del calor o ecuación de Fourier-Biot.

$$\frac{\delta T(x, t)}{\delta t} = k \nabla^2 T(x, t) \quad (17)$$

2.1.4 Conducción Unidimensional en Estado Estacionario

Para la conducción de calor unidimensional (cuando la temperatura depende solamente de una variable), es posible elaborar una descripción básica del proceso. De la ecuación de flujo constante de energía, considerando que no hay flujo de masa, se obtiene que $\sum \dot{Q} = 0$ para todas las superficies [33] (no hay transferencia de calor en la parte superior o inferior de la Figura 6).

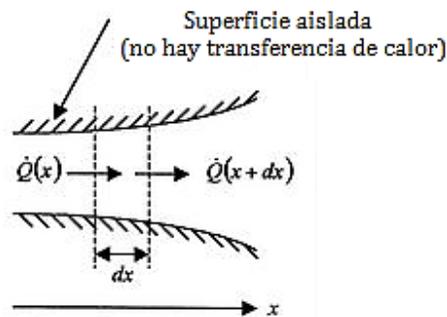


Figura 6. Diagrama para la conducción de calor en una dimensión

Así, la tasa de transferencia de calor en la izquierda (en el eje x) se expresa como:

$$\dot{Q}(x) = -k \left(A \frac{dT}{dx} \right)_x \quad (18)$$

La transferencia de calor en el lado derecho es:

$$\dot{Q}(x + dx) = \dot{Q}(x) + \left. \frac{d\dot{Q}}{dx} \right|_x dx + \dots \quad (19)$$

Usando las condiciones generales para el flujo de calor y las expresiones 18 y 19, se tiene que:

$$\dot{Q}(x) - \left(\dot{Q}(x) + \frac{d\dot{Q}}{dx}(x)dx + \dots \right) = 0 \quad (20)$$

Tomando el límite cuando dx se aproxima a cero tenemos que:

$$\frac{d\dot{Q}(x)}{dx} = 0 \quad (21)$$

O, de otro modo:

$$\frac{d}{dx} \left(kA \frac{dT}{dx} \right) = 0 \quad (22)$$

Si el término k es una constante, es decir, si las propiedades del material son independientes de la temperatura, usando la regla de la cadena, la expresión (22) se reduce a la forma:

$$\frac{d^2T}{dx^2} + \left(\frac{1}{A} \frac{dA}{dx} \right) \frac{dT}{dx} = 0 \quad (23)$$

La ecuación 23 describe el campo de temperatura para la transferencia de calor en el estado estacionario cuasi unidimensional (no existe dependencia con el tiempo) [34].

2.1.5 Transferencia de Calor a través de un Bloque Plano

Para la configuración mostrada en la Figura 7, el área del bloque no es función de la dimensión x , es decir, A es constante. Por lo tanto, la expresión para la transferencia de calor en el estado estacionario cuasi unidimensional (ecuación 24), tomará la forma:

$$\frac{d^2T}{dx^2} = 0 \quad (24)$$

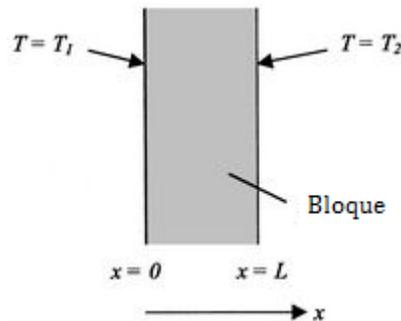


Figura 7. Condiciones de temperatura en las fronteras para un bloque

La ecuación (24) puede ser integrada dos veces, de este modo tenemos que:

$$T = ax + b \quad (25)$$

La ecuación (25) es una expresión para el campo de temperatura, donde a y b son constantes de integración. En la expresión 19, es necesario definir dos condiciones de frontera para determinar a y b . Un conjunto determinado de condiciones de frontera puede ser la especificación de las temperaturas en los dos lados del bloque, como se muestra en la Figura 7, es decir, $T(0) = T_1$, $T(L) = T_2$ [34].

La condición $T(0) = T_1$ implica que $b = T_1$. La condición $T(L) = T_2$ implica que $T_2 = aL + T_1$ o bien, $a = (T_2 - T_1)/L$. Con estas igualdades para a y b , la distribución de temperatura puede escribirse como se muestra en la expresión (26). Esta variación lineal de temperatura es mostrada en la Figura 8, para el caso en el que $T_1 > T_2$.

$$T(x) = T_1 + \left(\frac{T_2 - T_1}{L}\right)x \quad (26)$$

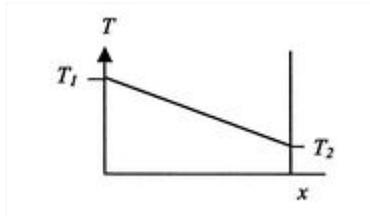


Figura 8. Distribución de temperatura a través de un bloque

El flujo de calor en este sistema está representado por la ecuación (27):

$$\dot{q} = -k \frac{dT}{dx} = -k \frac{(T_2 - T_1)}{L} = \text{constante} \quad (27)$$

2.2 ENFOQUE LÓGICO COMBINATORIO

El Reconocimiento de Patrones (RP) es una disciplina que busca la solución de problemas de clasificación de objetos y fenómenos, mediante la extracción de información (que puede ser física y/o abstracta) y la determinación de factores que inciden sobre los mismos, que permitan establecer propiedades de o entre conjuntos de dichos objetos y fenómenos [35].

En la solución específica de un problema de clasificación a través del RP, el enfoque lógico combinatorio consiste en suponer que los objetos se describen por medio de una combinación de características cuantitativas y cualitativas, y así los distintos valores que tomen pueden ser procesados por funciones numéricas [35]; se basa en la idea de que la modelación del problema debe

ser lo más cercana posible a la realidad del mismo, sin hacer suposiciones que no estén fundamentadas.

El enfoque combinatorio lógico se ha aplicado en varios problemas médicos. Por ejemplo, se propuso un nuevo enfoque para el diagnóstico médico diferencial, basado en el cambio en la caracterización del período de la enfermedad, ofreciendo valores k-admisibles para los signos y síntomas del paciente con el fin de representar diferentes grados en la manifestación de los síntomas, proporcionando así, más flexibilidad para los médicos al hacer un diagnóstico diferencial [36]. También, se ha reportado un nuevo método para la descripción completa del paladar hendido primario y secundario, incorporando elementos relacionados con el paladar, labio y nariz, que también reflejaban la complejidad quirúrgica de este problema médico. Utilizando este método es posible incorporar elementos que no se consideran en otros enfoques y para describir todas las hendiduras que puedan existir [37]. Otro trabajo muestra una función de similitud modelada por este enfoque para comparar la condición de los pacientes con este tipo de malformaciones, la función incluye la importancia de cada variable, así como un factor peso que refleja la complejidad quirúrgica de la hendidura[38], se desarrolló una herramienta computacional para el pronóstico de la rehabilitación de estos pacientes [39]. Es importante decir que este tipo de malformaciones congénitas son tratadas por un equipo de paladar hendido, que abarca cuatro especialidades médicas: cirugía reconstructiva, ortodoncia, terapia del habla y psicología. En este sentido, hay algunas obras que aplican el enfoque combinatorio lógico para modelar cada aspecto. Existe un trabajo [40] que muestra cómo una función de similitud, modelada por este enfoque, puede utilizarse para comparar la condición ortodóntica de los pacientes con fisura labial y/o de paladar y explica cómo esta función permite evaluar el efecto del tratamiento en un solo paciente, proporcionando así valiosos criterios auxiliares para la toma de decisiones médicas en cuanto a la rehabilitación del paciente. También existe un método para evaluar la calidad de habla de los pacientes con paladar hendido [41] por una función de similitud modelada por este enfoque. Este método permite que los especialistas conozcan la calidad oral de sus pacientes durante la rehabilitación y puedan modificar o continuar con la estrategia terapéutica planificada.

Existen otros campos biológicos donde se ha aplicado este enfoque. Este es el caso del análisis citogenético. Citogenética es una rama de la genética que se ocupa del estudio de la estructura y función celular, especialmente de los cromosomas. La identificación de los cromosomas debe realizarse en el proceso de división celular (metafase). En relación con este tema, existe un

modelo matemático que considera tres características relacionadas con la forma cromosómica: tamaño, posición centromérica y restricciones secundarias; se desarrolló una herramienta computacional basada en dicho modelo, esta ayuda en el desarrollo de nuevas técnicas aplicadas en sistemas automatizados para la identificación de cromosomas permitiendo una mayor precisión en esta tarea [42].

El proceso de solución de un problema por medio del enfoque lógico combinatorio contempla una serie de etapas, que si bien presentan un orden consecutivo, no implica que necesariamente tengan que estar todas presentes en el proceso de solución, ya que en algunos casos estas se pueden presentar de manera fusionada o bien simplemente no son requeridas. En la Figura 9, se describe a través de un diagrama de bloques la secuencia de las etapas del proceso de solución.

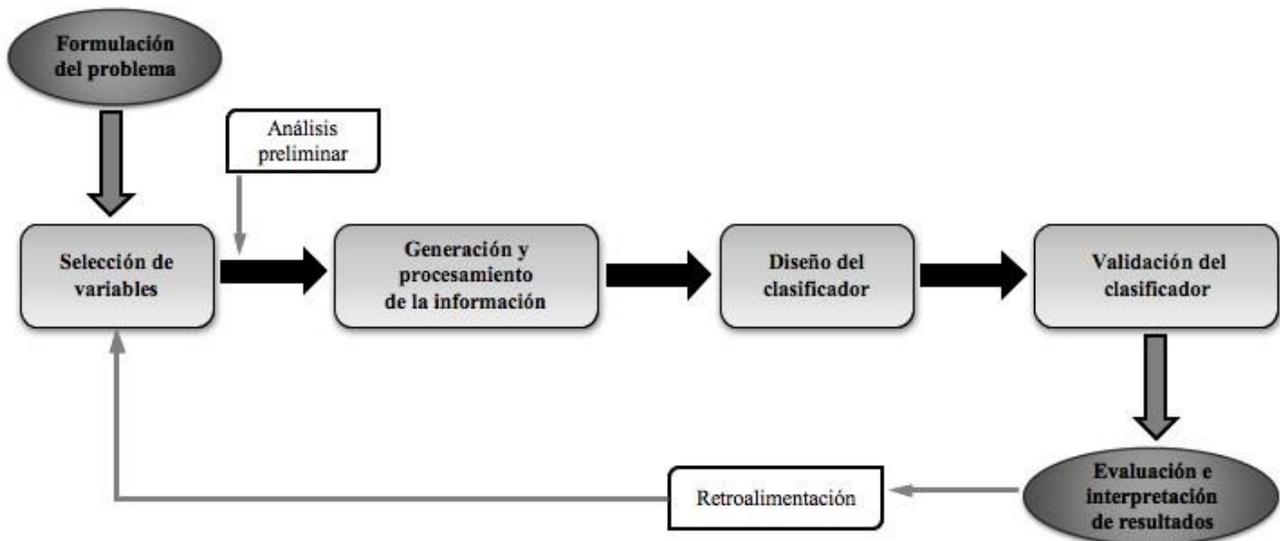


Figura 9. Diagrama de las etapas para la formalización y solución del problema de clasificación

La metodología que se propone para modelar problemas reales de RP, consta en general de cinco etapas. Es necesario decir que cada zona del conocimiento tiene sus peculiaridades y éstas añaden etapas e introducen modificaciones a las que a continuación se describen.

Formulación del problema. En esta etapa, el especialista del área de aplicación expresa en su lenguaje el problema a resolver. En la Tabla 2 se resumen los elementos principales que se deben precisar en esta primera etapa. Los modeladores (matemáticos, ingenieros) deben cuestionar y entender la esencia del fenómeno, si bien en el lenguaje del especialista del área y con el mayor rigor de esas ciencias en particular, pero con la intención de alcanzar un verdadero diálogo, en el que las ideas esenciales subyacentes al problema que se investiga se vean con precisión.

Tabla 2. Información necesaria para la formulación del problema

¿Qué se necesita precisar en la primera etapa de la modelación matemática?
Objetivo de la investigación
Objetos de investigación
Propiedades que caracterizan a los objetos
Características de dichas propiedades
Relaciones entre los objetos y sus propiedades
Hipótesis en que se fundamenta el trabajo a realizar
Fuentes de información
¿Qué información es relevante, si esto se conoce?
¿Cómo se recolecta la información?
¿Cómo se interpreta y manipula la información?
¿Cómo se requiere que se presenten los resultados?
Identificación de ruidos y distorsiones de la información
Valoración de los errores en la información en su entrada, procesamiento y salida
Conjunto de descripciones de los objetos a estudiar

Formalización del problema. En esta etapa es necesario traducir el problema del lenguaje del especialista al lenguaje formal de la matemática, de tal manera que de la etapa anterior queden reflejados los objetivos, objetos de estudio, sus propiedades y su escala de medición, características, relaciones entre objetos y entre propiedades, el concepto de clase de objetos, propiedades de las mismas, los conceptos de analogía, la evaluación de los errores, etcétera. En esta etapa se realiza:

- a) La selección del espacio matemático para la representación de los datos. Se debe trasladar el problema lo más fiel posible, sin efectuar presuposiciones.
- b) La determinación de las funciones que modelarán los criterios de comparación de valores de cada variable así como entre las descripciones de los objetos. Esto es, formalizar el concepto de analogía.
- c) Los requisitos de la solución que el especialista impone a los resultados.
- d) La evaluación del especialista a los datos.

Selección del modo de solución del problema. En esta etapa, el análisis de la muestra de aprendizaje permite detectar errores cometidos en su formalización, analizar la calidad de los datos y su variabilidad para detectar objetos anómalos. Se detecta también la posible necesidad de cambio de

escala, cambio de codificación. Se debe considerar que cualquier herramienta que se use dará una información de salida para una cierta información de entrada, así como evaluar el tratamiento de la ausencia de información.

En muchos problemas, como los de clasificación con aprendizaje y con aprendizaje parcial, hay que dividir la información inicial en dos matrices, una denominada de aprendizaje y otra de control. Los objetos que forman la matriz de aprendizaje (MA) deben ser objetos experimentalmente estudiados; ser del mismo rango (categoría) que los objetos a clasificar; la representatividad se determina por su diversidad (por sus peculiaridades más que por su cantidad). Cuando se trabaja con dos o más clases, debe ser análogo el grado de estudio de los objetos de las diferentes clases. Esta etapa se concluye con la elección del algoritmo particular que se usará [35].

Solución del problema expresado en términos matemáticos. Se obtiene la solución del problema matemático. Se analiza la concordancia del resultado matemático alcanzado con los objetivos del problema.

En el enfoque lógico combinatorio, existen varios métodos propuestos en la etapa de solución del problema. Particularmente, hay un conjunto de algoritmos de clasificación supervisada basados en precedencias parciales, como el caso del Algoritmo de Votación (ALVOT), que permite trabajar con descripciones de objetos en términos de variables cualitativas y cuantitativas simultáneamente, e incluso admite valores desconocidos en las mismas. Este ha sido utilizado en numerosos problemas prácticos en las denominadas ciencias poco formalizadas, como es el caso de la Medicina [35]. Las etapas de este algoritmo se describen a continuación.

1. **Sistemas de conjuntos de apoyo.** Se describe como un subconjunto no vacío de rasgos en términos de los cuales se analizarán los objetos.
2. **Funciones de semejanza.** Cuando comparamos dos descripciones de objetos, la semejanza entre los mismos es una función de lo que ocurre entre las variables que los describen. Estas funciones definen la forma en que serán comparadas las descripciones de los objetos en cuestión. Para ello es imprescindible empezar por determinar la comparación entre los valores de los rasgos en los mismos.
3. **Evaluación por fila dado un conjunto de apoyo fijo.** Una vez definidos el sistema de conjuntos de apoyo y la función de semejanza, se inicia un proceso de contabilización de votación, en cuanto a la medida de semejanza entre las diferentes partes de las

descripciones de los objetos ya clasificados y los que se desean clasificar. Cada fila de la MA se compara con el objeto a clasificar por medio de una función.

4. **Evaluación por clase dado un conjunto de apoyo fijo.** Se totalizan las evaluaciones obtenidas para cada uno de los objetos de MA respecto al objeto que se quiere clasificar. Esta totalización es función de las evaluaciones por filas anteriormente obtenidas.
5. **Evaluación por clase para todo el sistema de conjuntos de apoyo.** Se totalizan las evaluaciones para todo el sistema seleccionado.
6. **Regla de solución.** Se establece un criterio para que, con base en cada una de las votaciones obtenidas en la etapa precedente, se pueda tomar una decisión en cuanto a las relaciones del objeto a clasificar con cada una de las clases del problema. Un ejemplo es la mayoría simple, es decir, el objeto se clasifica en la clase para la cual obtuvo su máxima evaluación.

Análisis e interpretación de los resultados respecto al problema. Los resultados matemáticos se interpretan "traduciendo" del lenguaje matemático al lenguaje del especialista, en forma similar a lo que se hizo en su contra parte en la segunda etapa. Es necesario el análisis entre la interpretación del resultado matemático y el problema formulado por el especialista del área de la aplicación. Esta etapa debe ser ejecutada en el equipo multidisciplinario.

Dado que el enfoque lógico-combinatorio se ha aplicado con buenos resultados en problemas de clasificación supervisada, se aplicará también en la identificación de fibrosis en tejido hepático, haciendo uso de la caracterización con métodos que den información cuantitativa de las muestras, como una estrategia más, para desarrollar un método de estadificación de la patología y profundizar en el conocimiento de esta.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.

3.1 MODELO ANIMAL DE INDUCCIÓN DE FIBROSIS CON CCL₄

Para el estudio de la fibrosis se han desarrollado diferentes modelos animales, entre ellos los que utilizan tetracloruro de carbono (CCl₄). Los animales más utilizados para estos modelos son la rata, el ratón y el hámster. El mecanismo mediante el cual el CCl₄ causa el daño a los hepatocitos está relacionado con la producción del radical libre peróxido de triclorometil, que es altamente oxidante, y que resulta de su metabolismo [34]. Este metabolito desestabiliza y daña las membranas celulares, provocando muerte celular.

Se utilizaron 25 ratas macho de la cepa *Wistar*, de 6 semanas de edad, con un peso de entre 190 y 220 gramos. Cada tiempo de inducción se integró inicialmente por 5 ratas, sin embargo, se seleccionaron únicamente 4 individuos por grupo, descartando algunos casos por complicaciones como muerte prematura o anomalías observadas cuando se colectaron y trataron las muestras, como la presencia de un absceso infeccioso en zona visceral o acumulación excesiva de líquido en el espacio entre el revestimiento del abdomen y los órganos abdominales (ascitis) y mala perfusión de hígado en formol. Así entonces, se formaron aleatoriamente 5 grupos de 4 ratas cada uno, uno de ellos servirá como grupo control. Las características de los grupos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Modelo murino para experimentación.

Grupo	Número de individuos	Tiempo de inducción con CCl ₄
S (control)	4	Sin inducción
T1	4	4 semanas
T2	4	6 semanas
T3	4	10 semanas
T4	4	13 semanas

Los grupos fueron separados en cajas de acrílico para bioterio, asegurando así que reciban las mismas condiciones de alimentación y sobrevivencia. Los animales permanecieron controlados y monitoreados en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental (UME), del Hospital General de México.

