

**ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA
APLICADA AL SOPORTE DE DIAGNÓSTICO MÉDICO
DE PRECÁNCERES DE TEJIDOS DE CUELLO UTERINO**

BELARMINO SEGURA GIRALDO, MSc.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MANIZALES

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPTO DE ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y COMPUTACIÓN
DOCTORADO EN INGENIERÍA
MANIZALES 2009**

**ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA
APLICADA AL SOPORTE DE DIAGNÓSTICO MÉDICO
DE PRECÁNCERES DE TEJIDOS DE CUELLO UTERINO**

BELARMINO SEGURA GIRALDO, MSc.

**TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA
LINEA DE INVESTIGACIÓN EN AUTOMÁTICA**

Director

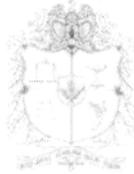
ANDRÉS ROSALES RIVERA, PhD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MANIZALES

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPTO DE ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y COMPUTACIÓN
DOCTORADO EN INGENIERÍA
MANIZALES 2009**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y COMPUTACIÓN
COORDINACIÓN POSGRADOS

Acta de Sustentación Tesis de Doctorado
BELARMINO SEGURA GIRALDO

II Semestre Académico 2009

Fecha de Nacimiento: 24/01/1968
Lugar de Nacimiento: Manizales, Caldas
Nacionalidad: Colombiano
Cédula de Ciudadanía: 18506733
Título Profesional: Ingeniero Electricista
Universidad: Universidad Nacional de Colombia
Programa: Doctorado en Ingeniería – Línea en Automática
Departamento Responsable: Dpto. de Ing. Eléctrica, Electrónica y Computación
Permanencia en el Programa: Fecha de Inicio: 2004 – 01
Fecha de Terminación: 2009-03
Fecha de Aprobación del Proyecto de Tesis: 17 de octubre de 2006
Título de la Tesis: "ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA APLICADA AL SOPORTE DE DIAGNÓSTICO MÉDICO DE PRE-CÁNCERES DE TEJIDOS DE CUELLO UTERINO"
Director de Tesis: Andrés Rosales Rivera
Acto Administrativo de Designación Jurados: 14 de octubre de 2009 (CFIA-333 de 2009)

Para constancia se firma a los 15 días del mes de diciembre de 2009.

CALIFICACIÓN: Aprobada Reprobada
MENCION SOLICITADA: Ninguna Meritoria Laureada

COMENTARIOS DEL JURADO CALIFICADOR
(Si es necesario use hojas adicionales para escribir los comentarios sobre la calidad de la Tesis y la solicitud de mención)

ANDRÉS ROSALES RIVERA
Identificación:
UNIVERSIDAD NACIONAL, SEDE MANIZALES
Director

RAFAEL GUTIÉRREZ SALAMANCA
Identificación:
UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO
JURADO

GERARD OLIVAR TOST
Identificación: E 322 587
UNIVERSIDAD NACIONAL, SEDE MANIZALES
JURADO

MIGUEL MELENDEZ LIRA
Identificación:
CINVESTAV, México
JURADO

† † **A mis padres por haberme ofrecido la maravillosa oportunidad de tener vida y por enseñarme a vivirla.**

A mi esposa María del Rosario y a mis hijos Sebastián y Natalia por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Ofrezco mis más sinceros agradecimientos a:

- La Universidad Nacional de Colombia y en especial a la sede Manizales, a COLCIENCIAS y a la Dirección Territorial de Salud por sus grandes aportes en el desarrollo de la tesis doctoral.
- Los profesores de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales de las diferentes áreas del conocimiento involucradas en esta tesis de doctorado, que hicieron sus grandes contribuciones en su momento oportuno.
- Los integrantes del grupo de Investigación en Magnetismo y Materiales Avanzados de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, a los integrantes del grupo de Investigación en Cáncer de Cuello Uterino y Cáncer de Mama de la Universidad de Caldas y a los integrantes del grupo de Investigación en Automática de la Universidad Autónoma de Manizales por las valiosas discusiones en torno a los diferentes temas tratados en esta investigación.

Agradezco muy especialmente al Doctor Germán Olarte Echeverri, gestor de la idea central de esta tesis de doctorado, por su gran y desinteresada colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERALIDADES DE PRECÁNCERES DE CUELLO UTERINO.....	4
1.1 MÉTODOS ACTUALES DE DIAGNÓSTICO DE PRECÁNCERES DE CUELLO UTERINO	5
1.2 CARCINOGENESIS DEL CUELLO UTERINO	7
REFERENCIAS	10
2. ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA.....	12
2.1 INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA	12
2.2 FORMAS DE INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON MATERIAL BIOLÓGICO	16
2.3 ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL ANÁLISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS	22
2.4 COMPORTAMIENTO ÓPTICO DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS	23
2.5 ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ESPECIES INDIVIDUALES	26
2.6 LOS FLUORÓFOROS EN EL ANÁLISIS DE ESTADOS PATOLÓGICOS.....	27
REFERENCIAS	28
3. SIMULACIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA	29
REFERENCIAS.....	33
4. SIMULACIÓN DE CÉLULAS BIOLÓGICAS A TRAVÉS DEL MODELO CELULAR DE POTTS	34
4.1 MODELO CELULAR DE POTTS PARA SIMULAR CELULAS BIOLÓGICAS.....	36
4.1.1 ADHESIÓN	36
4.1.2 TAMAÑO DE LA CÉLULA	37
4.1.3 FLUCTUACIONES DE FORMA.....	38
4.2 GENERALIDADES DEL MODELO CELULAR DE POTTS.....	40
REFERENCIAS	41
5. METODOLOGÍA.....	42
6. DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA.....	43