Se indujo fibrosis hepática en los individuos, utilizando CCl_4 mezclado con aceite de oliva, en una dosis de 250 (μl), a una concentración de 33% por vía intraperitoneal, 2 veces por semana [43, 44]. Después de que las ratas ganaron el 20% de su peso inicial, se reajustó la dosis de inducción a 250 ($\mu\text{l/g}$). Los grupos fueron sacrificados durante las diferentes semanas de la inducción, como se observa en la Tabla 3. Se realizó una hepatectomía para la extracción del hígado y se conservó en formaldehído al 3.8%.

3.1.1 Toma de Muestras Hepáticas y Metodología para Realizar los Cortes

Después de extraer las muestras hepáticas, se siguió la siguiente metodología:

1. Se sumergió el tejido hepático al menos 24 horas en formaldehído, ya que después de este periodo es posible garantizar que el tejido no sufrirá alteraciones estructurales producidas por la acción de enzimas locales y por la proliferación de bacterias y hongos provenientes del medio ambiente o de la misma muestra [45]. La solución en donde se sumergen las muestras se compone de 1 porción de formol por cada 10 de agua tridestilada. El motivo de realizar esta disolución es que el medio no resulte agresivo para el tejido.
2. Una vez que se cuenta con el tejido preservado, se realiza un corte transversal de la muestra (Corte 1), proveniente del lóbulo hepático de mayor tamaño, es decir, del lóbulo medial derecho, que se ilustra en la Figura 10-A [46]. El corte realizado corresponde siempre a la misma zona del órgano y se procura mantener en todos ellos las mismas dimensiones de 1 [cm] de ancho, 3 [cm] de largo y de 0.1 a 0.2 [cm] de espesor. Este corte será utilizado para realizar las pruebas de conducción de calor. La zona hepática del lóbulo medial derecho de la que se tomó el Corte 1 se observa en la Figura 10-B.
3. Los cortes hepáticos se depositan en frascos de vidrio de 30 [ml] con formol, en la misma concentración utilizada previamente.

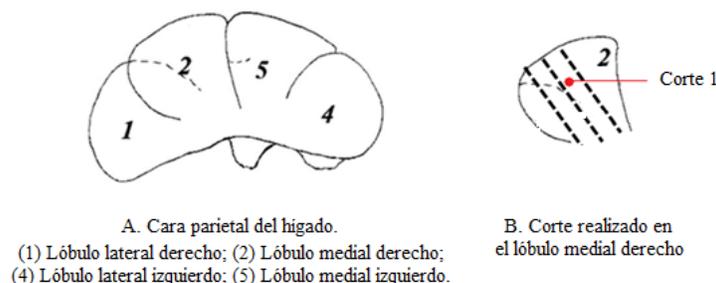


Figura 10. Estructura del hígado de rata y disposición de los cortes

4. Adicionalmente, se colectó una muestra para los grupos T1, T2, T3 y T4, seleccionadas sistemáticamente del lóbulo hepático medial derecho de cada individuo. No se realizó este análisis en el grupo control ya que, al no ser sometido a inducción con CCl₄, no se esperaba encontrar hallazgos histopatológicos en las muestras. El tejido se depositó en una laminilla y se realizaron procesos histoquímicos de tinción con *Tricrómica de Masson*. Utilizando un microscopio electrónico, se fotografiaron estas laminillas en un acercamiento de 4x, obteniendo 10 imágenes de cada laminilla. Se realizó una evaluación de fibrosis según la escala clínica Metavir para cada imagen, usando la moda a partir de tres observadores experimentados independientes. Con esto, se analizaron 10 imágenes por cada rata.

El uso del modelo animal fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga (Referencia: DI / 16 / UME / 4/18). El tetracloruro de carbono, al ser un compuesto altamente tóxico, tendrá un manejo referido a su almacenamiento y manipulación, de conformidad con las precauciones establecidas por el fabricante en la hoja técnica de seguridad. Este protocolo respeta los principios básicos de la ética: autonomía, justicia, beneficencia y no maleficencia.

3.2 DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS UTILIZANDO LA ESCALA METAVIR

Una vez que se cuenta con todas las muestras hepáticas preservadas y con una muestra de cada una de ellas depositada y procesada en una laminilla, se realizó un análisis por expertos para evaluar el grado de fibrosis utilizando la escala clínica *Metavir*.

Se realizaron tres evaluaciones de fibrosis para cada una de las 10 imágenes de cada laminilla. Estas fueron efectuadas por tres observadores experimentados independientes del laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM), del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicado en el Hospital General de México.

Obtenidas las tres evaluaciones para cada imagen, se calculó la moda y se tomó registro de ella. Cuando la disparidad fue drástica (ninguno de los tres observadores coincidió en el diagnóstico) se solicitó la opinión de un cuarto observador para realizar una evaluación determinante en función a dos de cuatro coincidencias. De este modo, se analizaron 10 imágenes por cada rata de los cuatro grupos mencionados, dando un total de 160 evaluaciones.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO POR MEDIO DE UN SENSOR BASADO EN LA FOTO-DEFLEXIÓN

3.3.1 Configuración Experimental

Un haz de luz, emitido por una fuente láser a 1550 [nm] de longitud de onda (infrarrojo), viaja por medio de fibra óptica mono-modal hacia el colimador. Posteriormente, el haz continúa su propagación por un bloque de acrílico, con un índice de refracción determinado y un pulido a nivel micrométrico en sus caras laterales. La potencia luminosa del haz de luz es recolectada al final de su trayectoria por un colimador de salida, conectado por medio de fibra óptica a un Foto-detector, en el que es posible visualizar y registrar los valores de potencia asociados a cada medición. En la Figura 11 se ilustran los elementos que conforman el sensor de flujo de calor. En esta figura se distingue también la incorporación de varios dispositivos para monitorear la potencia de entrada. Utilizando un divisor de potencia óptica 50/50, en la salida de la fuente de luz láser, es posible realizar un registro de potencia, proporcional a la que entra al sensor, estos valores de potencia se adquieren y almacenan por medio del Foto-detector 1 y son útiles para efectuar la normalización de los datos en cada medición. Este proceso de normalización se detallará más adelante.

El bloque de acrílico es alineado con respecto a los colimadores por medio de dos platinas con desplazamiento milimétricos de la marca *Thor Labs*[®]. El bloque es soportado por una base de aluminio y está aislado térmicamente de esta por medio de tiras de neopreno.

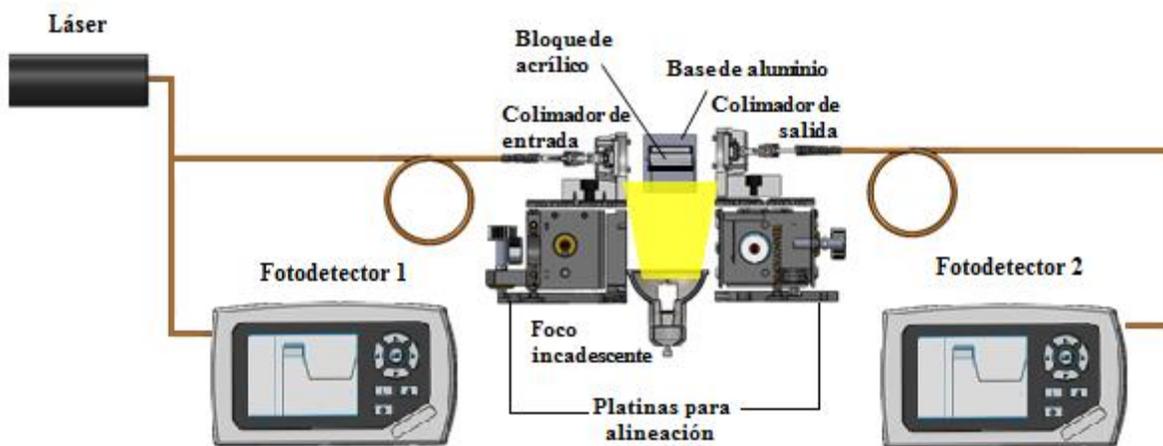


Figura 11. Elementos en el montaje del sensor de flujo de calor para la caracterización de una corte de tejido

El efecto de la deflexión foto-térmica se logra cuando el haz de luz desvía su trayectoria un cierto ángulo, a consecuencia de un gradiente de temperatura. Este gradiente es producido en el sensor cuando fotones, procedentes del foco incandescente de halógeno, son absorbidos por una capa de un material negro (absorbe en todo el espectro de la luz visible) que recubre la parte inferior del bloque de acrílico, incrementando así la energía cinética interna y dando como resultado la producción de energía térmica, es decir, calor. La potencia medida a la salida del sensor de ángulo dependerá del área de intersección de las dos curvas gaussianas correspondientes a los perfiles del modo fundamental en dos dimensiones (x, y) que corresponden al colimador de entrada y de salida. Los perfiles de intensidad están acotados por la circunferencia del área del colimador. El desplazamiento en el eje del colimador se convertirá en un corrimiento lateral de la imagen proyectada en el plano imagen de la lente del segundo colimador como se muestra en la Figura 12.

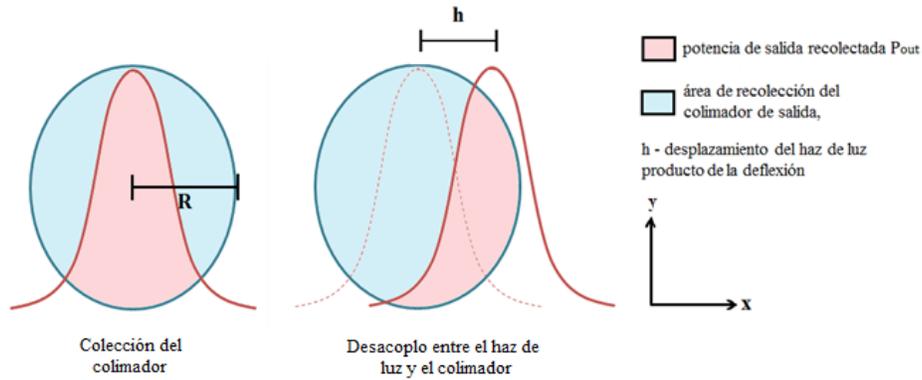


Figura 12. Esquema del área de intersección de los perfiles gaussianos desplazados una distancia h , acotados por el área del colimador de radio R .

La expresión para la potencia de salida (P_{out}), considerando que el haz gaussiano del colimador de salida se desplaza un corrimiento lineal h con respecto al centro del perfil de intensidad del colimador de entrada, es función de la intensidad del haz y se calcula a través de la integral de área del haz gaussiano en dos dimensiones (x, y), acotada por el área de la circunferencia del colimador, y puede ser expresado por la ecuación (28), donde A es el radio del núcleo de la fibra e I es la intensidad del haz gaussiano [25]. En resumen, las características más importantes de los elementos que integran al sensor de flujo de calor se conjuntan en la Tabla 4.

$$P_{out} = \iint_A I(x, y) dx dy \quad (28)$$

Tabla 4. Características de los elementos presentes en el montaje del sensor

Elemento	Características
Fuente Láser	Marca <i>Thor Labs</i> ®, modelo S1FC1550. Usa un diodo láser ML97H6F de InGaAsP con longitud de onda de 1550 [nm]. Potencia máxima de salida 1.85 [mW].
Fibra Óptica	Tipo monomodal Corning SMF 28 de 1 [m] de longitud.
Acoplador Fijo de Fibra Optica	Marca Thor Labs, modelo FBC1550-FC, rango de operación de longitud de onda 1050 -1700 [nm] y conectores FC/PC.
Bloque de acrílico	Medidas: 1 x 1 x 3 [cm], pulido a nivel micrométrico, conductividad térmica de 0,175-0,2 [W/mK], capacidad térmica específica de 0.35 [cal/g°C] e índice de refracción de 1.48-1.50 ¹
Foto-detector	Marca Thor Labs. Resolución: 0.1 [nW, rango de potencia óptica: 50 [nW] – 50 [mW] (@ 980 [nm]), incertidumbre porcentual: ± 5 %, temperatura de operación: 5 – 40 [°C]. Sensor de silicón.
Foco incandescente	Foco de halógeno Voltech MR – 16, con potencia de 50 [W], base Bi – Pin y con control para ajuste de potencia eléctrica (Dimmer) de 6 posiciones.

3.3.2. Procedimiento para las Mediciones con el Sensor de Flujo de Calor

Empleando la configuración del sensor descrita en el epígrafe 3.3.1, se realizaron mediciones sistemáticas. El encendido y apagado del sistema de calentamiento, así como la adquisición de los datos de potencia en los Foto-detectores, son procesos automatizados. Para ello se utiliza un micro-controlador *ATMEGA 328*[®] y el software para instrumentación *LabVIEW*[®], cuya interfaz se muestra en la Figura 13. Al inicio de cada medición se realiza un registro de la temperatura ambiente. El método para realizar una prueba en el sensor de flujo de calor se describe a continuación.

¹ Según las Norma ASTM en sus apartados D-177 y D-542.

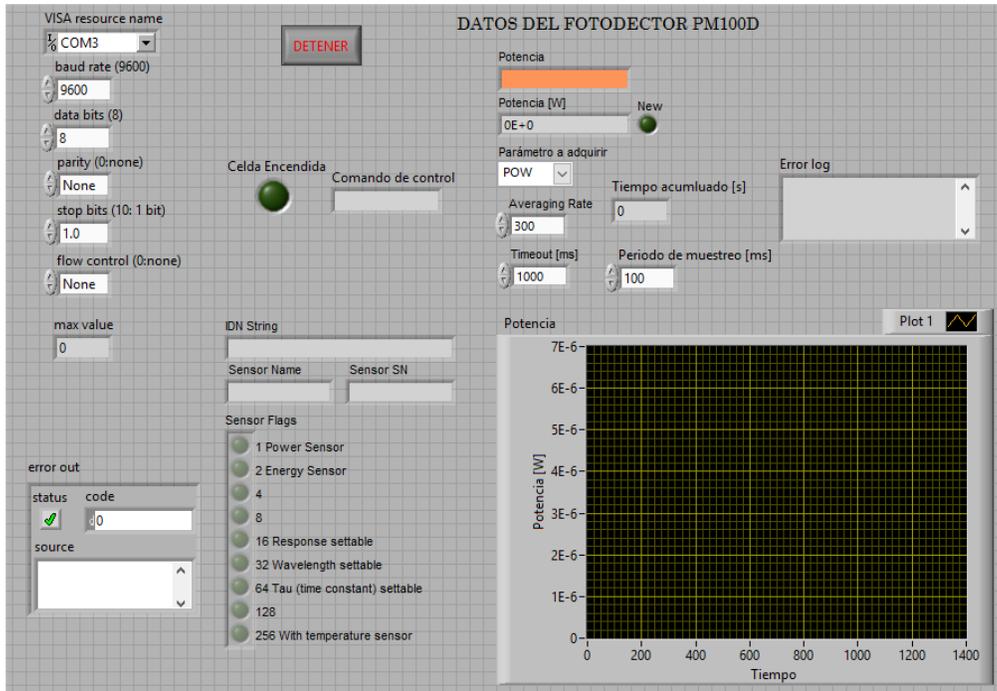


Figura 13. Interfaz en *LabVIEW*® para el control del sistema y adquisición de datos

1. Monitorear por 20 segundos la potencia de salida registrada en el Foto-detector 2 para asegurar que sea estable, durante este periodo, la potencia debe permanecer constante.
2. En el segundo 21, la lámpara, que actúa como foto-excitador de la fuente de calor, es encendida. La deflexión del haz de luz comienza inmediatamente y a consecuencia se observa el decremento de la potencia de salida.
3. El periodo de calentamiento finaliza en el segundo 440, cuando la lámpara se apaga de manera automática, es decir, se establece un gradiente térmico inducido durante 7 minutos.
4. La potencia de salida, sigue registrándose hasta los 1080 segundos, tiempo en el que finaliza la prueba. Posterior a los 440 se identifica la recuperación de la potencia con una tendencia de regresar a los valores iniciales, esto se debe a la estabilización térmica del sistema.

Para determinar la repercusión de las variaciones de la fuente de luz láser en las mediciones realizadas con el sensor se ha calculado la potencia referenciada, esto consiste en efectuar la operación mostrada en la ecuación (29) con las potencias adquiridas en cada medición. La potencia de entrada, P_{IN} , se registra con el Foto-detector 1 (Figura 13) y corresponde a los valores de intensidad luminosa de la fuente láser; mientras que la potencia de salida, P_{OUT} , es adquirida por

medio del Foto-detector 2 e indica la variación de la potencia de entrada debido al efecto de foto-deflexión. De este modo, se disminuye el error en la medición debido al instrumento empleado.

$$P_{referenciada} = \frac{P_{IN} - P_{OUT}}{P_{IN} + P_{OUT}} \quad (29)$$

3.3.3. Mediciones de Repetibilidad y Calibración del Sensor de Flujo de Calor

Se efectuaron mediciones para determinar la respuesta del sensor aplicando tres diferentes flujos de calor, Q_2 , Q_3 y Q_4 . Esto se logra regulando la intensidad de la lámpara que actúa como foto-excitador, por medio de un *Dimmer*, éste controla la potencia a la lámpara con una perilla de seis posiciones. La potencia suministrada a la lámpara es proporcional a la cantidad de calor aplicado al bloque de acrílico por el que viaja el haz de luz, por lo que, a mayor potencia, mayor será el calor aplicado y se observará un mayor decremento en la potencia de salida del sistema. Para cada flujo de calor se realizaron tres pruebas, por lo que, para la calibración del sensor, se cuenta con nueve curvas de conducción mostradas en la Figura 14.

Debido al método para la normalización de los datos, la potencia referenciada en curvas incrementa con el aumento del flujo de calor. En la ecuación (29), se puede observar que el término P_{out} en el numerador como resta de P_{in} . Si la potencia de salida tiene un decremento proporcional al flujo de calor, el numerador aumenta. Con esto se explica el comportamiento de las curvas referenciadas, por lo que a mayor diferencia entre P_{in} y P_{out} mayor será el decremento de potencia y el valor de la potencia referenciada.

Se observa que en las curvas de la Figura 14 se cumple el comportamiento esperado: cuando se enciende la lámpara se ocasiona la deflexión del haz de luz; la potencia de salida sigue disminuye incluso de 5 a 10 segundos después de que el tiempo de calentamiento, esto ocurre a consecuencia de la inercia térmica propia del bloque de acrílico. Finalmente, de las gráficas comprobamos que el valor de la potencia de la señal se recupera lentamente y tiende a regresar a su valor original.