7.	SIMULACIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA Y DE CÉLULAS BIOLÓGICAS	46
7.1	MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA	46
7.1.1	ESTRUCTURA DEL PROGRAMA.....	49
7.1.2	GENERALIDADES	52
7.2	SIMULACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE CELULAS BIOLÓGICAS.....	52
7.2.1	MODELO MATEMÁTICO	55
7.2.2	PROGRAMA.....	56
7.2.3	ESTRUCTURA DEL PROGRAMA.....	56
7.2.4	GENERALIDADES	57
7.3	VISUALIZACIÓN.....	57
7.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
7.4.1	ORGANIZACIÓN CELULAR PARCIAL	62
7.4.2	MÍNIMOS LOCALES DE ENERGÍA.....	65
7.4.3	MEDIO EXTRACELULAR QUE CRECE	67
7.5	CONCLUSIONES	69
	REFERENCIAS.....	70
8.	PROCESAMIENTO DIGITAL DE LA INFORMACIÓN ESPECTRAL DE FLUORESCENCIA	71
	REFERENCIAS.....	79
9.	APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL SOPORTE AL DIAGNÓSTICO MÉDICO DE PRECÁNCERES DE TEJIDOS BIOLÓGICOS.....	80
9.1	ESTUDIO DE PRECANCERES EN TEJIDOS DE CUELLO UTERINO EN VIVO A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA	80
9.1.1	METODOLOGÍA	81
9.1.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
9.1.2.1	SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	83
9.1.2.2	CORRELACIÓN DE RESULTADOS ENTRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS.....	86
9.1.3	CONCLUSIONES	87
9.1.4	RECOMENDACIONES.....	88
9.2	ESTUDIO DE PRECÁNCERES EN BIOPSIAS DE MAMA A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA	88
9.2.1	METODOLOGÍA	90
9.2.2	RESULTADOS.....	91
9.2.3	CONCLUSIONES	93
	REFERENCIAS.....	93

10. PROPUESTA DE METODOLOGÍA PARA EL SOPORTE AL DIAGNÓSTICO MÉDICO EN VIVO DE PRECANCERES DE TEJIDOS DE CUELLO UTERINO	95
10.1 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES DE TEJIDO CUELLO UTERINO OBTENIDAS POR COLPOSCOPIA	96
10.2 METODOLOGÍA	97
10.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	99
10.4 CONCLUSIONES	102
REFERENCIAS	102
CONCLUSIONES GENERALES	103
TRABAJOS CONCLUIDOS	104
CONTRIBUCIONES	105
PROYECCIONES	106
GRUPOS QUE APOYARON LAS INVESTIGACIONES	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Esquema general de los primeros niveles de energía de una molécula orgánica.....	14
Figura 2-2. Mecanismos de excitación y emisión de fluorescencia.....	16
Figura 2-3. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de fluoróforos endógenos.	27
Figura 4-1. Organización celular lograda por el CPM, (a) Condición inicial, (b) Organización celular, (c) Ordenamiento de células en forma de mosaico, (d) engullimiento.	35
Figura 4-2. (a) Puntos escogidos para realizar el cambio en una red hexagonal; b) Nueva configuración si el cambio se acepta.....	40
Figura 6-1 Esquema de componentes básicos de un instrumento usado para espectroscopía óptica de fluorescencia de tejidos.....	43
Figura 6-2 Montaje de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia	44
Figura 7-1 espectros de absorción y emisión de los fluoróforos (colágeno, elastina, NADH y FAD).	49
Figura 7-2 Las tensiones superficiales determinan la configuración de equilibrio con mínima energía global (a) Las células de un solo tipo se disocian, (b) las células se agregan, (c) y (d) Las células de dos tipos no se agregan, (e) configuración de tablero de ajedrez, (f) y (g) “cell sorting” típico (h) otro tipo de organización, (i) condición de Young.	54
Figura 7-3 Interfaz grafica CPM.....	58
Figura 7-4 Organización celular en 3D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) Red en 4MCS, (c) 8 MCS, (d) 20 MCS.....	60
Figura 7-5 Organización celular en 2D. (a) Red Inicial, (b) Red en 2MCS, (c) 4 MCS, (d) 6 MCS, (e) 8 MCS, (f) 10 MCS, (g) 20 MCS, (h) 40 MCS, Red Final	61
Figura 7-6 Evolución de una sola célula escogida aleatoriamente, (a) célula en su estado inicial, (b) luego de 4 MCS, (c) luego de 10 MCS, (d) configuración final de la célula.	62
Figura 7-7 Evolución de una sola célula escogida aleatoriamente, (a) célula en su estado inicial, (b) célula en su estado final.....	63
Figura 7-8 Organización celular parcial en 2D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) Red en 4MCS, (c) 8 MCS, (d) 10 MCS.....	64
Figura 7-9 Red que se “congela”, Proyecciones en 2D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) 10 MCS, (c) 80 MCS, (d) 1000 MCS, Red Final.	66

Figura 7-10 Una sola célula tipo 2 que disminuye de tamaño, (a) célula en su estado inicial, (b) la misma célula luego de 2 MCS.....	68
Figura 7-11 Células que disminuyen de tamaño y evolución de los espectros de fluorescencia, (a) Red Inicial, (b) Red en 2 MCS.....	68
Figura 8-1 Promediado conjunto de la información espectral de fluorescencia	71
Figura 8-2 Espectro filtrado a través del filtro Savitzky-Golay de octavo orden, 30 puntos	73
Figura 8-3 Ajuste de la información espectral de fluorescencia.....	74
Figura 8-4 Contribución representada en bandas Gaussianas de cada uno de los fluoróforos	75
Figura 8-5 Espectros característicos de fluorescencia de normalidad y patología	76
Figura 8-6 Información espectral de fluorescencia a longitudes de onda de 330 nm y 350 nm	76
Figura 8-7 Gráfica de los eigenvalores	78
Figura 8-8 Gráficas de la representación de los individuos en el primer plano principal	79
Figura 9-1 Imagen de los puntos de análisis en el tejido de cuello uterino	82
Figura 9-2 Información espectral de fluorescencia de muestras de biopsias de mama.....	91
Figura 9-3 Información espectral de fluorescencia normal y patológica	93
Figura 10-1 Metodología para el diagnóstico de precánceres de cuello uterino ...	95
Figura 10-2 Diagrama de flujo de la metodología usada	97
Figura 10-3 Algoritmo utilizado para la segmentación de la zona de transformación	98
Figura 10-4 Proceso de segmentación. a) Imagen original en RGB. b) Endocervix. c) Tejido normal. d) Tejido patológico. e) Zonas de iluminación no uniforme	99
Figura 10-5 Proceso de segmentación. a) Imagen original en RGB. b) Endocervix. c) Tejido Normal. d) Tejido anormal. e) Zonas de iluminación no uniforme. Fuente: Manual para la detección visual de neoplasias cervicales.....	100
Figura 10-6 Imagen original. <i>Cluster</i> etiquetado como Normal. <i>Cluster</i> etiquetado como patológico.	101
Figura 10-7 Imagen original. Cluster etiquetado como Normal. Cluster etiquetado como patológico.	101
Figura 10-8 Imagen Original e Imagen clasificada.....	101
Figura 10-9 Imagen Original e Imagen clasificada.....	101
Figura 10-10 Imagen Original e Imagen clasificada.....	102
Figura 10-11 Imagen Original e Imagen clasificada.....	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1 Tipos más frecuentes (con mayor incidencia) de cánceres en mujeres .	4
Tabla 2-1 Escala de tiempo para los procesos de fluorescencia	15
Tabla 2-2 Longitudes de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos	22
Tabla 6-1 Especificaciones del sistema laser de gas nitrógeno.....	44
Tabla 6-2 Especificaciones del espectrómetro USB2000	45
Tabla 7-1 Características de los picos de absorción y emisión de cada uno de los fluoróforos presentes en el tejido de cuello uterino obtenidas por ajuste gaussiano.	49
Tabla 7-2 Datos para la simulación 1 de organización celular	59
Tabla 7-3 Datos para la simulación 2.....	63
Tabla 7-4 Datos para la simulación 3.....	65
Tabla 7-5 Datos para la simulación 4.....	67
Tabla 9-1 Información pacientes analizadas por los diferentes métodos.....	82
Tabla 9-2 Fluorescencia vs. Citología.....	83
Tabla 9-3 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia /citología.....	84
Tabla 9-4 Fluorescencia vs. Colposcopia	84
Tabla 9-5 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia / colposcopia	84
Tabla 9-6 Fluorescencia vs. Biopsia	84
Tabla 9-7 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia/biopsia.....	85
Tabla 9-8 Colposcopia vs. Citología.....	86
Tabla 9-9 Colposcopia vs. Biopsia.....	86
Tabla 9-10 Análisis Estadístico de la información espectral de fluorescencia en biopsia de mama.....	92
Tabla 10-1 Centroides figura 10-3	99
Tabla 10-2 Centroides figura 10-4	100

RESUMEN

En este trabajo de tesis se desarrolló e implementó la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia con el objetivo de analizar los cambios bioquímicos y morfológicos que presentan los tejidos biológicos al evolucionar de estados de normalidad a estados de patología. Con el fin de procesar digitalmente la información espectral de fluorescencia de los tejidos biológicos, se desarrolló un modelo matemático que permitió simular los espectros de fluorescencia obtenidos de dos formas distintas: a) simulación de espectros de fluorescencia en células biológicas (obtenidas por el modelo celular de Potts); y b) método analítico de la información espectral de fluorescencia en tejidos biológicos de cuello uterino y mamario. Los resultados de la aplicación de este proceso matemático permitieron desarrollar algoritmos computacionales para plantear una metodología basada en la espectroscopía óptica de fluorescencia en el soporte al diagnóstico médico de precánceres de cuello uterino *in vivo* y *ex vivo*. Conjuntamente se desarrolló un algoritmo computacional para procesar digitalmente las imágenes de los tejidos de cuello uterino obtenidas por colposcopia. Finalmente, se planteó una metodología para el soporte al diagnóstico médico en vivo de precánceres de cuello uterino basada en la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y del procesamiento digital de imágenes de cuello uterino.