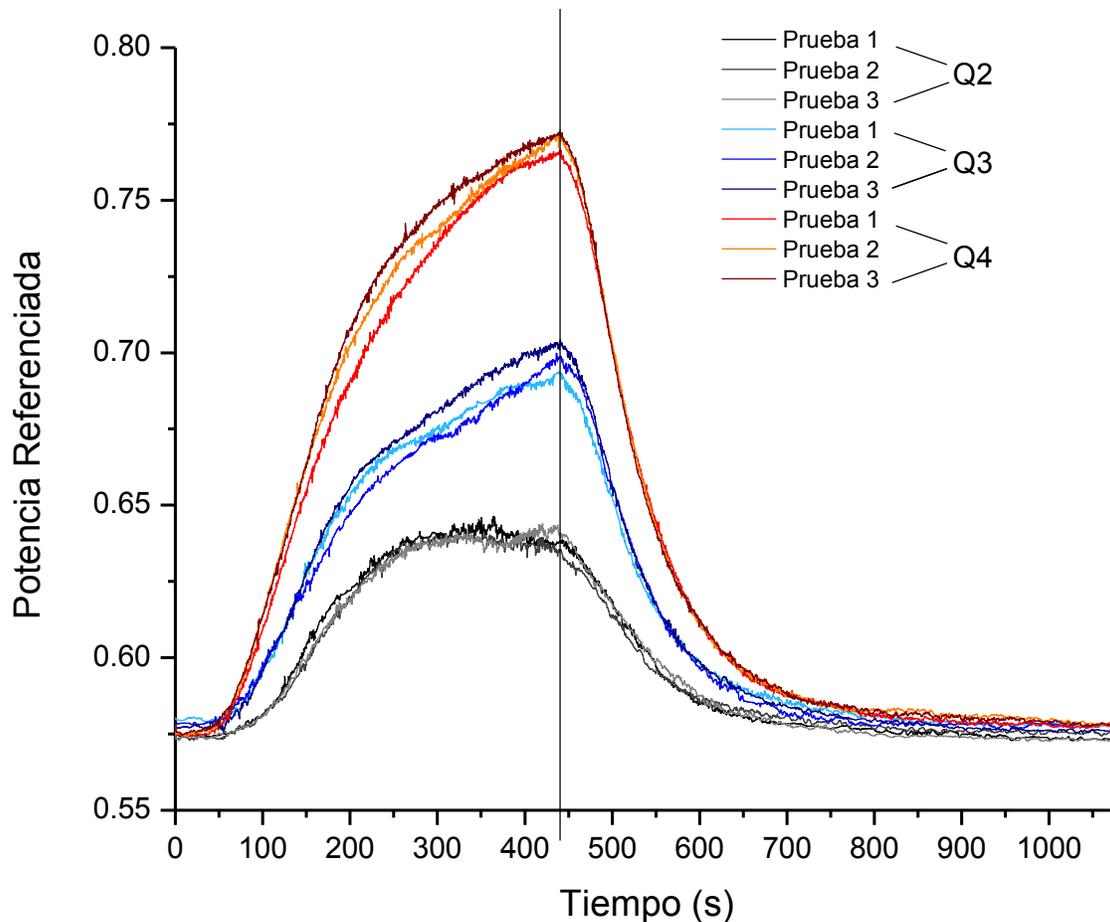


Figura 14. Calibración del sensor aplicando diferentes pulsos de calor

En la Figura 14, se distinguen tres agrupaciones de las nueve curvas, según el flujo de calor aplicado. La primera agrupación corresponde a un conjunto de mediciones realizadas aplicando un flujo Q_2 , en él, la potencia referenciada en el segundo 440 es de 0.638 ± 0.002 . El segundo grupo, son mediciones empleando un flujo Q_3 , para el cual la potencia referenciada es igual a 0.698 ± 0.004 . Finalmente, aplicando un flujo Q_4 se obtuvieron los resultados para los que la potencia referenciada es 0.77 ± 0.003 .

Se usó una prueba T para verificar que las agrupaciones fueran estadísticamente diferentes. Se consideró el valor de potencia referenciada en el segundo 440 y se realizaron comparaciones por pares según la Q aplicada. Los resultados muestran que para todas de las comparaciones realizadas (Q_2 y Q_3 , Q_2 y Q_4 , Q_4 y Q_3) existen diferencias significativas ($p < 0.05$). En la Figura 15, se ilustran estas diferencias en un diagrama de caja y bigote. De este modo se verificó que el sensor presenta una respuesta repetible y, aplicando diferentes flujos de calor, las curvas se agrupan y se distinguen.

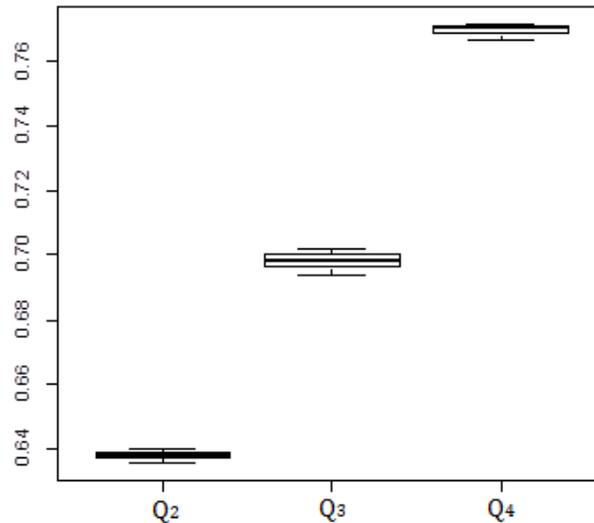


Figura 15. Diagrama de caja y bigote para las curvas obtenidas aplicando diferentes flujos de calor Q

3.4 HERRAMIENTAS MORFOMÉTRICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Dado que las evaluaciones de fibrosis hechas por los expertos son medidas cualitativas de las estructuras formadas en el hígado, se desarrolló una herramienta en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET) con la finalidad de obtener un dato cuantitativo de la presencia de fibrosis y esteatosis en las muestras colectadas. Esta herramienta opera a partir de un filtrado implementado en el *software MatLab*®. Los parámetros para filtrar las imágenes son de tamaño, color y forma.

3.4.1 Metodología para la Cuantificación de Fibrosis Hepática

Para la cuantificación de fibrosis se implementó el programa basado en un filtro de color. La interfaz se muestra en la Figura 16. El programa pide al usuario que haga una selección de la zona de interés y repite esta solicitud en dos ocasiones; esto le da una ventaja al procesamiento de las imágenes que tienen ligeros defectos de tinción y/o iluminación, ya que, finalmente, se hace una promediación de los colores de las tres áreas para hacer un rango de selección final, esta es mostrada en la interfaz con el título “Segmentación”. El rango de selección se puede ajustar manualmente por medio de una tolerancia que el usuario modifica (se muestra la imagen filtrada y ajustada, con el título “Imagen

actualizada”). Finalmente, se muestra el porcentaje en pixeles calculado para cada imagen y, una vez que el usuario lo determina, estos datos se guardan en el archivo que se haya elegido.

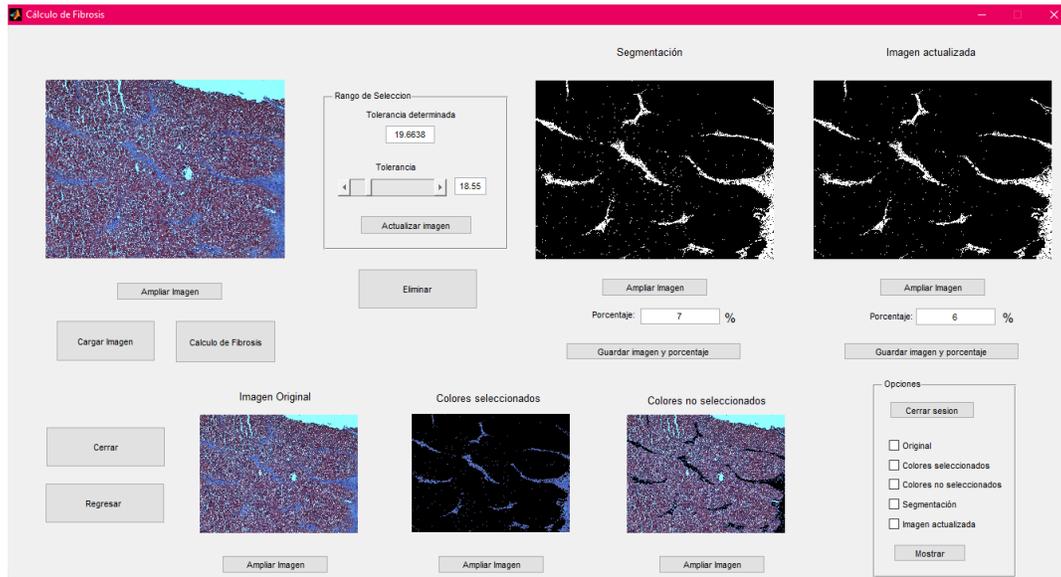


Figura 16. Interfaz del programa para calcular el porcentaje de fibrosis de la imagen en pixeles.

En la Figura 17(a) se muestra una imagen típica de una biopsia hepática teñida con tricrómica de *Masson* en donde se distinguen gruesas bandas de fibrosis en color azul. Aplicando el filtro se obtiene la imagen mostrada en la Figura 17(b), así mismo, el programa almacena el dato del porcentaje de la imagen en pixeles que se detectó como fibrosis.

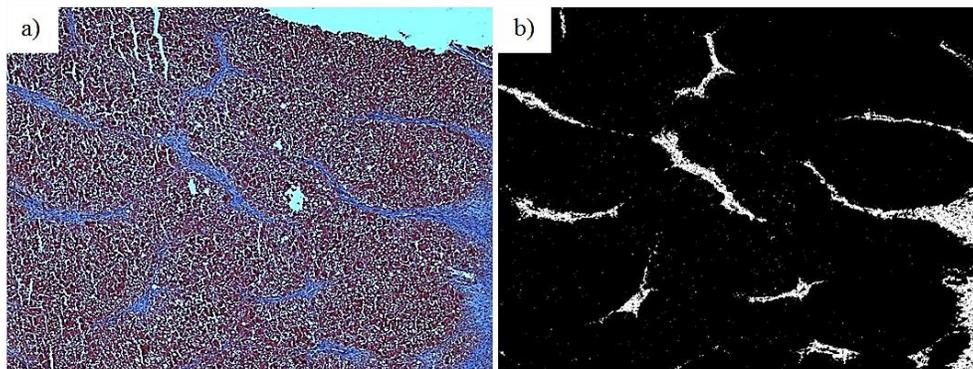


Figura 17. a) Imagen de una biopsia hepática de rata con tricrómica de Masson en un acercamiento 10x. b) Resultado del filtrado para fibrosis

3.4.2 Metodología para la Cuantificación de Esteatosis Hepática

La cuantificación de esteatosis hepática se realizó de manera similar que la cuantificación descrita anteriormente. La interfaz de programa, que basa selección en filtros de forma y tamaño, se muestra

en la Figura 18. Para ajustar manualmente la selección, el usuario puede modificar el rango del tamaño de las formas que se detectan.

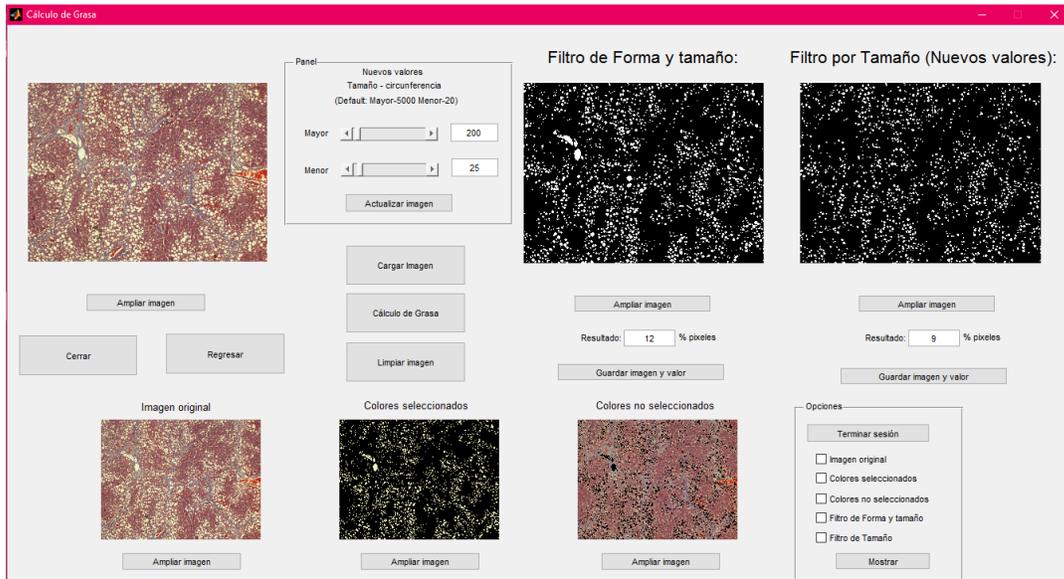


Figura 18. Interfaz del programa para calcular el porcentaje de la imagen con esteatosis en pixeles

En la Figura 19(a) se muestra una imagen de tejido hepático con esteatosis predominante. Aplicando el filtro se obtiene la imagen mostrada en la Figura 19(b). Un porcentaje de la imagen en pixeles que se detectó como grasa hepática se almacena como resultado de aplicar el filtro. Utilizando esta técnica se cuantificó en todas las imágenes tomadas del modelo animal la fibrosis y la esteatosis hepática.

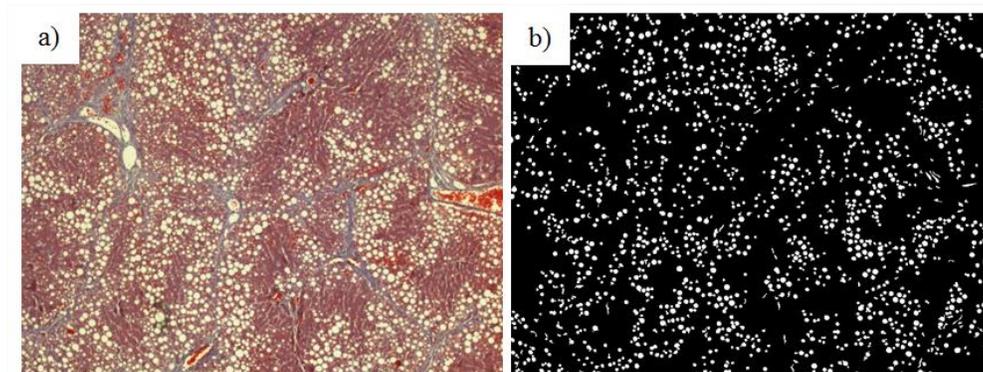


Figura 19. a) Imagen de una biopsia hepática de rata con tricrómica de Masson en un acercamiento 10x. b) Resultado del filtrado para esteatosis

3.5 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE FIBROSIS UTILIZANDO EL ENFOQUE LÓGICO COMBINATORIO

3.5.1 Modelo Matemático.

Por medio del enfoque lógico-combinatorio de la teoría de reconocimiento de patrones para estudiar la caracterización de las etapas de fibrosis hepática, se aplicó uno de los métodos de clasificación supervisada basada en precedencias parciales, *ALVOL*, describiendo las muestras de tejido con las variables definidas en el modelo [36].

Sea $R = \{R_1, R_2, \dots, R_m\}$ un conjunto finito de individuos con fibrosis hepática, cada individuo está descrito en términos de un conjunto finito de variables $V = \{V_1, V_2, \dots, V_n\}$ donde cada variable V_i (con $i = 1, 2, \dots, n$) está definida sobre un conjunto de valores admisibles $M_i = \{M_{i1}, M_{i2}, \dots\} \cup \{*\}$, donde $*$ denota ausencia de información. La descripción, D , de cada individuo, está representada como una secuencia finita de valores asignados a cada variable: $D(R_j) = (V_1(j), \dots, V_n(j))$, donde $V_i(j) \in M_i$ y es el valor que toma la variable V_i para el individuo R_j

Asimismo, los individuos $R_j \in R$ (con $j = 1, 2, \dots, m$) que conforman la matriz de aprendizaje (MA), se encuentran agrupados en un conjunto finito de clases $F = \{F1, F2, F3, F4\}$, que representan el nivel de fibrosis que puede ser diagnosticado a cada uno. Entonces, dado un nuevo individuo R_m , de la cual se conoce su descripción $D(R_m)$, el problema consiste en clasificarla en F .

Definición. Una descripción de un objeto $D(R) = (V_1(R), \dots, V_n(R))$ donde $V_i(R) \in M_i$, $i = 1, \dots, n$ es el valor del rasgo i en el objeto R y M_i es el conjunto de valores admisibles de V_i . Si $x_i \neq *$, $i = 1, \dots, n$ se dice que $D(R)$ es una descripción completa de R en términos de V_1, \dots, V_n

Definición. Sea $C = \{C_1, C_2, \dots, C_m\}$ un conjunto de funciones llamadas criterio de comparación para cada variable $V_i \in V$ tal que: $C_i: M_i \times M_i \rightarrow \Delta_i$, $i = 1, \dots, n$ donde Δ_i puede ser de cualquier naturaleza, es un conjunto ordenado y puede ser finito o infinito [47]. El criterio de comparación puede denotar semejanza o diferencia. Si $\Delta_i [0,1]$, 1 representa la máxima diferencia (o semejanza) y 0 representa la mínima diferencia (o semejanza), cualquier valor intermedio representa un grado de diferencia (o semejanza). Si el criterio de comparación es un valor finito, esto es: $\Delta_i = \{0, 1, 2, \dots, k\}$ corresponde transformar Δ_i del modo: $\Delta_i = \left\{0, \frac{1}{k}, \frac{2}{k}, \dots, 1\right\}$

3.5.2 Formalización del Algoritmo de Votación

1. Sistemas de conjuntos de apoyo.

Definición. Sea $\omega \subseteq X$ un conjunto de soporte, donde $\omega \neq \emptyset$. Un sistema de conjuntos de soporte se define como $\Omega = \omega_1, \dots, \omega_s$, y representa un conjunto de subconjuntos de atributos de O . ω_o denotará la ω -parte de la descripción de O , en términos de los rasgos o variables $x_j \in \omega_m$, $m=1, \dots, s$. Este sistema indica qué partes de los objetos serán comparadas.

Es sistema de conjuntos de apoyo permitirá el análisis de los objetos a clasificar, prestando atención a las diferentes partes o sub-descripciones de los objetos, y no analizar las descripciones completas. Ejemplos de sistemas de conjuntos de apoyo son las combinaciones con un cardinal fijo, las combinaciones con un cardinal variable, los conjunto de potencia, etc.

2. Función de semejanza. Para medir el grado de parecido entre dos individuos con fibrosis hepática, se aplicó el concepto de función de semejanza. Esta función se basa en los criterios de comparación generados para cada variable C_i , y puede evaluar semejanza o diferencia, dependiendo del tipo de criterios de comparación diseñados [47].

Definición. Sea $\beta: (M_i \times M_i)^2 \rightarrow \Delta$ la función de semejanza, donde Δ es un conjunto ordenado y puede ser finito o infinito para $D(R_j)$ y $D(R_r)$, siendo estas últimas, las descripciones de dos individuos en el dominio $(M_1 \times \dots \times M_7)$.

Definición. Sea β_ω una función de semejanza parcial, definida por la expresión (30):

$$\beta_\omega (I(R_j)I(R_r)) = 1 - \sum_{x_i \in \omega} \rho_i(C_i (V_i(R_j), V_i(R_r))) \quad (30)$$

Donde ω representa un conjunto de apoyo y ρ_i es el parámetro de relevancia asociada a cada variable V_i , definido por los expertos.

3. Evaluación por fila dado un conjunto de apoyo fijo. Una vez definidos el sistema de conjuntos de apoyo y la función de semejanza, el proceso de votación inicia con la etapa de evaluación por filas en cuanto a la semejanza entre las diferentes partes de las descripciones de los objetos ya clasificados y los que se desean clasificar. Cada fila de la MA se compara con el objeto a clasificar, R , por medio de la función de semejanza β_ω . Esta evaluación es una función de los valores de las semejanzas entre las diferentes partes comparadas. Un ejemplo de esta evaluación es $\Gamma_\omega(R_i, R) = \rho(R_i)\rho(\omega)\beta(\omega D(R_i), \omega D(R))$, donde $\rho(R_i)$ es el parámetro de ponderación asociado a cada objeto R_i de la MA, $\rho(\omega)$ es la importancia del conjunto de soporte ω y $\beta(\omega D(R_p), \omega D(R))$ es el valor de similitud entre los objetos comparados.