ABSTRACT

In this thesis was developed and implemented the optical fluorescence spectroscopy technique, in order to analyze the biochemical and morphological changes presented on biological tissues in the evolution from normality states to pathological states. In order to process digitally the spectral information of fluorescence of biological tissues, was developed a mathematical model that allowed to simulate the spectrums of fluorescence obtained in two different ways: a) simulation of fluorescence spectrums of biological cells (obtained from Potts cellular model); b) analytic method of spectral information of fluorescence of biological tissues, as cervix tissue and breast tissue. The results of use this mathematical process allowed to develop computed algorithms to expose a methodology based on the optical fluorescence spectroscopy technique in support of medical diagnostics of cervix pre cancer in vivo and ex vivo. Together, was developed a computed algorithm to processing digitally the images of cervix obtained by colposcopy. Finally, was exposed a methodology for support the medical diagnostic of precancer cervix in vivo based on the optical of fluorescence spectroscopy, digital processing development of spectral information of fluorescence and the digital process of cervix tissue images.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha presentado un notable incremento en el diseño e implementación de técnicas para la medición de bioseñales, las cuales han permitido el estudio del comportamiento o evolución de patologías en algunos órganos del cuerpo humano. Por lo tanto, se hace cada vez más indispensables estas técnicas en el soporte al diagnóstico médico de enfermedades, ofreciendo al profesional de la salud más herramientas de análisis más profundo y certero al momento de la entrega de resultados. El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología basada en la espectroscopía óptica de fluorescencia que permita realizar un análisis de los cambios bioquímicos presentes en los estados de normalidad y patología de algunos tejidos biológicos y así, poder ofrecer soporte al diagnóstico médico de enfermedades comunes en las mujeres, como son los precánceres de cuello uterino. Esta tesis Doctoral involucra varias experiencias tanto en el desarrollo e implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, como del procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia, de imágenes colposcópicas y de muestras de biopsia de los tejidos de cuello uterino. Estas diferentes experiencias permiten proponer una metodología para dar soporte al diagnóstico médico de presencia de precánceres en los tejidos de cuello uterino.

De acuerdo a diversas investigaciones la segunda causa de mortalidad de la población femenina es el cáncer de cuello uterino, y una detección a tiempo podría mejorar la calidad de vida de miles de mujeres. Existen diversos métodos para su detección, algunos de estos son la colposcopia, la citología y la biopsia que son diagnosticados por especialistas.

Los avances tecnológicos en láseres, fibra óptica y espectrógrafos controlados por computador, han permitido el desarrollo e implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, para la caracterización de tejidos biológicos, que junto con el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia plantea una metodología para el soporte al diagnóstico médico de precánceres de cuello uterino. La información proporcionada por los espectros característicos de fluorescencia que reflejan los cambios bioquímicos y morfológicos de los tejidos del cuello uterino, son analizadas a través de métodos estadísticos, que al relacionar estos resultados con la información proporcionada

por el cuadro clínico (antecedentes, colposcopia, etc.) contribuyan en la toma de la decisión del diagnóstico de los tejidos del cuello uterino normales o patológicos en vivo.

En esta tesis Doctoral estudió, analizó y desarrolló la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia como una herramienta no invasiva, rápida y segura para el soporte al diagnóstico médico, de la presencia de precánceres en tejidos biológicos tanto *in vivo* como *ex vivo*. El objetivo final y gran contribución de esta investigación es plantear una **Metodología para el soporte en el diagnóstico médico de patologías de tejidos de cuello uterino basada en las técnicas de espectroscopía óptica de fluorescencia, procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y el procesamiento digital de las imágenes obtenidas por colposcopia**. Esta tesis doctoral se desarrolla en diez capítulos de la siguiente forma:

En el **CAPITULO I** se presentan algunas generalidades de los precánceres de cuello uterino.

En el **CAPITULO II** se hace una gran reseña sobre la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, y en especial en la aplicación de esta en el análisis de tejidos biológicos.

En los **CAPITULOS III y IV** contemplan las bases teóricas de las simulaciones del espectro de fluorescencia y de las células biológicas.

En el **CAPITULO V** se cita de una forma breve cada una de las experiencias investigativas involucradas en el desarrollo de esta tesis.

En el **CAPITULO VI** se presenta el desarrollo e implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia.

En el **CAPITULO VII** trata sobre la simulación de los espectros de fluorescencia y de las células biológicas.

En los **CAPITULOS VIII y IX** se presenta una metodología basada en el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y la aplicación de está en el análisis de tejidos biológicos.

En el **CAPITULO X** se plantea una metodología para el soporte al diagnóstico médico en vivo de precánceres de tejidos de cuello uterino basada en las técnicas

de espectroscopía óptica de fluorescencia, de procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y del procesamiento digital de las imágenes obtenidas por colposcopia.

1. GENERALIDADES DE PRECÁNCERES DE CUELLO UTERINO

El cáncer invasivo del cuello uterino es el segundo más frecuente entre las mujeres en todo el mundo, con aproximadamente 500.000 nuevos casos al año. Representa el 10% de todos los tumores femeninos. Pero hay grandes diferencias entre los países más y menos desarrollados; mientras en estos últimos es la segunda neoplasia maligna en frecuencia, después del cáncer de mama, en los países desarrollados su frecuencia ha disminuido drásticamente en las últimas décadas. En muchos países en desarrollo, el cáncer del cuello uterino es la primera causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres, tabla 1.1 ^[1, 2].

Tabla 1-1 Tipos más frecuentes (con mayor incidencia) de cánceres en mujeres

Localización	Incidencia estimada anual			Mortalidad corregida anual		
	Casos	Tasa cruda (**)	TAE(*)(**)	Casos	Tasa cruda (**)	TAE(*)(**)
Cuello uterino	5.936	24.9	36.8	2.853	14.1	18.4
Mama	4.677	23.2	30.0	1.905	9.4	12.4
Estómago	3.179	15.7	20.7	2.440	12.1	15.9
Colon y recto	2.158	10.7	13.9	1.121	5.6	7.2
Pulmón	1.463	7.3	9.9	1.455	7.2	9.9
Todos los cánceres excepto piel	33.504	165.9	212.9	18.773	93.0	121.7

Estimaciones del Instituto Nacional de Cancerología 1995-1999

(*) TAE: Tasa Ajustada por Edad. Datos ordenados para incidencia estimada anual.

(**) Este cálculo se realizó por 100.000 personas-riesgo/año.

El cáncer del cuello uterino es un tumor propio de las edades medias de la vida. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 50 años, con un máximo entre los 40 y los 45. Hay un número significativo de casos desde los 30 años. Entre el 85-95% de los casos son carcinomas escamosos (o epidermoides), el resto son adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos. Entre el 80 y el 85% de los casos se registran en países en vías de desarrollo; las campañas de diagnóstico precoz han jugado un papel esencial en la disminución de la incidencia de este tumor en los países desarrollados. Antes de las campañas de tamizaje, la incidencia era similar en todos los países ^[1].

El cáncer del cuello uterino ocupa el tercer lugar de todos los cánceres, siendo responsable del 9,8% de los nuevos casos alrededor del mundo ^[3]. En los países en desarrollo ocupa el segundo lugar en frecuencia, en las mujeres con una proporción del 12 - 15% ^[4], mientras en los países desarrollados ocupa el quinto lugar con una frecuencia relativa de 4,4% ^[5]. Esto lleva a que el cáncer del cuello uterino sea la primera causa de mortalidad en mujeres en los países del tercer mundo, puesto que ha sido una enfermedad propia de las comunidades pobres y no se han ejercido las suficientes presiones políticas para mejorar la situación de estos grupos ^[6].

En nuestro país uno de los problemas fundamentales para disminuir la mortalidad son los modelos utilizados para abordar el problema, debido a que se realizan acciones centralizadas con una inspiración biológica, centrados en el trabajo alrededor del daño, esto no ha mostrado un verdadero impacto en la mortalidad ^[7,8]. Actualmente, en Colombia se mueren 9 mujeres diariamente por esta patología, según datos presentados en el Seminario Internacional sobre virus del papiloma humano (Medellín – Colombia 23 al 25 de mayo de 2007).

La detección precoz del cáncer mediante citología sólo alcanza el 36% en los grupos de riesgo (Ministerio de Protección Social), lo que explicaría la alta mortalidad, en Colombia; existen bajas coberturas citológicas y falsos negativos, que alcanzan hasta 20-44%, en cáncer invasivo en más del 50% ^[9].

En Caldas esta patología tiene alta morbilidad y mortalidad, con un impacto grande en el desarrollo social. El grupo de registro poblacional de Caldas reportó 117 casos nuevos en el año 2003, correspondiendo 41 casos a la ciudad de Manizales con 27 defunciones en la misma ^[10]; para el 2004 reportó 118 casos nuevos en Caldas, de ellos 50 en Manizales con 21 muertes en la misma ^[11].

1.1 MÉTODOS ACTUALES DE DIAGNÓSTICO DE PRECÁNCERES DE CUELLO UTERINO

Son diversos los métodos de diagnóstico de precánceres de cuello uterino utilizados a través del tiempo y ellos han estado ligados a los avances que se han tenido sobre el conocimiento de la fisiopatología, en la carcinogénesis del cuello uterino.

CITOLOGÍA. La citología vaginal fue introducida por Papanicolaou desde 1928, su contribución fue honrada dándole el nombre de PAP, al nuevo método para el diagnóstico del cáncer de cervical, sin embargo otros autores como el patólogo Rumano Babes y el ginecólogo Italiano Viana, sugirieron el uso de la citología vaginal antes que el mismo Papanicolaou, la comunidad científica no dió crédito por lo que los autores suspendieron los estudios los que se reiniciaron en 1939 mediante los extendidos vaginales realizados con el ginecólogo Herbert Traut, en 1943 publicaron sus hallazgos y conclusiones en la famosa monografía titulada diagnóstico del cáncer uterino por extendido vaginal ^[12]. La aplicación de este método masivamente a la población ha disminuido en un 80% la mortalidad por esta enfermedad en los países industrializados ^[13], sin embargo en nuestro medio las bajas coberturas y las condiciones de pobreza de la población explica la alta mortalidad por esta patología ^[14].

Actualmente se usa el sistema Bethesda para el diagnóstico citológico, que hace énfasis en la descripción morfológica y clasifica las lesiones escamosas en LEI de bajo grado (LEI - BG), que comprende las lesiones por VPH y NIC I y LEI de alto grado (LEI - AG), que abarca NIC II y NIC III ^[15].

COLPOSCOPIA. La colposcopia fue introducida en 1925 por el profesor Hinnselman, de origen Alemán, esta es la parte clínica en el análisis de las alteraciones epiteliales e invasivas del cuello uterino. El colposcopio es un microscopio de bajo poder, al cual se le ha adicionado un filtro verde, para el análisis de los vasos del cuello uterino; este procedimiento estima las alteraciones de los vasos terminales del cuello, donde se reflejan desde una etapa muy temprana los cambios en los tejidos de la neoplasia y valora la extensión clínica de la lesión en el cuello uterino, facilitando la toma de biopsia del sitio más patológico con el fin de planear el tratamiento de una manera individualizada ^[16,17].