4. Evaluación por clase dado un conjunto de apoyo fijo. Esta etapa consiste en totalizar las evaluaciones obtenidas para cada uno de los objetos de MA con respecto al objeto R que se quiere clasificar. Esta totalización es función de las evaluaciones por filas anteriormente obtenidas. Un ejemplo de esta evaluación es:

$$\Gamma_{\omega}^j(R) = \frac{1}{m} \sum_{t=1}^{m_j} \Gamma_{\omega}(R, R_t)$$

Donde t varía según los elementos de la clase K_j y m_j es la cantidad de elementos de la MA.

5. Evaluación por clase para todo el sistema de conjuntos de apoyo. Las evaluaciones se totalizan para todo el sistema de conjuntos de apoyo. Siguiendo con el ejemplo, este paso puede ser expresado como sigue:

$$\Gamma_j(R) = \frac{1}{\Omega_A} \sum_{\omega \in \Omega_A} \Gamma_{\omega}^j(R)$$

Siendo Ω_A el sistema de conjuntos de apoyo seleccionado para el algoritmo.

6. Regla de solución. Es una función que establece un criterio que considera cada voto obtenido y llega a una decisión relativa a las relaciones del objeto a clasificar con cada clase del problema planteado. En este caso la regla será mayoría simple, es decir, el objeto se clasificará en la clase para la cual obtuvo su máxima evaluación.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS.

4.1 DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS UTILIZANDO LA ESCALA *METAVIR*

El diagnóstico Metavir fue determinado tomando la moda de las evaluaciones hechas a partir de las 10 imágenes correspondientes al lóbulo hepático de cada individuo. El peso de cada individuo fue registrado al momento del sacrificio. En la Tabla 5 se resumen las características de los individuos, así como el la moda, la mediana, \tilde{m} , y la media, \bar{m} , y las medidas de dispersión (rango y desviación estándar, σ) del diagnóstico de fibrosis dado por los expertos. La escala Metavir es una variable cualitativa ordinal, por lo que para calcular \bar{m} y σ se categorizaron los valores como F1 = 1, F2 = 2 y así sucesivamente. Estos cálculos darán indicios de qué tan disperso es el diagnóstico dado.

En estos resultados, se destaca particularmente el individuo B del grupo T1, ya que su desviación estándar es la más alta de todos y su evaluación Metavir fue igual a 3, a pesar de haber sido sometido únicamente a cuatro semanas de inducción. El promedio de σ para los grupos T1, T2, T3 y T4 fue igual a 0.55, 0.49, 0.44 y 0.2, respectivamente, con lo que se puede concluir que el grupo T4 tuvo una evolución de fibrosis más homogénea que el resto de los grupos. Esta misma conclusión puede ser reafirmada por los datos del rango, que muestran que en el grupo T4 se encuentra la menor dispersión. En este sentido, se observa que en el grupo T4 se localizan dos ratas cuyo rango y σ es igual a cero, esto es, las diez imágenes observadas y evaluadas por los expertos tuvieron el mismo diagnóstico: F4. Cabe resaltar que la descripción para los estadios de fibrosis corresponde a detalles en la morfología de la estructura que va creciendo en nódulos hepáticos, es decir, no está necesariamente relacionada con la cantidad sino con la forma, por ello, es probable que exista un mejor discernimiento de la enfermedad cuando se trata de una etapa avanzada. El grupo T3 resulta gravemente influido por la variación en la progresión de fibrosis ya que se encontró que únicamente una de las cuatro ratas que lo conforman evolucionó en F3; en el resto de los grupos tres de las cuatro ratas alcanzaron el estadio esperado. Resalta también que en todos los casos, la mediana es igual a la moda. Por otro lado, en el tiempo de inducción avanzado (T4) se observó que los individuos con menos desviación estándar de la evaluación fueron aquellos con menor peso, sin embargo, en otros grupos no se encontró una relación con entre el peso y la evaluación Metavir.

Tabla 5. Datos de los cortes tomados del modelo animal experimental para realizar mediciones de flujo de calor

Datos del individuo			Escala Metavir				
Grupo	Nombre	Peso [g]	Moda	\tilde{m}	\bar{m}	Rango	σ
T1	A	311	F1	F1	1.1	1	0.32
	B	321	F3	F3	2.5	2	0.71
	C	335	F1	F1	1.3	1	0.48
	D	345	F1	F1	1.3	2	0.68
T2	A	311	F2	F2	1.7	1	0.48
	B	287	F2	F2	1.7	1	0.48
	C	315	F1	F1	1.2	1	0.42
	D	340	F2	F2	2.1	2	0.57
T3	A	300	F2	F2	2	2	0.47
	B	352	F4	F4	3.9	1	0.32
	C	378	F3	F3	3.3	1	0.48
	D	342	F4	F4	3.7	1	0.48
T4	A	372	F4	F4	4.0	0	0
	B	382	F4	F4	4.0	0	0
	C	386	F3	F3	2.9	1	0.32
	D	384	F4	F4	3.7	1	0.48

4.2 MEDICIONES CON EL SENSOR DE FLUJO DE CALOR

Utilizando el Corte 1 de cada hígado (Figura 10), se efectuaron mediciones en el sensor de flujo de calor. Los resultados de las mediciones de conducción de calor se muestran en la Figura 20, observe que en cada gráfica se agruparon los sujetos que tuvieron un mismo diagnóstico Metavir, es decir, en la Figura 20(a) están las curvas correspondientes aquellos individuos que obtuvieron un diagnóstico de fibrosis en Fase 1 (F1), en la Figura 20(b) la Fase F2 y así sucesivamente. En ellas, el valor máximo de la potencia referenciada es muy similar en cada fase y no se distingue una agrupación específica que permita distinguir las. La tasa de cambio de la potencia referenciada es también similar

en cada curva, sin importar su avance de fibrosis, esto es, la respuesta del sensor es similar conforme el tiempo de calentamiento transcurre en la prueba.

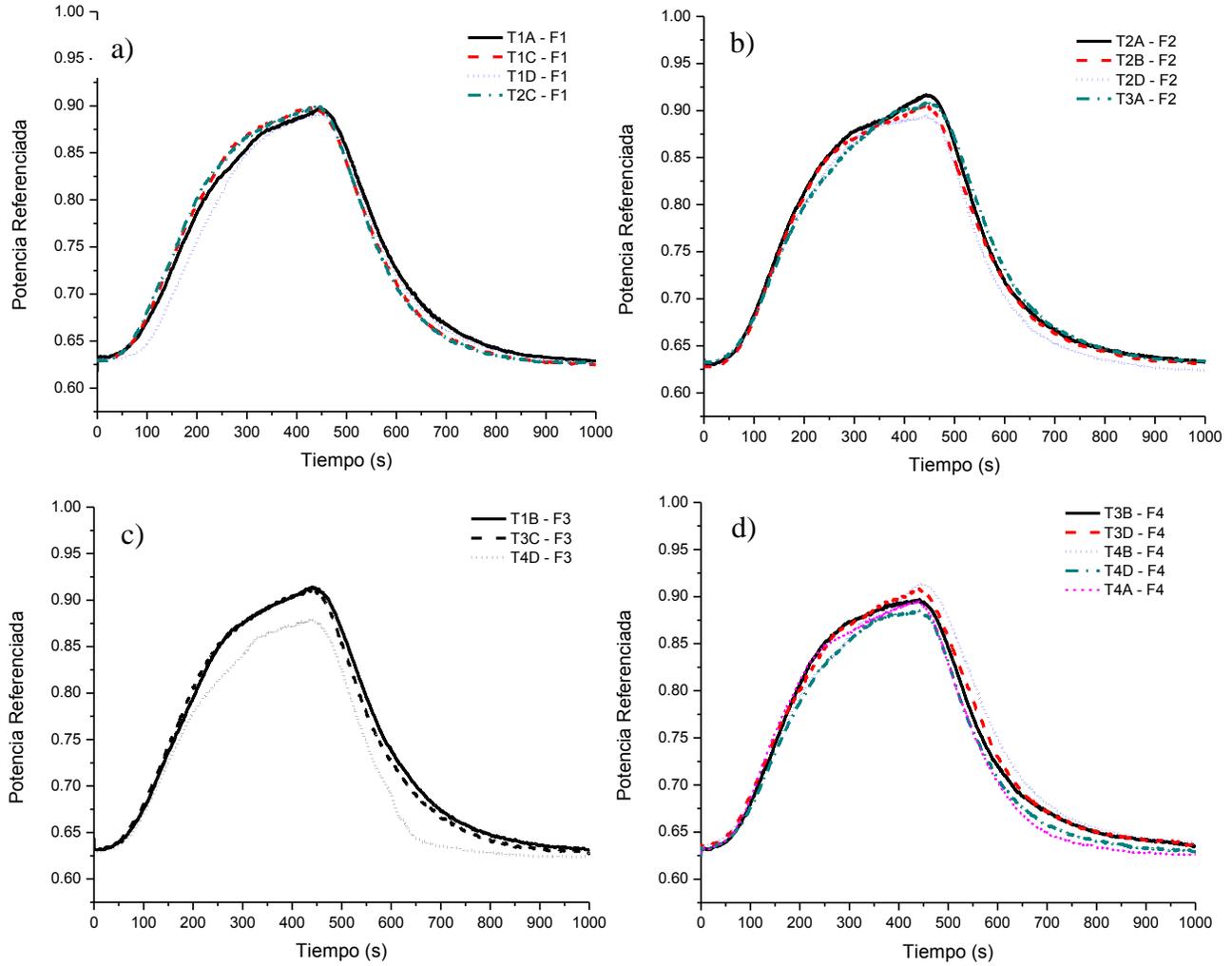


Figura 20. Curvas de conducción de calor para los cortes tomados del modelo animal experimental, agrupados por evaluación Metavir

Posteriormente, se promediaron las curvas de las agrupaciones descritas anteriormente, en la Figura 21(a) se muestra este resultado. Observe que las curvas no definen un estado predominante de fibrosis por su conducción de calor; es decir, usando este parámetro, no es posible distinguir las fases de la patología. Sin embargo, se hizo un acercamiento a los máximos de las curvas (Figura 21(b)), en el que se corrobora este resultado.

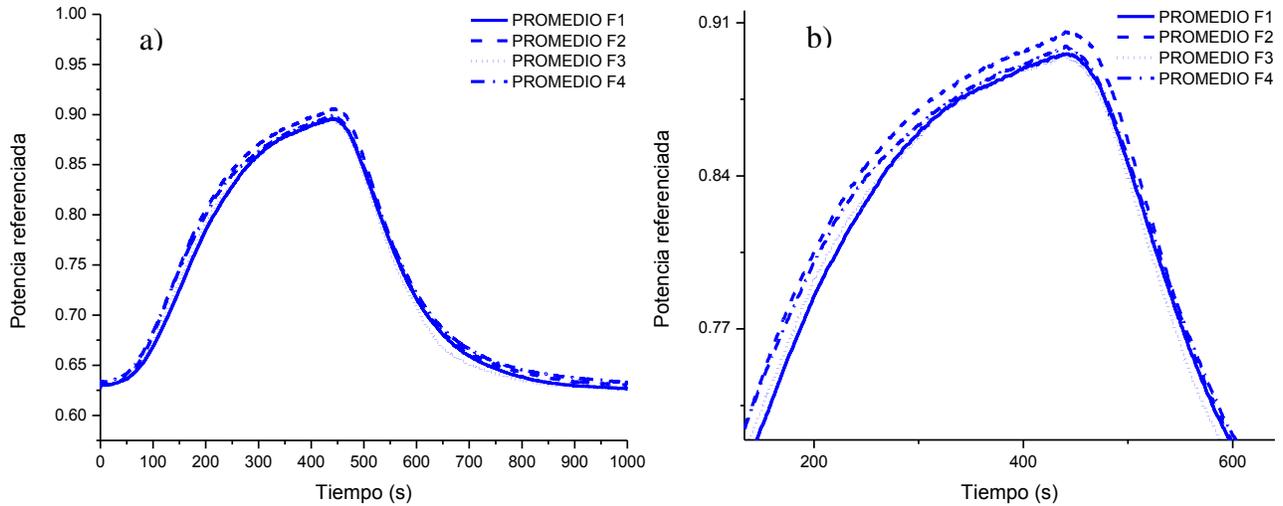


Figura 21. Curvas de conducción de calor obtenidas promediando por diagnóstico Metavir

Utilizando las medidas de dispersión para cada corte, se seleccionaron aquellas curvas para las que la desviación estándar de la evaluación Metavir de la muestra fuera la menor (Tabla 5), es decir, se eligieron los cortes: T1A para la Fase 1, F1, T3A para F2, T3D para F3 y T4B para F4. En la Figura 22(a) se observan las curvas de estos cortes. Del mismo modo que en el caso anterior, haciendo un acercamiento, fue posible distinguir una diferencia del 3% en el máximo de las curvas entre las Fases 1 y 4 (Figura 22(b)).

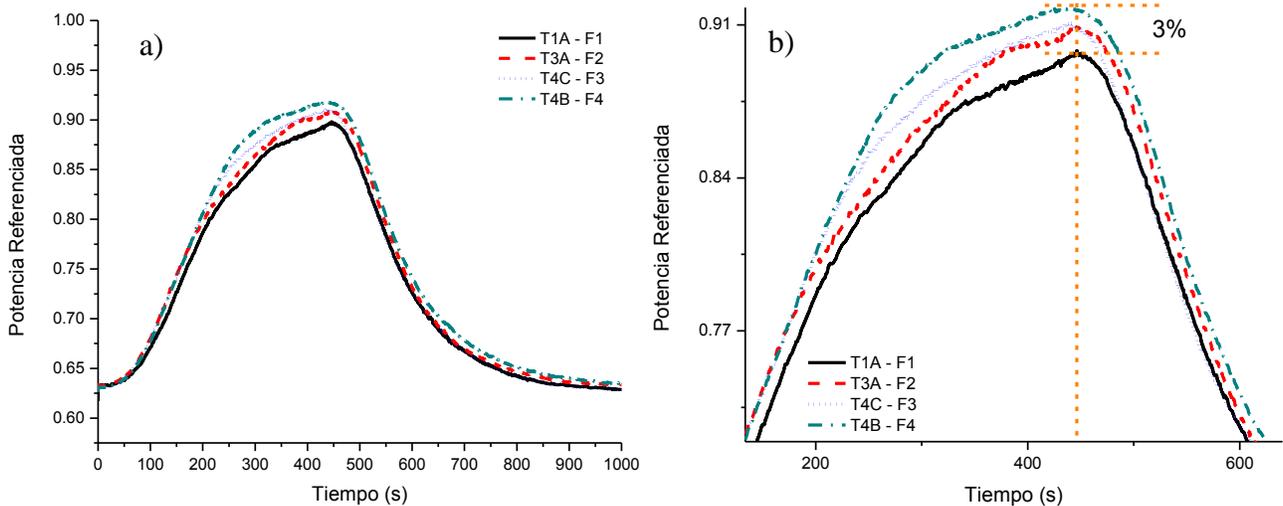


Figura 22. Curvas de conducción de calor de las muestras con menos dispersión de la evaluación Metavir

Al agrupar los individuos con menor dispersión se observa que la curva superior corresponde a la medición con un corte en F4, seguida por F3, F2 y finalmente, F1; es decir, entre mayor es la

progresión de la enfermedad, mayor es el decremento de potencia de salida, como consecuencia de un gradiente de temperatura mayor. La estructura y composición hepática consecuente de la progresión de la fibrosis, aparenta un aumento en la conducción térmica. Es notable que la aparición de las curvas siga el orden del diagnóstico. Agrupando de este modo las curvas y comparándolas entre sí, se encontró que existe una relación directamente proporcional entre la fibrosis y la conducción térmica, es decir, a mayor desarrollo de fibrosis en el tejido hepático, mayor es la conductividad térmica de la muestra.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Utilizando las herramientas morfométricas para la cuantificación de hallazgos histológicos (epígrafe 3.4), se llevó a cabo la cuantificación de fibrosis y esteatosis hepática sobre las 160 imágenes tomadas a partir de las biopsias del modelo animal de la zona 4, por ser la zona contigua más próxima de los cortes tomados para realizar las pruebas con el Sensor de Flujo de Calor. El porcentaje de la imagen en píxeles estimado se almacenó, posteriormente se realizó una agrupación por cada individuo y obtener el promedio y la desviación. Los resultados de este proceso se describen a continuación.

4.3.1 Cuantificación de Fibrosis Hepática

La discriminación particular de la fibrosis en cada foto depende de las cualidades de la tinción e iluminación, sin embargo, se concluye que la herramienta morfométrica permite obtener una discriminación certera del área de fibrosis en las muestras analizadas. Esto se muestra en la Figura 23, donde se ejemplifican los casos más complejos para este análisis.

La Figura 23(a) corresponde a una imagen con poca fibrosis, cuyo diagnóstico fue F1; para este caso, es complicado distinguir a simple vista las estructuras que caracterizan al estadio ya que, en su mayoría, se localizan entre las rupturas del tejido. No obstante, el programa implementado contabiliza dichas estructuras con escasas omisiones.

La Figura 23(b) corresponde a la imagen número 10 del individuo T2D y fue diagnosticada como F1; cabe resaltar que para este individuo la moda del diagnóstico, considerando el resto de las imágenes de la laminilla, fue F2, así que se trata de un caso peculiar. En la parte superior izquierda de la imagen se puede observar fibrosis abundante en la periferia del tejido; tanto en esta zona, como en el resto de la imagen donde se puede encontrar también fibrosis portal, el programa detecta las

zonas de interés como una integración de puntos que se acumulan formando estructuras más nítidas, como se distingue en la imagen filtrada.

En la Figura 23(c) se tomó una imagen evaluada como F3. En el contraste de la imagen filtrada se identifican claramente los septos correspondientes al estadio, sin embargo, haciendo énfasis en la parte derecha de la imagen original, se contabilizaron numerosos hepatocitos dañados, estas estructuras no corresponden a fibrosis. Es de esperar que esta imagen cuente con un error ligeramente superior al del resto.