El método consiste en la visualización del cuello uterino mediante la colocación de un espéculo, seguido de una limpieza del mismo con solución salina normal, al cual permite un mejor estudio de los vasos sanguíneos, inmediatamente se coloca ácido acético al 4 o al 5%, el cual produce una deshidratación reversible del epitelio, que comienza a los 10 segundos y termina a los 40 segundos; en los sitios donde hay un crecimiento celular anormal, se van a encontrar unos patrones que se denominan epitelio acetoblanco, que indica un aumento de la densidad nuclear; mosaico y punteado, significando una neovascularización del cuello en respuesta a la producción del factor de angiogénesis tumoral que tiene como objetivo aumentar el riego sanguíneo a las células tumorales que están proliferando de manera acelerada en la zona de transformación, estos patrones

son compatibles con lesiones intraepiteliales del cuello. El patrón leucoplásico es una lesión blanquecina que se observa a simple vista e indica producción de queratina por parte del tejido, existen por lo tanto, lesiones intraepiteliales e invasivas queratinizantes. Finalmente el patrón de los vasos atípicos, siempre indica carcinoma invasivo. La colposcopia permite analizar la extensión clínica de la lesión que es el elemento más importante para el tratamiento de las lesiones intraepiteliales del cuello uterino ^[9].

HISTOLOGÍA. La histología se ha utilizado como el diagnóstico definitivo de las lesiones cervicales y es indispensable para realizar el tratamiento y seguimiento de las pacientes; ésta consiste en el análisis microscópico de una porción de tejido que ha sido extraída bajo el examen colposcópico, en este tejido se observa el epitelio y estroma, donde se ubican las diferentes alteraciones que servirán para el diagnóstico de las alteraciones patológicas. Las lesiones intraepiteliales NIC se encuentran sólo en el epitelio y a través de los años, 10 a 15 evolucionan a cáncer invasivo, donde ya hay compromiso del estroma.

El NIC I muestra alteración de las células del tercio inferior del epitelio y se correlaciona con las lesiones citológicas de bajo grado; el NIC II incluye lesiones que muestran alteración de las células de los tercios inferior y medio del epitelio y el NIC III comprende aquellas lesiones que afectan todo el espesor del epitelio, estas dos últimas se correlacionan con las lesiones citológicas de alto grado ^[18]. Cuando se rompe la membrana basal del epitelio las células tumorales entran al estroma, produciendo el cáncer invasivo; en estados avanzados hay masas tumorales que reemplazan el cuello uterino y se observa macroscópicamente. En estos estados existen etapas tempranas que pueden ser diagnosticadas mediante la histología y la colposcopia

También se ha utilizado el estudio del legrado endocervical mediante la cureta de Novack, en los casos de encontrar atipias en células endocervicales en la citología previa, estas áreas no se observa con el análisis colposcópico. Derivado de este enfoque, otros centros utilizan el cubo endocervical para obtener material histológico que corresponde al tercio inferior del canal, este se practica con radiofrecuencia y asa en forma de “U” ^[19].

1.2 CARCINOGENÉISIS DEL CUELLO UTERINO

Las teorías fundamentales sobre el origen del cáncer a nivel del tejido uterino, hace énfasis en el hecho de que esta enfermedad se inicia en el epitelio por varias

noxas descritas que es lo que se denomina fase preclínica en un periodo evolutivo de 10 años (neoplasia intraepitelial cervical, NIC), si esta etapa no es alterada en su evolución, pasa a lo que se denomina el cáncer invasivo que es más común en el epitelio escamoso entre el 85 y 95% y en el epitelio columnar de un 5 al 14 % [20].

Modernamente se sostiene que el virus del papiloma humano de tipo oncogénico (16, 18, 31, 33, 39, 45 y 56) son los responsables del inicio de la carcinogénesis, por el otro lado existe el tipo 6 y 11 responsables de las verrugas genitales (condiloma acuminado, plano, endofítico y atípico) [21].

Los virus oncogénicos, abren la doble hélice del genoma en los puentes disulfuro e intercambian el contenido del ADN con la célula basal del epitelio escamoso, el resultado es una célula con un contenido aneuploide de cromosomas es lo que se denomina una célula neoplásica, es decir células inmaduras, con gran capacidad proliferativa y que en cualquier momento, dependiendo de la agresividad del clon celular y de la respuesta inmune del huésped, puede localizarse, revertir espontáneamente por mecanismos inmunológicos o producir ruptura de la membrana basal generando el cáncer invasivo [22].

Una vez ocurren estos cambios, la neoplasia intraepitelial comienza a crecer a manera de cuña desde la membrana basal [23]. En la medida en que este grupo celular comienza a multiplicarse necesita nutrientes aceleradamente para lo cual el estroma responde a estas necesidades mediante la producción del factor de angiogénesis tumoral, con lo cual se forman nuevos vasos para dar respuesta a los requerimientos nutritivos, de esa “nueva raza” de células. El mecanismo mediante el cual se nutren es por inhibición a causa de las diferencias en las presiones osmóticas y oncóticas [24].

Las células inmaduras se abren paso en el epitelio no “contaminando” a las células escamosas vecinas, sino que lo hacen a través de la enzima metaloproteínasa que destruye los puentes intercelulares, dañando la polaridad celular y permitiendo la diseminación de las células que están proliferando. Cuando comprometen el tercio inferior del epitelio se denomina lesión de bajo grado y corresponde a NIC I y/o VPH; estas lesiones, se caracterizan citológicamente por un aumento del tamaño del núcleo e irregularidad de la cromatina, y por la binucleación o multinucleación con una cavidad citoplásmica, esto se denomina atipia coliocítica. Desde el punto de vista colposcópico se ven lesiones acetoblanco con un fino punteado en su interior de color brillante y que no tiene una definición exacta con el tejido adyacente, dichas lesiones tienen

fuerte capacidad de rehidratación y pueden perderse rápidamente de la visión colposcópica (tipo 6 y 11) y toman parcialmente el lugol ^[25].

Cuando las células inmaduras comprometen más del 50% del espesor del epitelio se denomina lesión de alto grado, correspondientes a NIC II o NIC III. Citológicamente se caracteriza por pérdida de la relación entre núcleo y citoplasma con hipercromatismo nuclear ^[26], en la colposcopia se observa un severo compromiso de la trama vascular terminal del cuello uterino, evidenciado por lo que se denomina punteado y mosaico; en la apariencia clínica son lesiones que alteran la superficie del epitelio, se demarcan muy bien frente al tejido vecino, son opacas y no toman el lugol, mostrando un severo disturbio en el glucógeno celular. Es a partir de la glucogenólisis que la célula realiza su metabolismo ^[27]. Desde el punto de vista colposcópico, en las fases tempranas se aprecian los vasos atípicos “en tirabuzón, en coma”, que son expresiones del cáncer infiltrante ^[28].

Finalmente en el cáncer invasivo temprano, donde en la citología hay severa atipia e hipercromatismo nuclear con pérdida del citoplasma e histológicamente se pierden los puentes intercelulares con ruptura de la membrana basal en las fases iniciales (invasión estromal mínima y microinvasión), hasta la desaparición de ésta en el cáncer invasivo profundo con masas evidenciadas clínicamente. A medida que las lesiones progresan, el colágeno y la elastina se van disminuyendo hasta desaparecer en el cáncer invasivo profundo.

Todos estos cambios en la carcinogénesis comienzan por alteraciones bioquímicas y fisiológicas, hasta tornarse estructurales; a nivel bioquímico lo primero que se altera es la trama vascular que consiste en vasodilataciones segmentarias, para nutrir el clon celular que está proliferando (VPH, NICI), y son observados desde la Colposcopia, pero no estructuralmente desde la citología o la histología. Hay unos requerimientos energéticos aumentados en las áreas que están proliferando y que básicamente se hace a través de la vía de la glucogenólisis, a partir del glucógeno (forma de almacenamiento de la glucosa en los tejidos), una vez se liberan las moléculas de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) entra a la fase anaeróbica del ciclo de krebs a través de la nicotinamida dinucleótido ($NADH^+$), en la cual se producen dos moles de ATP (energía biológicamente activa) y dos moles de NAD; este proceso requiere una mol de ATP. Las dos moléculas de NAD al unirse a la glucosa forman la acetil coenzima A iniciando el ciclo aeróbico o tricarbocílico, el cual convierte un mol de glucosa en 36 moles de ATP.

En las lesiones preneoplásicas, el patólogo alemán Walter Schiller, hacia 1933, lanzó la hipótesis, que las lesiones acetoblancoas no tomaban el lugol (yodo), debido a la ausencia del glucógeno, lo cual fue comprobado posteriormente por la ciencia con estudios mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los epitelios acetoblancoas de origen viral (VPH/NIC I) a pesar de las alteraciones nucleares, producen algo de glucógeno, razón por la cual, las lesiones toman parcialmente el lugol y en la colposcopia tienen apariencia de color naranja; sin embargo en las lesiones de alto grado (NIC II/NIC III) y cáncer invasivo temprano no hay glucógeno, por esto las lesiones son blancas y opacas en la colposcopia.

A medida que se compromete el tejido desde lesiones bien diferenciadas a mal diferenciadas, los requerimientos energéticos para la proliferación celular se hacen cada vez más intensos y se producen, por un lado, déficit de glucosa para la producción del ATP, esta glucosa se desdobra en ADP y AMP cíclico, siendo éste segundo el mensajero encargado de llevar la información al núcleo para la síntesis de las proteínas, mecanismo fortalecido por el NADH que ingresa aceleradamente la glucosa a la fase aeróbica; razón por la cual esta coenzima (fluoróforo endógeno) se encuentra elevada en los procesos de oxidoreducción^[15], que son objeto actualmente, de los análisis a través de la espectroscopía óptica de fluorescencia.