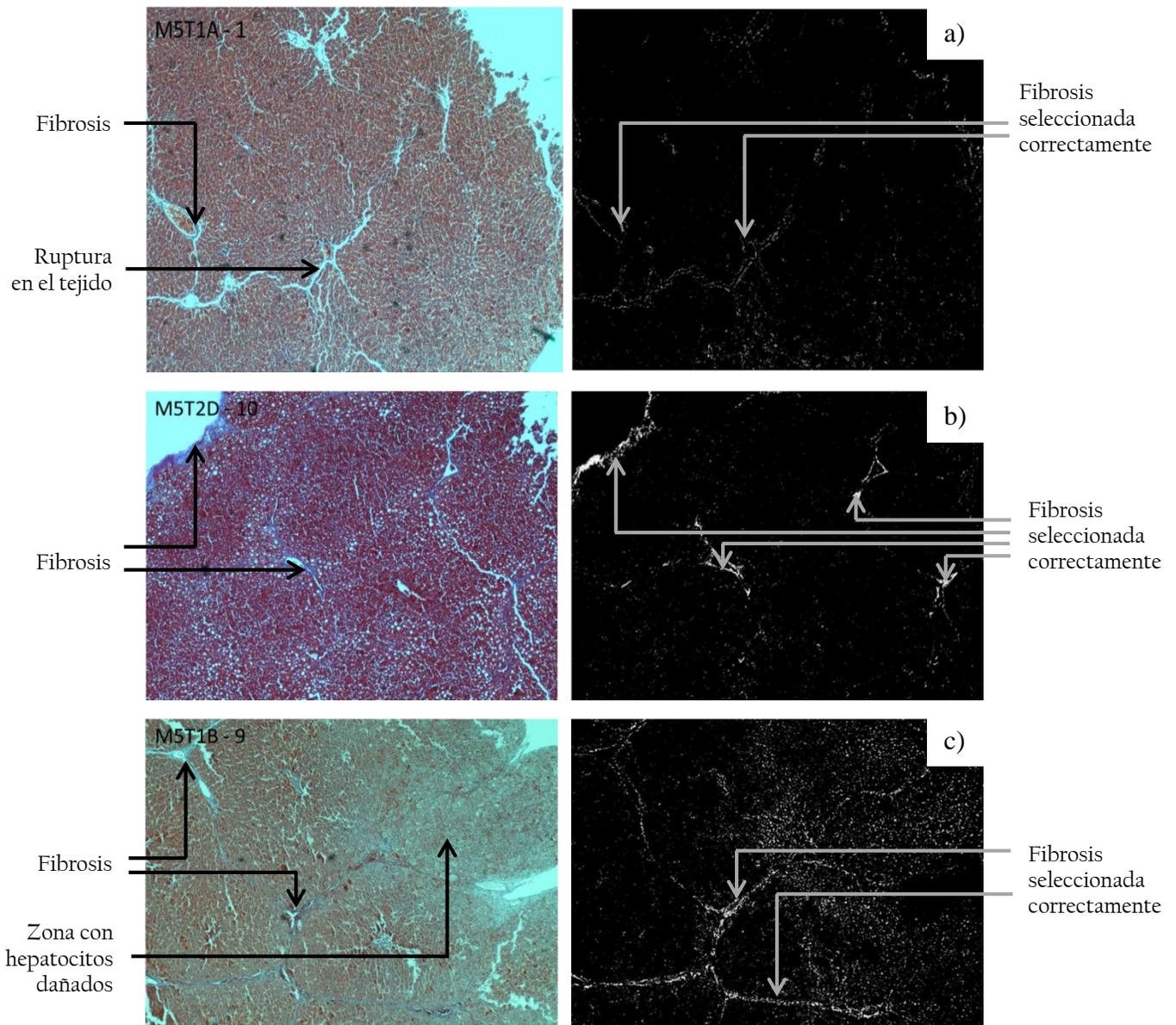


Figura 23. Imágenes problema para el programa de cuantificación de fibrosis

Posterior al análisis por imagen, se calculó la media y la desviación estándar para cada laminilla, por lo que en la Tabla 6 se reportan los resultados obtenidos de estos cálculos. Los individuos que se agrupan en los tiempos de inducción T1 obtuvieron valores menores para la desviación. Con estos datos, se obtuvo también la gráfica de caja y bigote que se muestra en la Figura 24. Para construirla, se agruparon los resultados del cálculo del porcentaje de fibrosis según los diagnósticos Metavir realizados por los expertos para cada imagen. La Figura 24 muestra que la cantidad estimada de fibrosis aumenta conforme el grado de la evaluación Metavir es más avanzado, sin embargo, existe un traslape en la cantidad estimada de fibrosis, especialmente entre las fases F3 y F4, para las cuales es mayor la desviación de los datos, como lo muestra el ancho de las cajas.

Tabla 6. Resultados de la estimación del porcentaje de fibrosis utilizando herramientas morfométricas

Datos del individuo		Resultados de la estimación del porcentaje de fibrosis	
Grupo	Nombre	Media	Desviación Estándar
T1	A	0.80	0.54
	B	2.79	0.78
	C	1.35	0.32
	D	0.95	0.86
T2	A	1.54	0.55
	B	1.53	0.81
	C	0.73	0.33
	D	2.68	1.00
T3	A	2.72	1.09
	B	3.82	0.69
	C	4.48	1.04
	D	4.63	1.12
T4	A	5.55	1.46
	B	5.06	0.89
	C	4.34	1.19
	D	5.16	1.02

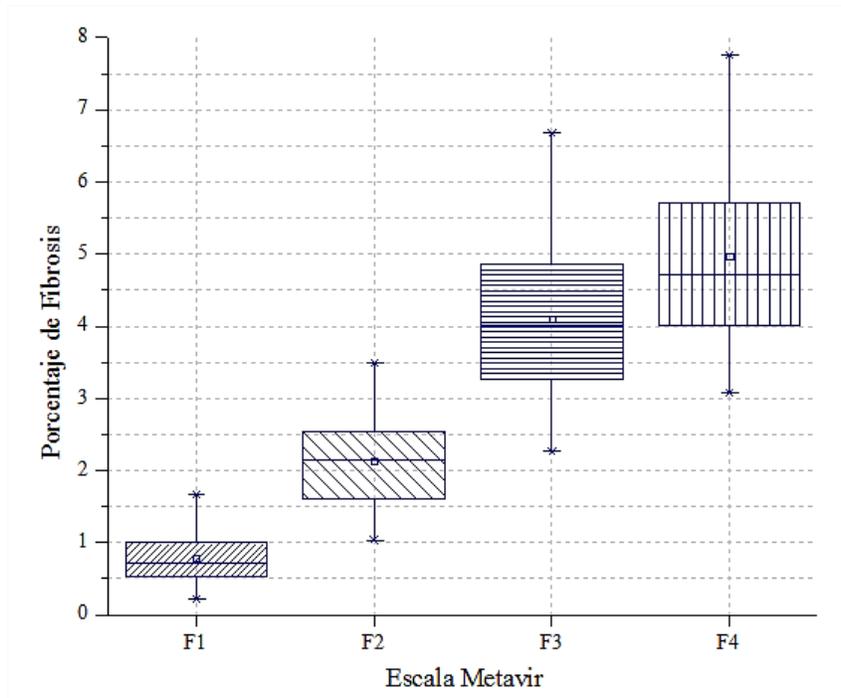


Figura 24. Diagrama de caja y bigote para el porcentaje de fibrosis

4.3.2 Cuantificación de Esteatosis Hepática

Del mismo modo que en la cuantificación de fibrosis, para estimar el porcentaje de grasa en una imagen, es necesario hacer una selección particular. La esteatosis hepática se caracteriza por presentar infiltración de grasa en el parénquima hepático de forma vesicular.

En la Figura 25 se muestran dos casos complejos para la identificación de grasa con el programa descrito anteriormente. En la imagen de la Figura 25(a) se identifican rupturas verticales estriadas en el tejido que generar confusión en el programa por aparentar un color similar a las vesículas de grasa. En la imagen de la Figura 25(b), la grasa es casi nula, sin embargo, el programa confunde las estructuras celulares dañadas con grasa hepática y, como en la imagen anterior, las rasgaduras en el tejido introducen un margen de error en el cálculo de la grasa.

Con los porcentajes calculados se obtuvo la media y la desviación estándar para cada laminilla. En la Tabla 7 se reportan los resultados obtenidos de estos cálculos. El individuo T4C destaca notablemente por su media en el porcentaje de grasa de casi 10% mientras que en el resto de los individuos la media está por debajo del 1%. Es probable que esta peculiaridad afecte en las propiedades térmicas de la muestra. Por lo que más adelante se realizará un análisis integral de las características recopiladas de todos los individuos.

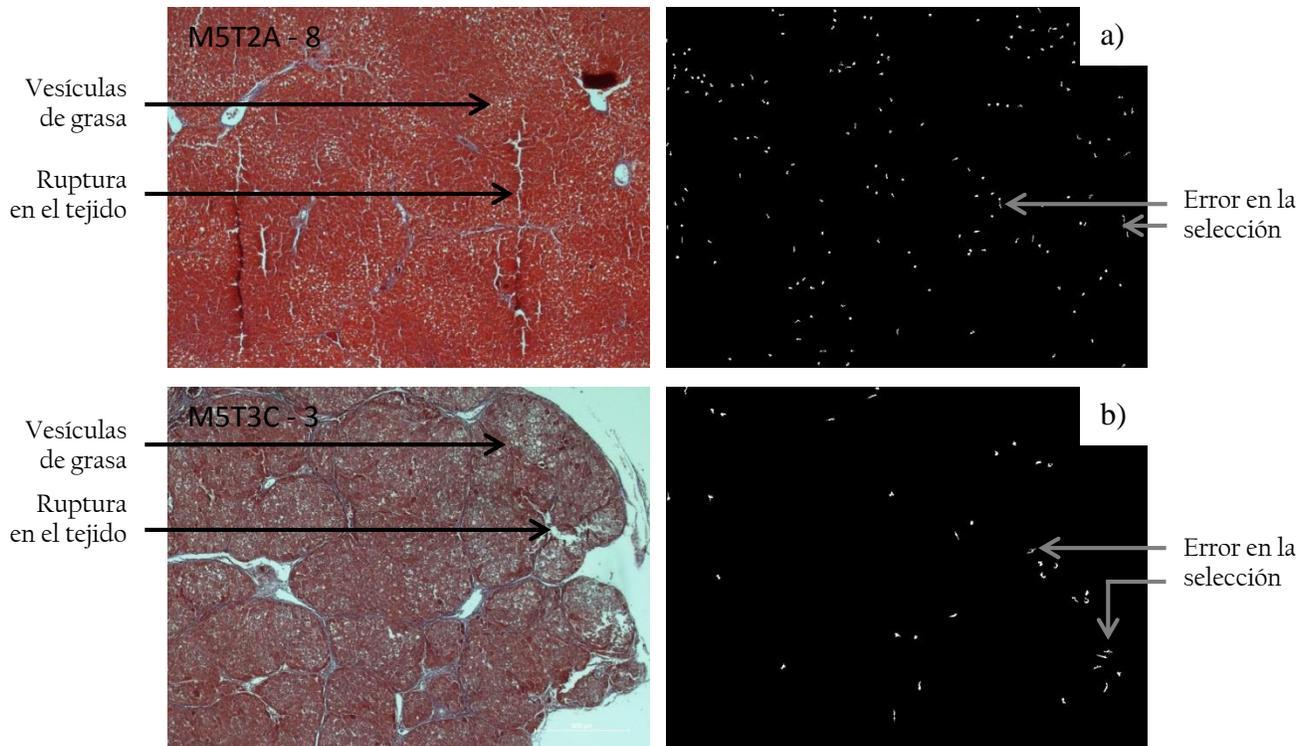


Figura 25. Imágenes problema para el programa de cuantificación de esteatosis

Tabla 7. Resultados de la estimación del porcentaje de esteatosis utilizando herramientas morfométricas

Datos del individuo		Resultados de la estimación del porcentaje de esteatosis	
Grupo	Nombre	Media	Desviación Estándar
T1	A	0.11	0.05
	B	0.07	0.03
	C	0.21	0.13
	D	0.43	0.22
T2	A	0.39	0.20
	B	0.87	0.41
	C	0.20	0.09
	D	0.72	0.61
T3	A	0.54	0.34
	B	0.20	0.13
	C	0.22	0.12
	D	0.18	0.13
T4	A	0.54	0.25
	B	0.47	0.21
	C	9.76	1.60
	D	0.56	0.27

La Figura 26 muestra la gráfica de caja y bigote de los resultados obtenidos a partir de la agrupación según el diagnóstico Metavir. La dispersión de la estimación de grasa es similar para las fases 1, 2 y 4. En el caso de F3, la dispersión es mucho mayor debido a que, algunas de las imágenes con mayor contabilización de esteatosis fueron diagnosticadas en este estadio, esto es, 8 de las 10 imágenes del individuo T4C superaron el 9.5% de grasa y se evaluaron en F3.

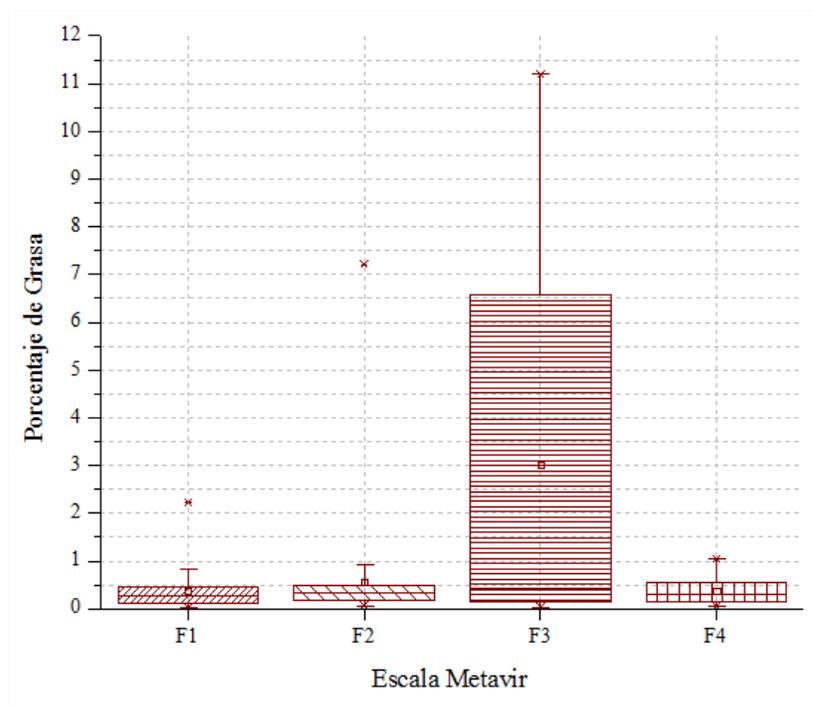


Figura 26. Diagrama de caja y bigote para el porcentaje de esteatosis

4.4. ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN DE FIBROSIS HEPÁTICA

Para el estudio y la caracterización por métodos foto-térmicos del tejido hepático afectado por fibrosis, fue necesario corroborar que la progresión de la enfermedad, según el tiempo de inducción en el modelo animal experimental reportado, fuera la esperada. Sin embargo, con la observación continua del tejido hepático colectado, se distingue una heterogeneidad importante de fibrosis entre individuos, entre diferentes lóbulos hepáticos de un mismo individuo e incluso, entre zonas de un mismo lóbulo. Determinar el grado de dispersión es importante para considerar esta disparidad en la caracterización del tejido.

Se realizó un análisis a partir de las imágenes de las laminillas obtenidas. Los resultados de este procedimiento muestran que para el 70% de las imágenes 3 de los 3 evaluadores estuvieron de acuerdo en el diagnóstico; en el 28.75% de los casos uno de los expertos no coincidió con el diagnóstico del resto; mientras que sólo para el 1.25% de las imágenes fue necesaria la evaluación de un cuarto observador para realizar un diagnóstico 2 de 4.

El procedimiento llevado a cabo para decidir el diagnóstico permitió disminuir el error de la opinión del patólogo al evaluar una imagen, debido a su experiencia particular en diagnosticar fibrosis, sin embargo, aún existe el problema de determinar la variación en la distribución propia de la fibrosis hepática. La Figura 27 muestra el conteo de diagnósticos Metavir (frecuencia) dados para cada tiempo de inducción del tejido hepático. La distribución de los datos de fibrosis se traslapa en tiempos contiguos, especialmente para T3 y T4, casos para los cuales el conteo de casos del resultado Metavir son muy parecidos. Se observa que en T3 hay evaluaciones en las cuatro fases Metavir. En los otros tres grupos existen diagnósticos de fibrosis de fases diferentes. Si bien, en T4, la cantidad de diagnósticos es predominante para F4, se encontraron escasos casos incluso en F1.

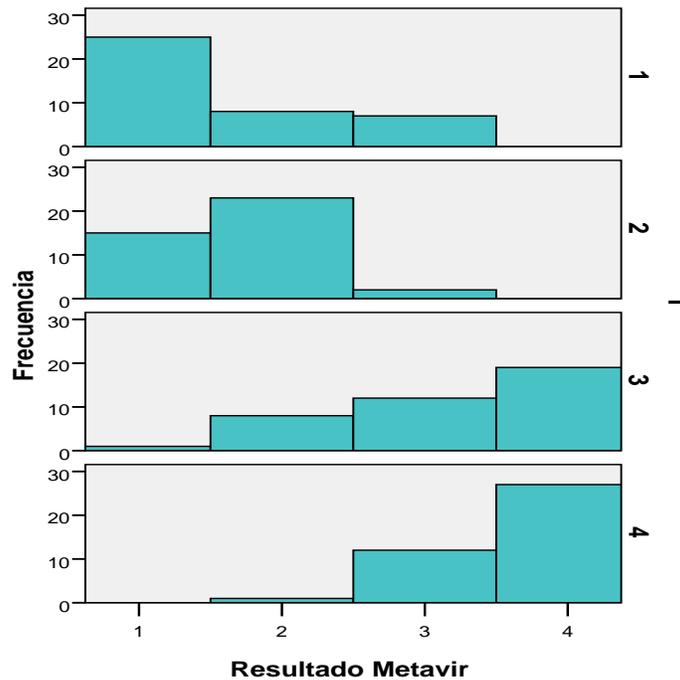


Figura 27. Distribución de la evaluación de fibrosis por tiempo de inducción

De igual forma, es necesario determinar y considerar la variación entre diagnósticos correspondientes a una misma laminilla. Para ello se calculó la desviación estándar, σ , considerando

las diez evaluaciones por laminilla. Los resultados van desde $\sigma = 0$, para 2 de las 16 laminillas, esto es, en poco más del 12% se determinó un diagnóstico único de fibrosis; hasta una $\sigma_z > 0.48$ en 9 casos, es decir, en más del 56% de los casos, la evaluación de los expertos fue diferente de la moda de la laminilla para, al menos, 4 de las 10 imágenes.

Las evaluaciones Metavir de cada rata se graficaron en un diagrama de caja y bigote, agrupándolos según el tiempo de inducción, T. En la Figura 28, se observan numerosos datos fuera del comportamiento esperado, lo que contribuye directamente al incremento de dispersión para los diferentes grupos de inducción, es de notar que la rata B del grupo T1 tuvo mayor dispersión de los datos, presentando un rango inter-cuartil igual a 2, tomando evaluaciones predominantemente en F3, cuando en realidad se esperaba una diagnóstico F1. Se puede apreciar que el grupo T3 es altamente disperso.

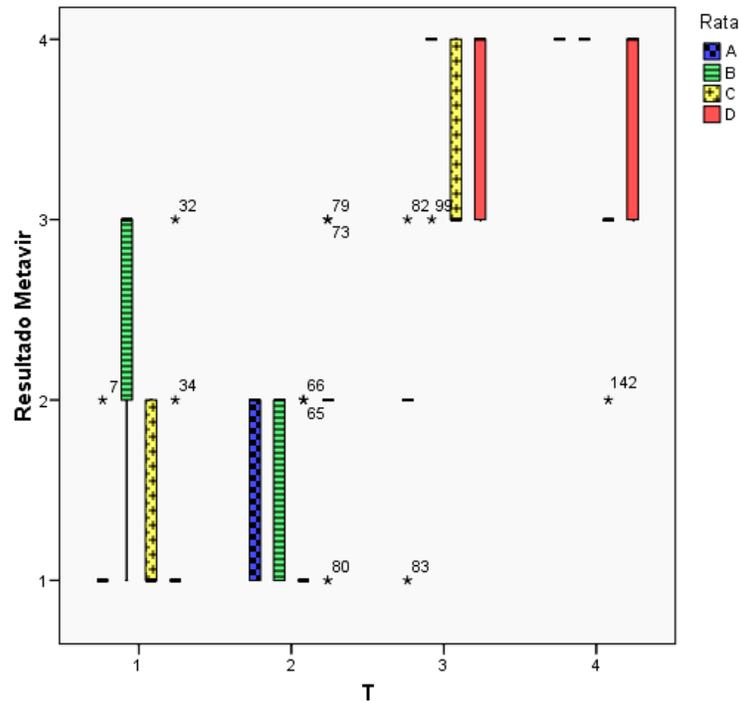


Figura 28. Dispersión de diagnósticos Metavir para el Grupo T1 por individuo

Las observaciones revelan la heterogeneidad de la patología y sugieren un alto grado de variación en la progresión de la enfermedad entre individuos, así como una dispersión significativa de la fibrosis en las diferentes zonas hepáticas. Existe dispersión de fibrosis entre zonas hepáticas, individuos y tiempos de inducción diferentes.

4.5 DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS UTILIZANDO EL ENFOQUE LÓGICO COMBINATORIO

Una vez diagnosticadas todas las muestras de tejido hepático en la escala Metavir, se aplicó el enfoque lógico combinatorio. Para ello, se hizo uso de los resultados obtenidos a partir de las mediciones con el sensor de flujo de calor, de la cuantificación de fibrosis y esteatosis hepática y de la ganancia de peso, calculada como la diferencia entre el peso registrado en el sacrificio de la rata y el que tenía al inicio de la inducción.

4.5.1 Modelo Matemático para el Cálculo de la Fibrosis

Variables. Se definieron 7 variables para la descripción de cada individuo. Para establecer el rango de valores admisibles se graficó por individuo cada variable. La variable “tiempo de inducción”, se encuentra definida ya en cuatro grupos, según las semanas programadas para el modelo animal (Tabla 3).

En la Figura 29, se muestra la gráfica obtenida de la ganancia de peso. Se determinó que, por medio de los cuatro grupos con límites superiores en 35, 70, 105 y 140 [g], es posible representar a esta variable.

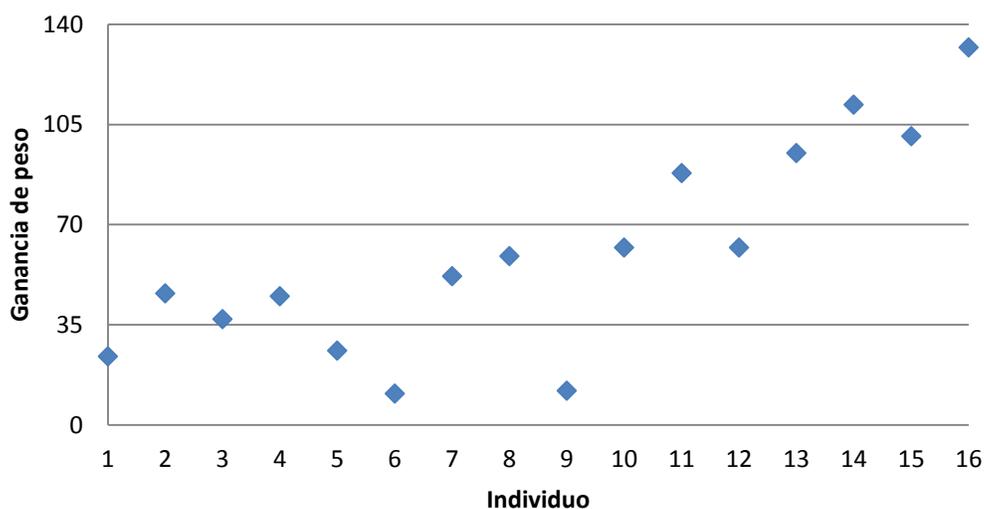


Figura 29. Ganancia de peso por individuo

En la Figura 30, se graficó la variable “potencia referenciada”. Para definir el conjunto de los valores admisibles de esta variable se realizó el promedio de la diferencia que existe entre la

respuesta del sensor, en el periodo de calentamiento para cada individuo con respecto al grupo control. Se determinó que, por medio de los seis grupos con límites superiores en 7.5, 15, 22.5, 30, 37.5 y 45×10^{-3} , es posible representar a esta variable.

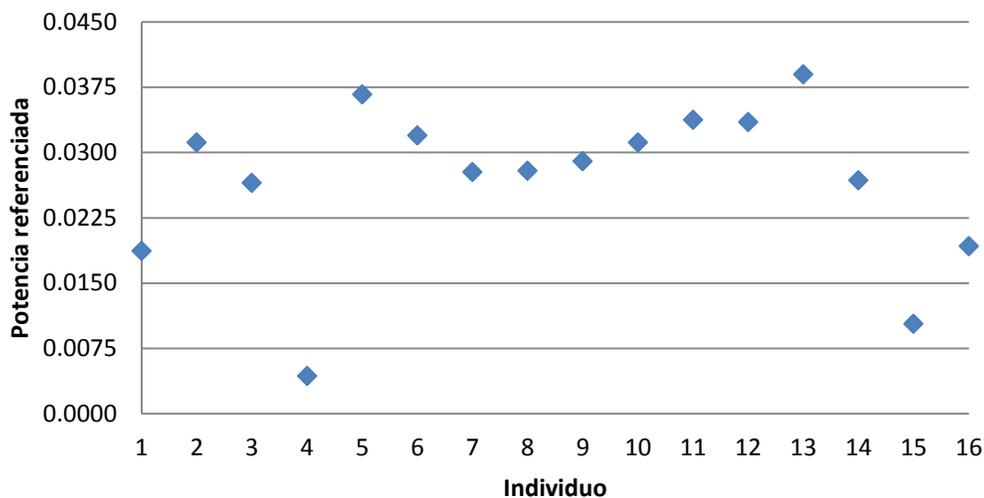


Figura 30. Diferencia de potencia normalizada por individuo

Para el porcentaje de fibrosis, graficado en la Figura 31, se definieron tres grupos con límites superiores en 2, 4 y 6%.

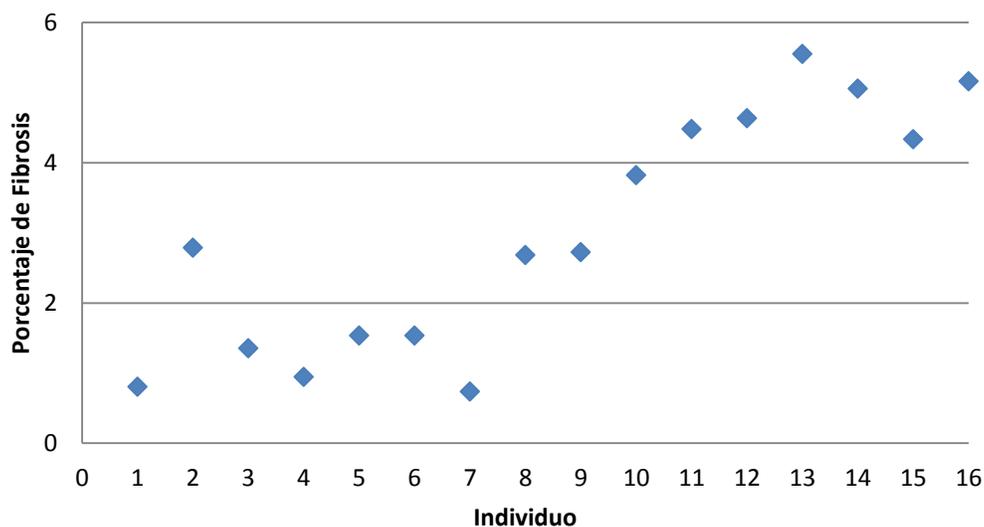


Figura 31. Porcentaje de fibrosis por individuo

La desviación estándar del porcentaje de fibrosis, graficada en la Figura 32, se expresó por medio de tres grupos, con límites superiores en 0.5, 1 y 1.5.

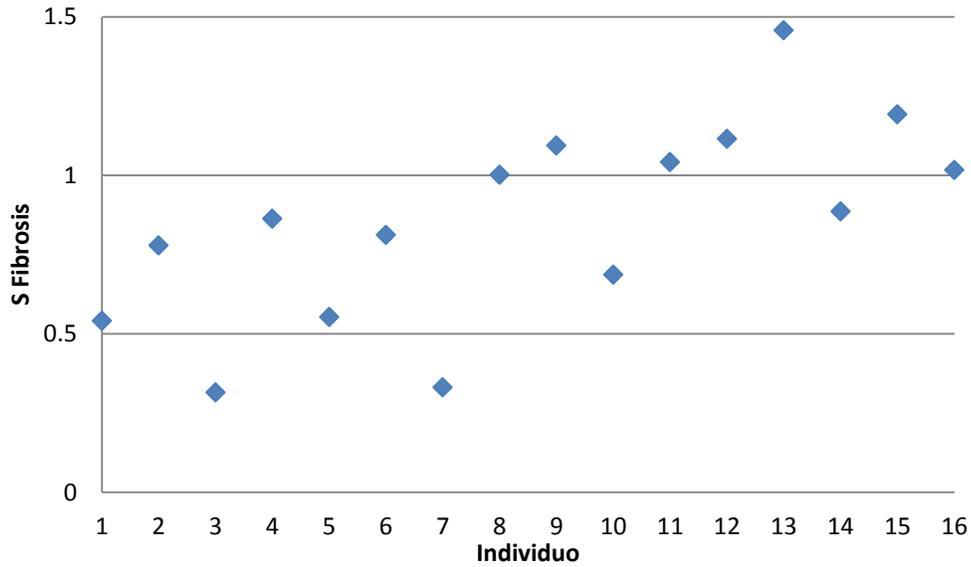


Figura 32. Desviación estándar del porcentaje de fibrosis por individuo

La variable “porcentaje de grasa”, se definió mediante tres grupos con límites superiores en 0.4, 1.2 y 10. La Figura 33 muestra esta distribución.

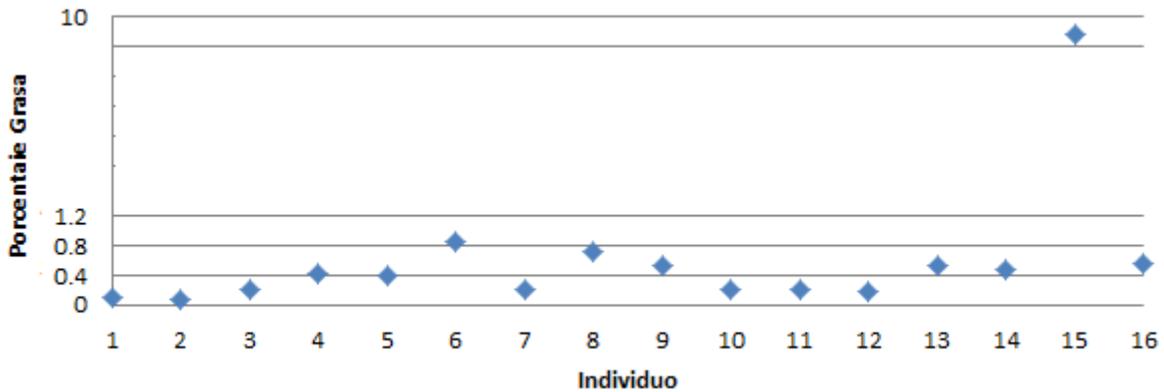


Figura 33. Porcentaje de grasa por individuo

Finalmente, la desviación estándar del porcentaje de grasa por individuo se graficó en la Figura 34, agrupándose en tres intervalos con límites superiores en 0.35, 0.7 y 1.75.

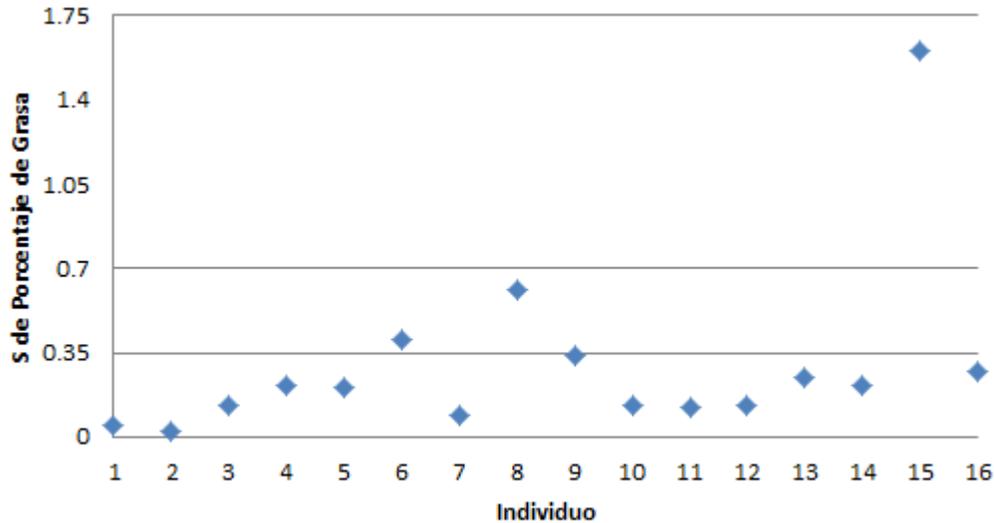


Figura 34. Desviación estándar del porcentaje de grasa por individuo

Criterio de comparación. Para todas las variables se definió un criterio de comparación, C_i , que denota la diferencia que existe entre los valores admisibles, M_i , por cada variable V_i . Estos valores se presentan en la Tabla 8. Cabe resaltar que, para algunas variables, la diferencia máxima entre dos individuos no es uno; tal es el caso del Tiempo de Inducción (V_2), que expresa una diferencia máxima, al comparar los tiempos 1 y 4, igual a 0.69. Recordemos que en la metodología para la inducción de fibrosis (Epígrafe 3.1, Tabla 3) fueron consideradas 13 semanas como tiempo de inducción para el grupo más avanzado en fibrosis, T4; por ello, se utilizó el factor $1/13$ para determinar la diferencia numérica entre los tiempos. Por ejemplo, entre el grupo T1, que equivale a 4 semanas de inducción, y el grupo T4, de 13 semanas, existe una diferencia de 9 semanas, así la diferencia numérica entre estos dos grupos es $9 \cdot (1/13) = 0.69$. Para el caso de la variable Potencia Referenciada (V_3), la diferencia máxima mostrada en los criterios de comparación es 0.83; esto se estableció así ya que existe un grupo de ratas dentro del modelo animal al que no se le indujo fibrosis (grupo control) y este representaría un mínimo de haber sido incorporado en la matriz de aprendizaje. De manera similar, la máxima diferencia en los criterios de comparación para las variables Media del porcentaje de grasa (V_6) y Desviación del porcentaje (V_7) de grasa, no es uno ya que existe la posibilidad de encontrar un mínimo para estas variables de haber hecho la cuantificación en el grupo control. Se asocia también la ponderación para cada variable, ρ_i , establecida de manera conjunta en el equipo de trabajo que consiste en tres expertos en el área de la estructura y función hepática y dos expertos en el área de la medición y sensado de variables físicas.

Tabla 8. Variables, ponderación, dominio y criterio de comparación

Variable, V_i	ρ_i	Valores admisibles, M_i	Criterio de comparación, C_i																																																	
V_1 Ganancia de peso	0.25	[1,4]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_1</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.3</td> <td>0.7</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.3</td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_1	1	2	3	4	1	0	0.3	0.7	1	2		0	0.3	0.7	3			0	0.3	4				0																								
C_1	1	2	3	4																																																
1	0	0.3	0.7	1																																																
2		0	0.3	0.7																																																
3			0	0.3																																																
4				0																																																
V_2 Tiempo de inducción	0.25	[1,4]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_2</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.15</td> <td>0.46</td> <td>0.69</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td>0.31</td> <td>0.54</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_2	1	2	3	4	1	0	0.15	0.46	0.69	2			0.31	0.54	3			0	0.23	4				0																								
C_2	1	2	3	4																																																
1	0	0.15	0.46	0.69																																																
2			0.31	0.54																																																
3			0	0.23																																																
4				0																																																
V_3 Potencia referenciada (resultado del sensor)	0.1	[1,6]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_3</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.17</td> <td>0.33</td> <td>0.5</td> <td>0.67</td> <td>0.83</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.17</td> <td>0.33</td> <td>0.5</td> <td>0.67</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> <td>0.17</td> <td>0.33</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0</td> <td>0.17</td> <td>0.33</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0</td> <td>0.17</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_3	1	2	3	4	5	6	1	0	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	2		0	0.17	0.33	0.5	0.67	3			0	0.17	0.33	0.5	4				0	0.17	0.33	5					0	0.17	6						0
C_3	1	2	3	4	5	6																																														
1	0	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83																																														
2		0	0.17	0.33	0.5	0.67																																														
3			0	0.17	0.33	0.5																																														
4				0	0.17	0.33																																														
5					0	0.17																																														
6						0																																														
V_4 Media de % fibrosis	0.2	[1,3]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_4</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.5</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_4	1	2	3	1	0	0.5	1	2		0	0.5	3			0																																	
C_4	1	2	3																																																	
1	0	0.5	1																																																	
2		0	0.5																																																	
3			0																																																	
V_5 Desviación de % fibrosis	0.05	[1,3]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_5</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.5</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_5	1	2	3	1	0	0.5	1	2		0	0.5	3			0																																	
C_5	1	2	3																																																	
1	0	0.5	1																																																	
2		0	0.5																																																	
3			0																																																	
V_6 Media de % grasa	0.1	[1,3]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_6</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.08</td> <td>0.96</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.92</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_6	1	2	3	1	0	0.08	0.96	2		0	0.92	3			0																																	
C_6	1	2	3																																																	
1	0	0.08	0.96																																																	
2		0	0.92																																																	
3			0																																																	
V_7 Desviación de % grasa	0.05	[1,3]	<table border="1"> <thead> <tr> <th>C_7</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0.2</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td>0</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	C_7	1	2	3	1	0	0.2	0.8	2		0	0.4	3			0																																	
C_7	1	2	3																																																	
1	0	0.2	0.8																																																	
2		0	0.4																																																	
3			0																																																	

Se puede notar que las variables con mayor peso dentro de la función de comparación serán la ganancia de peso y el tiempo de inducción, esto ya que son variables independientes que determinan el resultado de las otras. El porcentaje de fibrosis obtuvo un valor alto de ponderación porque es un parámetro cuantitativo directamente relacionado con el fenómeno que se desea estudiar.

Con las variables mencionadas anteriormente, la descripción de cada individuo tomará la forma:

$$D(R_i) = (\text{Ganancia de peso, Tiempo de inducción, Potencia Referenciada, Porcentaje de Fibrosis, } \sigma \text{ Porcentaje de Fibrosis, Porcentaje de Grasa, } \sigma \text{ Porcentaje de Grasa})$$

Por lo tanto, la función de semejanza definida en el epígrafe 3.5.2 tomará la forma:

$$\begin{aligned} \beta(I(R_j)I(R_r)) &= 1 - [0.25C_1(V_1(R_j), V_1(R_r)) + 0.25C_2(V_2(R_j), V_2(R_r)) \\ &+ 0.1C_3(V_3(R_j), V_3(R_r)) + 0.2C_4(V_4(R_j), V_4(R_r)) + 0.05C_5(V_5(R_j), V_5(R_r)) \\ &+ 0.1C_6(V_6(R_j), V_6(R_r)) + 0.05C_7(V_7(R_j), V_7(R_r))] \end{aligned}$$

4.5.2 Matriz de Aprendizaje con Evaluación Metavir

Para definir las clases de la matriz de aprendizaje (MA) se utilizó la moda de las evaluaciones Metavir, esto es, la Clase 1 corresponde a la Fase 1, la Clase 2 a la Fase 2, y así de manera sucesiva. La muestra constó de las 16 ratas inducidas con fibrosis (Epígrafe 3.1) y la MA quedó conformada con 12 individuos distribuidos en las clases como se muestra en la Tabla 9. Los individuos a clasificar (muestra de control) fueron T1B, T2C, T3D y T4C; ya que presentan mayores inconsistencias entre el progreso de fibrosis real y el esperado; es decir, la rata T1B se diagnosticó por los expertos como F3 cuando se esperaba un estadio F1 y la rata T2C tuvo un diagnóstico F1, siendo que se le indujo para avanzar a un grado F2. La clasificación del algoritmo resultó correcta para uno de cuatro individuos (Tabla 9). El individuo T2C fue el único correctamente clasificado en F1 (resaltado en verde).

Tabla 9. Resultados de la clasificación con evaluación Metavir

		Individuo a clasificar			
Clase	Individuo	T1B	T2C	T3D	T4C
F1	T1A	0.78	0.84	0.54	0.28
	T1C	0.86	0.96	0.62	0.33
	T1D	0.83	0.88	0.58	0.37
F2	T2A	0.78	0.88	0.62	0.29
	T2B	0.76	0.86	0.60	0.31
	T2D	0.90	0.83	0.79	0.54
	T3A	0.75	0.68	0.79	0.51
F3	T3C	0.68	0.57	0.92	0.76
F4	T3B	0.88	0.78	0.88	0.55
	T4A	0.59	0.49	0.84	0.80
	T4B	0.54	0.47	0.73	0.73
	T4D	0.50	0.43	0.74	0.77

Los resultados de la clasificación colocan al individuo T1B en la clase F2, cuando en realidad fue diagnosticado por los expertos como F3. La descripción del individuo, en función a las variables citadas es:

$$R_{T1B} = (46, 1, 0.0312, 2.79, 0.78, 0.068, 0.027)$$

Categorizando las variables dentro de los rangos establecidos

$$R_{T1B} = (2, 1, 5, 2, 2, 1, 1)$$

Se puede notar que las dos primeras variables, las de mayor peso en la función de semejanza, corresponden a los rangos iniciales, es decir, considerando que este individuo fue sometido a un tiempo de inducción T1, es de esperarse que la aportación de esta variable sugiera una clasificación inferior a la esperada, así como en la ganancia de peso.

El individuo T3D obtuvo el voto más significativo para la clase F3, siendo que fue diagnosticado en F4. La descripción del individuo, es:

$$R_{T3D} = (62, 3, 0.0335, 4.633, 1.115, 0.1823, 0.1335)$$

Categorizando las variables dentro de los rangos establecidos

$$R_{T3D} = (2, 3, 5, 3, 3, 1, 1)$$

Para este caso, se observa que las variables Ganancia de Peso y Tiempo de Inducción, que tienen mayor peso dentro de la función de semejanza, indican pertenencia a una clase inferior.

El individuo T4C obtuvo el voto más significativo para la clase F4, siendo que fue diagnosticado en F3. La descripción del individuo, es:

$$R_{T4C} = (101, 4, 0.0104, 4.337, 1.1925, 9.763, 1.6045)$$

Categorizando las variables dentro de los rangos establecidos

$$R_{T4C} = (3, 4, 2, 3, 3, 3, 3)$$

El comportamiento de la rata T4C, en cuanto a la cantidad de esteatosis observada, es completamente atípico. El promedio de los individuos en el grupo T4, sin considerar este caso, es de 0.527% de grasa por imagen, es decir, T4C tiene casi 19 veces más grasa que el resto de las ratas que compartieron el mismo tiempo de inducción. Es probable que este hecho afectara el resto de los parámetros, como la respuesta del Sensor de Flujo de Calor y el porcentaje de fibrosis detectado. Con respecto a esta última variable, es importante mencionar que comúnmente, en los casos que presentan esteatosis abundante, se encuentran un patrón de fibrosis peri-celular (coloquialmente llamado “*chicken wire*”), esta estructura pudo influir en la cuantificación de fibrosis realizada por el *software* diseñado.

Con estos resultados es posible concluir que las variables consideradas no aportan la información suficiente para discriminar correctamente la evolución de la fibrosis hepática, ya que se tuvo un 25% de aciertos en la clasificación. Por otro lado, cabe resaltar que el diagnóstico basado en la escala Metavir, se fundamenta en distinguir patrones morfológicos, que no necesariamente están relacionados con la cantidad de fibrosis, y por lo tanto podría no ser un buen parámetro para definir las clases de la Matriz de Aprendizaje, dada la naturaleza física de las variables consideradas para el diseño de la función de semejanza. Es por esto, que se propone una forma diferente para definir las clases, como se explicará a continuación.

4.5.3 Matriz de Aprendizaje con Porcentaje de Fibrosis

Debido a la limitada capacidad para diferenciar y clasificar a cada rata en su estadio correcto, se implementó una versión modificada de la MA, utilizando como criterio el porcentaje de fibrosis para conformar las clases, ya que esta variable está cuantitativamente relacionada con el problema que se desea estudiar y se mide en una escala continua. La Clase 1 corresponde al intervalo 0-2%, la Clase 2 a 2.1-4% y la Clase 3 va de 4.1 a 6% del promedio de fibrosis por individuo. De esta forma se incorporó el diagnóstico Metavir dentro de las variables que describen a cada rata, asignando una ponderación a esta variable de 0.2.

Se seleccionaron nuevamente a los individuos T1B, T2C, T3D y T4C para ser clasificados; el resto se utilizó para formar la Matriz de Aprendizaje. La descripción de cada individuo estará dada por:

$$D(R) = (\text{Ganancia de peso, Tiempo de inducción, Respuesta del sensor, Moda Metavir, Dispersión de Moda Metavir, Porcentaje de Grasa, } \sigma_{\text{Porcentaje de Grasa}})$$

Tabla 10. Resultados de la clasificación con porcentaje de fibrosis

		Individuo a clasificar			
Clase	Individuo	T1B	T2C	T3D	T4C
Fibrosis baja	T1A	0.71	0.85	0.55	0.37
	T1C	0.83	0.96	0.67	0.42
	T1D	0.79	0.89	0.59	0.42
	T2A	0.80	0.82	0.72	0.44
	T2B	0.78	0.80	0.70	0.46
Fibrosis media	T2D	0.85	0.90	0.77	0.56
	T3A	0.70	0.75	0.77	0.54
	T3B	0.77	0.69	0.98	0.59
Fibrosis alta	T3C	0.79	0.68	0.84	0.74
	T4A	0.59	0.51	0.80	0.70
	T4B	0.51	0.46	0.72	0.66
	T4D	0.52	0.48	0.74	0.67

En este caso, la clasificación del algoritmo resultó correcta para tres de cuatro individuos (Tabla 10), es decir, tuvo el 75% de acierto. Los individuos T1B, T2C, y T4D fueron clasificados correctamente en la Clase 2, Clase 1 y Clase 3, respectivamente. El individuo T3D obtuvo el voto más significativo para la Clase 2, siendo que pertenece a la Clase 3 con una media de 4.633 en Porcentaje de Fibrosis. La descripción del individuo, es:

$$R_{T3D} = (62, 3, 4, 0.483, 0.0335, 0.1823, 0.1335)$$

Categorizando las variables dentro de los rangos establecidos

$$R_{T3D} = (2, 3, 4, 3, 5, 1, 1)$$

Comparando los resultados con el algoritmo anterior, hay dos elementos que hay que resaltar. Por un lado, el hecho de elegir un parámetro físico, para conformar las clases resulta mejor, dado que la identificación de la fase de fibrosis en la que está un determinado individuo está relacionada con

este tipo de parámetros. El segundo elemento es el método utilizado para la clasificación. La descripción de los individuos en términos de los parámetros físicos y la estrategia de clasificación a partir de la semejanza con los individuos ya clasificados, también resulta una perspectiva distinta y mejor apegada a la realidad. Es decir, el modelo con el enfoque lógico-combinatorio, resultó mejor.

CONCLUSIONES

En esta investigación se realizó un análisis de las alteraciones en las propiedades térmicas de tejido hepático, debido a la progresión de fibrosis, utilizando un método para la caracterización de la conducción térmica, basado en un sensor óptico, y la teoría lógico combinatoria de reconocimiento de patrones. Se trabajó con un modelo animal integrado por cinco grupos de cuatro ratas cada uno. De manera complementaria al estudio, se emplearon metodologías para la evaluación clínica de la fibrosis y técnicas para el procesamiento de imágenes.

Inicialmente, se realizó un diagnóstico de fibrosis, sustentado por tres observadores experimentados, para corroborar el avance real de la enfermedad en cada individuo del modelo. Esta evaluación, sugeriría una reclasificación ya que se observa una heterogeneidad en los grupos, según el tiempo de inducción. Por ejemplo, resalta especialmente el individuo B del grupo T1 ya que su desviación estándar es la más alta de todos, con un valor de $\sigma = 0.71$, y su evaluación Metavir fue F3, siendo que recibió 4 semanas de tratamiento para la inducción, es decir, se esperaba una evaluación F1. En el grupo T4 se encuentran los dos individuos cuyas desviaciones estándar fueron menores ($\sigma = 0$), es decir, el diagnóstico para ellos fue contundente en F4. El grupo T3 resulta gravemente influido por la variación en la progresión de fibrosis ya que se encontró que únicamente una de las cuatro ratas que lo conforman evolucionó en F3; en el resto de los grupos tres de las cuatro ratas alcanzaron el estadio esperado. El promedio de la desviación estándar para los grupos T1, T2, T3 y T4 fue igual a 0.55, 0.49, 0.44 y 0.2, respectivamente, por lo que puede concluir que el grupo 4 tuvo una evolución de fibrosis más homogénea que el resto de los grupos. Se encontró que los individuos con menos desviación estándar de la evaluación fueron aquellos con menor peso en el grupo T4, sin embargo, en otros grupos no se encontró una relación con entre el peso y la evaluación Metavir. Por otro lado, este análisis permitió también determinar que existe una congruencia de opiniones entre los expertos en el 70% de los casos, es decir, si bien este método de evaluación ayuda a disminuir la incertidumbre debida al observador, en un 30% de los casos hay un margen de error en el diagnóstico.

Las mediciones para la caracterización de la conducción térmica se agruparon primero según el diagnóstico Metavir de cada individuo. En este análisis se encontró una diferencia de hasta el 1.1% en las respuestas del sensor para los individuos diagnosticados en F1, 2.5% para F2, 3.9% para F3 y 2.4% para F4. Posteriormente se presentó una agrupación de las respuestas del sensor por medio de

la promediación, según el diagnóstico Metavir, de todas las muestras, sin encontrar una congruencia en el comportamiento según el grado de avance. Finalmente se buscaron diferencias en la respuestas de conducción únicamente para aquellos individuos con menor dispersión en el diagnóstico, esto es, se seleccionaron las respuestas de T1A para la Fase 1, F1, T3A para F2, T3D para F3 y T4B para F4; y se encontró que a mayor desarrollo de fibrosis en muestras hepáticas, mayor es la conductividad térmica de las muestras, calculando una diferencia del 3% entre las curvas de F1 y F4.

Con respecto a la cuantificación de hallazgos histopatológicos, se realizó el conteo de la fibrosis y la esteatosis hepática. En el caso del conteo de la fibrosis, se encontraron valores que van de 0.21% hasta 1.66% para los individuos diagnosticados en F1, de 1.03% hasta 3.5% para F2, de 2.26 hasta 6.68% para F3 y de 3.0.8 hasta 7.75% para F4. De estos resultados es posible observar que la cantidad de fibrosis tiene un aumento progresivo conforme a la evolución de la enfermedad. Con respecto a los resultados de la cuantificación de esteatosis, se obtuvieron resultados acotados entre 0.06 y 0.87 % para 15 de los 16 individuos del modelo animal. Solamente en un individuo se contabilizó un valor atípico de 9.76%. No se encontró una correlación entre esta afección y las otras variables adquiridas.

Por otro lado, el enfoque lógico combinatorio se aplicó con dos esquemas, uno donde la definición de las clases se hizo con el diagnóstico de la escala Metavir y el otro utilizando el porcentaje de fibrosis. En el primero, la función de semejanza se definió a partir de siete variables para cada individuo: el tiempo de inducción con CCl₄, la ganancia de peso, la potencia referenciada resultado de las pruebas con el sensor, el porcentaje de fibrosis, el porcentaje grasa y las desviaciones estándar de estas dos últimas variables. Se encontró un 25% de acierto en esta clasificación.

Como resultado de aplicar el segundo esquema, con el porcentaje de fibrosis como clasificador, se obtuvo un 75% de acierto. Si bien, la muestra fue limitada, pues 16 individuos no son representativos para el estudio de este enfoque en un modelo animal, es posible que estos resultados se justifiquen de dos formas, la primera, es que la variable Metavir, utilizada en un inicio para definir las clases, es de tipo ordinal y cualitativa y pretendía diferenciar a individuos definidos con variables físicas cuantitativas; es por ello, que se obtuvo un resultado de clasificación más favorable cuando se utilizó el porcentaje de fibrosis ya que es una medición directa del fenómeno a caracterizar. En este sentido, realizar el cálculo de las propiedades térmicas del tejido, por ejemplo, representaría una herramienta útil para diseñar una función de comparación capaz para definir

certeramente los estadios del tejido. En el diseño de esta función es fundamental considerar la dispersión de fibrosis.

Es importante señalar que, entonces, el estándar de oro para la definición de estadios en la clínica merece complementarse con técnicas de análisis cuantitativo. Validar y calibrar estas nuevas técnicas por medio de la biopsia, y su análisis morfológico al microscopio, puede resultar contraproducente, dada la dispersión de la enfermedad; como se mostró en los resultados de este trabajo. Considerar que en una biopsia se analiza únicamente 1 de 50000 partes del hígado, indica la estricta necesidad de implementar técnicas para la detección de la enfermedad que abarquen un estudio de muestras de manera más representativa, sobre todo para facilitar el diagnóstico de este padecimiento y poder llegar a un tratamiento oportuno, posible únicamente en las fases primarias de la fibrosis.

Como resultado de los hallazgos encontrados durante esta investigación y con base a los índices de mortalidad en México debido a este padecimiento, es posible concluir la importancia del estudio y caracterización de los estadios de la fibrosis hepática para contribuir al desarrollo de herramientas que proporcionen una evaluación certera y precisa, además del desarrollo de alternativas no invasivas y con alta sensibilidad para el diagnóstico y clasificación de esta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robbins L. (1990). Patología estructural y funcional. Madrid: McGraw-Hill.
2. Mokdad A., D' Lopez A., Shahrzaz S., Lozano R., Stanaway J., Murray C. & Naghavi M. (2014). Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. BMC Medicine, Vol. 145: 6-30.
3. Bustios C., Dávalos M., Román R. & Zumaeta E. (2007). Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM. Revista de Gastroenterología del Perú, Vol. 27 (3): 42-51.
4. Mormone E., George J. & Nieto N. (2011). Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. Chemico-Biological Interactions, Vol. 193: 225-231.
5. Glasinovic R. (2001). Fisiopatología de la fibrosis hepática. Escuela de Medicina, curso integrado de Clínicas médico-quirúrgicas. Consultado en Julio, 2015. Sitio web: <http://escuela.med.puc.cl/.../FibrosisHepatica.html>
6. Lee U. & Friedman S. (2011). Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. Official Journal of the AGA Institute. Gastroenterology, Vol. 25(2): 195-206.
7. Bedossa P. & Carrat F. (2009). Liver Biopsy: The best, not the gold standard. Journal of Hepatology, Vol. 50: 11-13.
8. Ausina V. & Moreno S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana.
9. Ishak K., Anthony P., Nayak N., Poulsen H., Scheuer P. & Sobin L. (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. Journal of Clinical Pathology, Vol 31: 395-414.
10. Narro J., Gutiérrez J., López M., Borges G. & Rosovsky H. (1992). La mortalidad por cirrosis hepática en México: Características epidemiológicas relevantes. Salud Pública de México, Vol 34 (4): 378-387.
11. Salud: México 2006. Informe para la rendición de cuentas. Secretaría de Salud, pp: 46-48. <http://www.salud.gob.mx/unidades/evaluacion/saludmex2006/SM06.pdf>
12. Lefton H., Rosa A. & Cohen M. (1999). Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. Medical Clinics of North America. Vol 93: 787-99.

13. García L., González M. & Moreno R. (2012). Cirrosis hepática. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, Vol. 11: 625-633.
14. Méndez N., Villa A., Chávez N., Ponciano G., Almeda P., González D. & Uribe M. (2005). Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Annals of Hepatology*, Vol 4 (1): 52-57.
15. Quiroz E., Flores Y., Aracena B., Granados V., Salmerón J., Pérez R., Cabrera G. & Bastani R. (2010). Estimating the cost of treating patients with liver cirrhosis at the Mexican Social Security Institute. *Salud Pública de México*, Vol. 56 (6): 493-501.
16. Valvano J., Cochran J. & Diller K. (1984). Thermal conductivity and diffusivity of biomaterials measured with self-heated thermistors. *International Journal of Thermophysics*, Vol. 6(3): 311-328.
17. Milner T. & Goodman D. (1996). Noncontact determination of thermal diffusivity in biomaterials using infrared imaging radiometry. *Journal of biomedical optics*, pp: 92-97.
18. Liu J., Zhou Y. & Deng Z. (2002). Sinusoidal Heating Method to Noninvasively Measure Tissue Perfusion. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 49 (8): 867-877.
19. Qiu L., Zheng X., Zhu J. & Tang D. (2011). Non-destructive measurement of thermal effusivity of a solid and liquid using a freestanding serpentine sensor-based 3ω technique. *Review of Scientific Instruments*, Vol. 82: 86-110.
20. Cadena O. & Correa R. (2007). Diseño y Construcción de Prototipo para medición de Flujo de Calor aplicando Calorimetría Directa: Sensado por Flujo de Calor. *DYNA*, Vol. 75: 181-184.
21. Bhavaraju N., Cao H. & Yuan D. (2001). Measurement of directional thermal properties of biomaterials. *IEEE Transactions on Biomedical Engineerig*, Vol. 48(2): 261-267.
22. Chun J., Oh S., Lee S. & Moohwan K. (1999). Design and Fabrication of Micro Heat Flux Sensor. *Proceedings of the 1999 IEEERSJ, International Conference on Intelligent Robots and Systems*, pp: 1045-1048.
23. Suriñach S., Baro M., Bordas S., Clavaguera N. & Clavaguera-Mora M. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Universidad Autónoma de Barcelona: Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, Vol. 31: 11-17.
24. Escobedo G., et al. (2013). Liver exhibits thermal variations according to the stage of fibrosis progression: A novel use of modulated-differential scanning calorimetry for research in hepatolog. *Hepatology Research*, Vol. 43: 785-794.

25. Gutiérrez, A. (2013). Propiedades térmicas de tejido biológico a partir de mediciones ópticas de flujo de calor utilizando fibra óptica (Tesis de maestría). De la base de datos: Repositorio digital de la Facultad de Ingeniería – UNAM, CCADET.
26. Lazo, E. (2003). Análisis de propiedades térmicas en materiales por medio de Radiometría Foto-térmica Pulsada (Tesis de maestría). De la base de datos: Centro de Investigación y Estudios Avanzados, CINVESTAV, IPN, Unidad Mérida.
27. Giancoli, D. (1997). Física - Principios con Aplicaciones. México: Editorial Prentice Hall.
28. Esplugas S. & Chamarro E. (2005). Fundamentos de transmisión de calor. Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
29. Touloukian Y. (1970). Thermophysical Properties of Matter. Thermal Diffusivity. TPRC data series, Vol. 10: 6.
30. Resnick R., Halliday D. & Krane K. (1995). Física Volumen 1. Madrid: Compañía Editorial.
31. Iannelli, L. & Salvador, G. (2012). Ondas de Calor: Determinación de temperaturas del Pasado. Latin-American Journal of Physics Education, Vol. 6: 82-88.
32. Ibarra, M. (2008). La ecuación del calor de Fourier: Resolución mediante métodos de análisis en variable real y en variable compleja. II Jornada de Investigación en Ingeniería.
33. Bergman T. & Lavine A. (2001). Fundamentals of heat and mass transfer. EUA: John Wiley and Sons. Novena edición, pp. 933-980.
34. Spakovszky S. (2002). Thermodynamics and Propulsion. Sydney: Macquarie University.
35. Ruiz J. Guzmán A. & Martínez J. (2007). Enfoque Lógico Combinatorio al Reconocimiento de Patrones. México, Centro de Investigación en Computación: Instituto Politécnico Nacional.
36. Ortiz M., Martínez J. & Ruiz J. (1996). A new approach to differential diagnosis of diseases. International Journal of Bio-Medical Computing, Vol. 40 (3): 179 - 185.
37. Ortiz M., Vega L. & Maya J. (2000). A New Approach to classify Cleft Lip and Palate. The Cleft Palate-Craniofacial Journal, Vol. 38: 545 - 550.
38. Ortiz M., Vega L. & Toni B. (2009). A mathematical function to evaluate surgical complexity of cleft lip and palate. Computer Methods and Programs in Biomedicine, Vol. 94: 232 - 238.
39. Kuri F. & Ortiz M. (2003). A computational tool for the prognosis of the rehabilitation of patients with cleft palate. Proceedings of the 5th Iberoamerican Symposium on Pattern Recognition, Parte 1: 599 - 608.

40. Ortíz M., Vega L. & Toni B. (2004). A similarity function to evaluate the orthodontic condition in patients with cleft lip and palate. *Medical Hypotheses*, Vol. 63 (1): 35 - 41.
41. Ortiz M. & Lazo M. (2002). A Mathematical Model to Evaluate the Speaking of Patients with Cleft Palate. *Proceedings of the 2th European Medical & Biological Engineering Conference*.
42. Ortíz M., Pantaleao C. & Bose R. (2004). A Mathematical Model for Classical Chromosome Identification Using the Logical Combinatory Approach. *Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp: 1342-1345.
43. Manibusan M., Odin M. & Eastmond A. (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carginog. Ecotoxicol. Review*. Vol. 25(3): 185-209.
44. Jang J., Kang K., Kim Y., Kang Y. & Lee I. (2008). Reevaluation of Experimental Model of Hepatic Fibrosis induced by Hepatotoxic Drugs: An Easy, Applicable and Reproducible Model. *Transplantation Proceedings*. Vol. 40: 2700-2703.
45. Tomasi, V. (2008). Fijación de Muestras Biológicas. *Educación Histotecnología*. Sitio web: <http://educacionhistotecnologiafijacion.blogspot.mx>
46. Möller Bredo, Richard, & Vazquez Odo, Noelia. (2011). Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, Vol. 29 (1): 76-79.
47. Rosales A. (2010). Propuesta para la Creación de Centros Autosuficientes de Imágenes Médicas para Establecimientos de la Caja Costarricense del Seguro Social (Tesis de Maestría). De la base de datos: TESISUAMI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Posgrado en Ingeniería Biomédica.

APÉNDICE A. TRABAJOS PUBLICADOS

A continuación se presenta el trabajo que lleva por título “*Fibrosis evaluation of animal liver tissue by thermal conduction*”, presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, CLAIB, realizado en la ciudad de Bucaramanga, Colombia del 26 al 28 de Octubre de 2016.

En este evento, el trabajo fue reconocido con el premio al mejor trabajo en modalidad Maestría, ofrecido por la Federación Internacional de Ingeniería en Medicina y Biología, IFMBE.

Fibrosis evaluation of animal liver tissue by thermal conduction

N. Alemán-García^{1,2}, A. Pérez-García³, J. Sánchez-Melecio³, F. Silva-Aguilera³, E. Gutiérrez-Herrera⁴, M.R. Ortiz-Posadas¹, J. Hernández-Ruiz³, D.

Kershenovich⁵ and C. Sánchez-Pérez².

¹ Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Electrical Engineering Department, Mexico City, Mexico

² Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, CCADET. Mexico City, Mexico

³ Unidad de Medicina Experimental, HIPAM, UNAM, Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

⁴ Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico, CCADET-UNAM-Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

⁵ Dirección General, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Abstract— Hepatic fibrosis is a condition that alters normal structure and composition of the liver. Long term, it leads to complications such as cirrhosis; an advanced stage of chronic liver diseases, which in turn can drive to hepatocarcinoma (liver cancer). Hence, knowing the fibrosis degree is an important clinical data that can help in the prognosis and treatment of liver diseases. This work is focused in evaluating the thermal performance of 16 samples of rat liver tissue graded in different fibrosis degrees, as an alternate method to know how these properties change as the disease progresses. A heat sensor based on photo-thermal deflection was used. The thermal response was compared to the fibrosis degree in the METAVIR score, as evaluated by a group of experimented observers.

Keywords— Liver fibrosis, Thermal behavior, METAVIR score.

INTRODUCTION

Hepatic fibrosis is a progressive change in the density and composition of the extracellular matrix in the liver parenchyma, which if persists leads to cirrhosis. Environmental and genetic factors have been described to influence its progress, as well as different methods to estimate it [1]. Cirrhosis is a condition where the structure and function of the liver are severely compromised [2]. Hepatic cirrhosis is a disorder with high mortality and morbidity rates. In Mexico, the reported cases of liver cirrhosis increased 7.8% from 2005 to 2006; morbidity is also reported to have increased 6%, hence becoming the third cause of death in the country. Cirrhosis is the second cause of death in the age group of 15-64 years, and the sixth in persons over 65 years [3]. There for the importance of developing auxiliary tools for evaluation and timely and precise progress of liver fibrosis in patient diagnosis.

Characterization of hepatic tissue by its thermal properties is a useful method to study fibrosis, since it alters normal liver structure and function [4]. Thermal properties of biological tissues evaluated by physical parameters can be associated to structural and compositional alterations caused by degenerative processes. Thus, assessing the relevance of the physical properties that define an organ's condition is very helpful to enhance our knowledge on some pathologies and to develop new resources to analyze them. Regarding hepatic fibrosis, recognition of the advance degree is very important to properly establish the prognosis and the therapeutic strategy. Due to the aforementioned, the focus of this work was to evaluate the thermal response of liver tissue from rats with different degrees of fibrosis, in order to better understand how hepatic tissue becomes progressively modified by this condition, so that it can contribute to a more precise diagnostic of the phases of liver diseases.

METHODOLOGY

A. Animal model of fibrosis induction

20 male Wistar rats, 6 weeks of age, 190-220 g. were used. 5 groups of 4 rats each were formed randomly. Fibrosis was induced with a 33% carbon tetrachloride (CCl_4) solution in olive oil at an initial dose of 250 μ l, given intraperitoneally twice a week [5]. After the rats gained 20% of their initial weight, the dose was adjusted weekly to 1 μ l/g. The groups were sacrificed after different periods of induction as described in Table 1.

B. Sampling

After sacrifice, the livers were collected whole and put in 3.8% formaline. Then, a 1 cm wide, 3 cm long and 0.1 to 0.2 cm thick cut was taken from the right medial lobe. This cut was used to perform the heat conduction measurements. Slices of the obtained tissue were histochemically processed with Masson Trichrome stain. The slides were photographed using an optical microscope at 4x. 10 photographs were made of different zones of each slide, meaning that 40 images were made per rat, and that 160 images were analyzed. The analysis was not performed in the control group, since no CCl₄ treatment was given, and therefore, no histopathological findings were expected.

Table 1 Groups of the fibrosis induction model

Group	n	Time of treatment
0 (control)	4	No treatment
T1	4	4 weeks
T2	4	8 weeks
T3	4	12 weeks
T4	4	18 weeks

C. Assessment of fibrosis using the METAVIR score

Each image underwent 3 fibrosis assessments with the METAVIR score [6] which defines five degrees: F0, no fibrosis, F1, portal fibrosis (mild); F2, portal fibrosis with few septa (moderate); F3, fibrosis with numerous septa forming incomplete nodules, (severe), F4, cirrhosis with complete regeneration nodules. This score yields an ordinal qualitative variable, so the mean and the standard deviation (σ) of the assessments was calculated, progressively ranking the values F1=1 to F4=4 in order to have an approach on how scattered the diagnostic could be. The assessments were blinded and independently made by three experienced observers ($\kappa > 0.8$) from the Laboratory of Liver, Pancreas and Motility (HIPAM), of the Experimental Medicine Unit at the General Hospital of Mexico. The final evaluation for each image was obtained by the mode of the three assessments. The conclusive evaluation reported for each rat was made by estimating the mode of the 10 assessed images of each rat's lobe.

D. Assessment of heat conduction

To evaluate the heat conduction of the liver samples, a photo-thermal deflection based heat flow sensor of the Optical Sensors Laboratory of the CCADET-UNAM was used [7]. Photo-thermal effect is achieved when a light beam is deflected from its trajectory to a certain angle by a temperature gradient. An indirect evaluation of the heat flow is obtained from the decrease of the measured power (P_{out}) resulting from the angular deflection of the laser beam. It is important to say that this sensor has been previously used for experimental calibration tests with different biological tissues. [7].

Once the heat conduction responses of the samples were obtained, their changes were analyzed for the different fibrosis stages, comparing them by the time of fibrosis induction and the reported degree of the METAVIR score.

RESULTS

Assessment of fibrosis using the METAVIR score

The results of the fibrosis assessment by three different observers show that from of 160 images, in 70% the three observers concurred in their grading, whereas in 28.7%, one of the experts dissented from the other two, and only in 1.3% of the cases, none of the observers agreed, and a fourth opinion was needed to grade the image.

The grouping and weight at sacrifice of the sampled individuals, as well as the fibrosis assessment by the METAVIR score are shown in Table 2. Noticeably, rat B of the T1 group had the highest standard deviation (σ) among all the samples, yet it was graded F3 with the METAVIR score, despite being inducted for cirrhosis for only 4 weeks, so that it was expected to be F1. The average standard deviation $\bar{\sigma}$ for the groups shows that T4 had a more homogeneous development of fibrosis than the rest. This was obtained because two of the individuals of the group had a σ equal to zero; this is to say that all their images were graded as cirrhosis. Hence, the progression of fibrosis in these individuals was more attached to the expected prognosis at the beginning of the induction process.

Table 2. Grouping, weight at sacrifice and METAVIR assessment of the rats in the heat flow experimental animal model

Group	Individual	Weight [g]	Mod. METAVIR score	σ	$\bar{\sigma}$
T1	A	311	F1 1.1	0.32	0.55
	B	321	F3 2.5	0.71	
	C	335	F1 1.3	0.48	
	D	345	F1 1.3	0.68	
T2	A	311	F2 1.7	0.48	0.49
	B	287	F2 1.7	0.48	
	C	315	F1 1.2	0.42	
	D	340	F2 2.1	0.57	
T3	A	300	F2 2	0.47	0.44
	B	352	F4 3.9	0.32	
	C	378	F3 3.3	0.32	
	D	342	F4 3.7	0.48	
T4	A	372	F4 4.0	0	0.20
	B	382	F4 4.0	0	
	C	386	F3 2.9	0.32	
	D	384	F4 3.7	0.48	

On the other hand, it was observed that in the induction time 4, T4, individuals with the least σ were those with lower weight in this group. However, this is not overwhelming, due to the fact that in other groups we found no relation between weight and the METAVIR evaluation.

Assessment of heat conduction

The measurements of thermal conduction were grouped according to the obtained METAVIR score (Table 2). Four sets of graphics were made, according to the fibrosis grade observed. Then, the curves of the previously described groups were averaged. As observed in Fig.1, the curves do not define a predominant state of fibrosis based on its heat conducting features; thus, this parameter is not determinant to distinguish the phases of the disorder. Likewise, the difference of values between extreme phases was calculated; F1 for mild fibrosis and F4 for cirrhosis, resulting in 0.5%, which is non-significant to discriminate between phases of the disease.

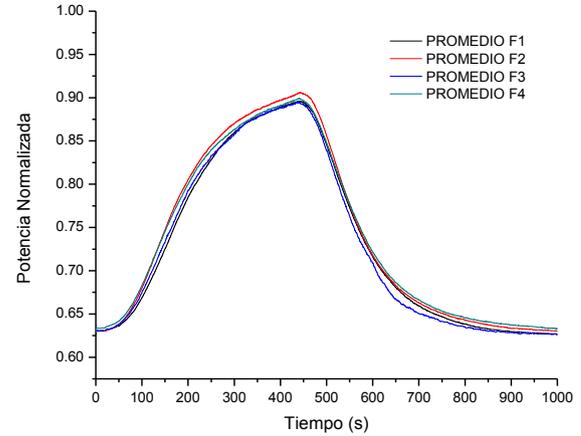


Fig. 1 Average of the sensor response to heat conduction for all the samples at each METAVIR grading.

On the other hand, the individuals with minor standard deviations in the METAVIR assessment were selected using the previously described measures of dispersion (Table 1). Thus, the selected samples were T1A for the F1 phase, T3A for F2, T3C for F3 and T4B for F4 (Figure 2). Same as in the previous case, an analysis of the maximums revealed a difference of 3% between the curves of phase 1 and 4. Moreover, when grouping the individuals with minor dispersion, it can be seen that the highest curve corresponds to the measurement of an F4 cut; followed by one in F3, then in F2 and finally in F1, meaning that the more the fibrosis increases, the more normalized power increments, as a consequence of a greater heat flow. It is very important to point out that the method for normalizing the measured power (P_{out}) takes into account the power monitoring of the laser source (P_{in}) in order to discard possible variations in the excitation signal. Due to this, the normalized power in the shown curves increases with the heat flow. In the equation (1), the term P_{out} in the numerator appears as a remainder of P_{in} . If the out power decrements proportionally to the heat flow, the numerator increases. This explains the response of the normalized curves, because the greater difference between P_{in} and P_{out} , the more decrement of power and the value of normalized power. This being, the hepatic structure and composition resulting of fibrosis progression appears an increment in the heat flow. In this regard, it is noticeable that the appearance order of the curves follows the order of the METAVIR grading.

$$P_{nor} = \frac{P_{in} - P_{out}}{P_{in} + P_{out}} \quad (1)$$

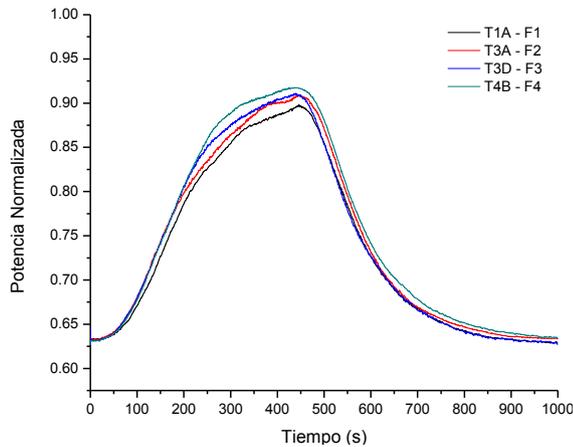


Fig. 2 Sensor response to heat conduction of the samples with lowest *METAVIR* dispersion.

CONCLUSIONS

The fibrosis assessment method supported by three experienced observers showed congruence in 70% of the cases, and even when the procedure reduced the subjectivity of the grading, these results point out the need of developing new quantitative tools to properly determine the stage of the disorder.

In regard to the heat flow measurements, they were not conclusive to classify the biopsies. However, comparing the results of the groups in distinct stages, differences can be appraised for the cases with a lower dispersion of fibrosis. Grouping and comparing the curves in this manner, a directly proportional relation was found between fibrosis and thermal conduction; meaning that the more fibrosis in the hepatic tissue, the higher thermal conductivity of the sample. However, it is desirable to increase the sensitivity of the heat flow sensor in order to continue evaluating this method as a tool to analyze hepatic samples.

Continuing to study the samples with other methods is important. In this matter, calculation of the thermal conductivity is an important tool.

ACKNOWLEDGMENT

Authors Sánchez-Pérez C. and Gutiérrez-Herrera E. acknowledge financial support of research grants PAPIIT

IT-100515 and PAPIIT TA-100215 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico from Universidad Nacional Autónoma de México.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Domínguez M., Colmenero J. & Bataller R. (2009). Tratamiento de la fibrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología* 32 (9), 10-16.
2. Anthony P., Ishak K., Nayak N. et al (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *Journal of Clinical Pathology*, 31, 395-414.
3. Salud: México 2006. Informe para la rendición de cuentas. Secretaría de Salud, 46-48. <http://www.salud.gob.mx/unidades/evaluacion/saludmex2006/S M06.pdf>
4. Valvano J., Cochran J. & Diller K. (1985). Thermal conductivity and diffusivity of biomaterials measured with self-heated thermistors. *International Journal of Thermophysics*, 6 (3), 301-311.
5. García L., González M. & Moreno R. (2012). Cirrosis hepática. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11: 625-633. Julio, 2015, Elsevier, Base de datos.
6. Ausina V. & Moreno S. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
7. Gutiérrez A., Sánchez C. & Alemán N. (2013). Optical sensor for heat conduction measurement in biological tissue. *Journal of Physic: Conference Series*, 450.

Corresponding author:

Author: Celia A. Sánchez Pérez
 Institute: Universidad Nacional Autónoma de México
 Street: Av. Universidad No. 3000, C. P. 04510
 City: Mexico city
 Country: Mexico
 Email: celia.sanchez@ccadet.unam.mx



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00310

Matrícula: 2248805450

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES
HEPÁTICAS POR FIBROSIS CON
TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN
FOTO-TÉRMICAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 31 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. RAQUEL VALDES CRISTERNA
DR. JOSELIN HERNANDEZ RUIZ
DRA. MARTHA REFUGIO ORTIZ POSADAS



Nathalie
NATHALIE ALEMAN GARCIA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: NATHALIE ALEMAN GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

Julio Cesar de Lara Isassi
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI

Jose Gilberto Cordoba Herrera
DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA

Raquel Valdes Cristerna
DRA. RAQUEL VALDES CRISTERNA

VOCAL

Joselin Hernandez Ruiz
DR. JOSELIN HERNANDEZ RUIZ

SECRETARIA

Martha Refugio Ortiz Posadas
DRA. MARTHA REFUGIO ORTIZ POSADAS