REFERENCIAS

- ¹ Globocan, (2002). En.<http://www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm>
- ² M. Piñeros, J. Ferlay, R. Murillo. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia, 1995-1999. Instituto Nacional de Cancerología 2005.
- ³ A. Vizcaino, V. Moreno, X. Bosch, N. Muñoz. International Trends in incidence of cervical cancer: II. Int. J. Cáncer 86 (2000) 429 – 435.
- ⁴ K. Miller et al. Evaluation and Follow up of Abnormal Pap Smears. Am. Fam. Physician 45 (1992) 143-50.
- ⁵ W. Parkin, P. Pisani, J. Ferlay. Estimates of the worldwide incidence of 25 Cancers in 1990. Int. J. Cáncer: 80 (1999) 827 – 841.
- ⁶ DiSaia y Creasman. Chapter I. Preinvasive Disease of the Cervix. Clinical Gynecologic Oncology. Sixth Edition. Mosby Inc: St. Louis. (2002) 1 – 29.
- ⁷ G. Olarte. Experiencias del grupo de trabajo en Cáncer de Cuello Uterino y Mama en el manejo de las lesiones intraepiteliales del cuello uterino Producida por el VPH. I Simposio de Actualización en Medicina General. Marzo 28 al 31 de 2001. Universidad de Caldas - Manizales.
- ⁸ R. Pava, G. Olarte, B. Rivera, M. T. Vallejo, G. F. Osorio, S. I. Betancur, G. M. Escobar. Evaluación de un modelo descentralizado para el control del cáncer cervicouterino en el departamento de Caldas. programa Cáncer de Cérvix y Mama. U. De Caldas - Manizales. 2001.
- ⁹ M. Coppleson. Cervical Intraepithelial neoplasia: clinical features and management. Gynecologic Oncology. Fundamental Principles & Clinical Practice. Edimburgo. 1 (1981) Chapter 33, 408-29.
- ¹⁰ G. A. López, G. Arango, M. A. Marín, M. L. Vanegas, L. M. Agudelo, A. M. Escobar . Registro poblacional de cáncer de Manizales-Caldas año 2003. Manizales: Ed blanecolor; (2005).

-
- ¹¹ G. A. López, G. Arango, M. A. Marín, M. L. Vanegas, L. M. Agudelo, A. M. Escobar . Registro poblacional de cáncer de Manizales-Caldas año 2003. Manizales: Ed blanecolor; (2006).
- ¹² L. Koss. Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. JB Lippincott, Company. Philadelphia (1979) 287 – 317.
- ¹³ M. J. Campion. Cervical cancer prevention. The Fifteenth Annual Symposium Obstetrical and Gynecological Pathology. Magee-Womens Hospital Pittsburgh 2 (1994) 23–24.
- ¹⁴ G. Olarte. Análisis Crítico del paradigma anatomoclínico en el manejo del cáncer de cuello uterino. Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia, abril 16 – 18 de 2002 Cartagena.
- ¹⁵ T. Wright, R. Richart, A. Ferenczy. History of the Development o Electrosurgery. Principals of Electrosurgery, Arthur Vision Inc (1992) 19 – 44.
- ¹⁶ G. Mestwerdt. Atlas de Colposcopia. Ed. Masson Et Cie, París 1955.
- ¹⁷ R. MacSween, K. Whaley. Patología de MUIR. Interamericana McGraw Hill (1995) 827 – 828.
- ¹⁸ C. P. Crum,, E. Cibas, K. Lee. Historical perspective, viral pathogenesis and natural histoy of cervical neoplásica. Churchill Livingstone (1997) 1-17.
- ¹⁹ T. C. Wright, R. J. Kurman, A. Ferency. Precancerous lesions of the cervix. Pathology of the female genital tract. Springer Verlag (1994) 229 – 277.
- ²⁰ G. F. Osorio, P. A. Gallego. Patologías frecuentes del tracto genital inferior femenino. Manizales: Ed Universidad de Caldas 2004.
- ²¹ H. L. Jiang, H. H. Zhu, L. F. Zhou, F. Chen, Z. Chen. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. Journal of medical Microbiology 55 (2006)715-720.
- ²² T. C. Wright, R. J. Kurman, A. Ferency. Precancerous lesión of the cervix. Pathology of the Female Genital Tract, Springer – Verlag (2002) 253 -324.
- ²³ Crum CP, Cibas E, Lee K y Chapter I. Historical Perspective. Chapter II Viral Pathogenesis and Natural Histoy of Cervical Neoplasia. Churchill Livingstone, New York:1–4; 7–17.1997.
- ²⁴ S. Vinokurova, N. Wentzensen, J. Eibenkel, R. Klaes, C. Ziegert, P. Melsheimer. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. J Natl Cancer Inst (2005) 1816 - 1821.
- ²⁵ P. Disaia, W. T. Creasman. Oncología Ginecológica. Mosbi/Doyma (1994) 738-745.
- ²⁶ L. Koss. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. JB Lippincott Company (1979) 287– 317.
- ²⁷ A. Ferency, B. Jenson. Efectos tisulares y respuesta del huésped. Clínicas de Ginecología y Obstetricia temas actuales, McGraw – Hill (1996) 695–714.
- ²⁸ B. S. Apgar, G. L. Brotzman, M. Spitzer. Colposcopy principles and practice. W:B Saunders Company (2002) 167-186.

2. ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

La espectroscopía óptica de fluorescencia, como método de análisis, mide la radiación electromagnética que emana de la materia o que interactúa con ella; su aplicación a la biomedicina se encuentra en la región del espectro electromagnético, entre el ultravioleta (UV) y el infrarrojo cercano (NIR). Las nuevas tecnologías, como la espectroscopía óptica de fluorescencia, para el análisis de los cambios bioquímicos y morfológicos de los tejidos *in vivo* y *ex vivo*, contribuyen al diagnóstico médico de enfermedades como los precánceres de cuello uterino, los cuales tienen altos índices de morbilidad y mortalidad en nuestro país. En diferentes investigaciones científicas, técnicas de espectroscopía óptica de fluorescencia se han presentado con una alta sensibilidad y especificidad cuando es comparada con la histopatología de los tejidos ^[1,2].

2.1 INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

Debido a los mecanismos de interacción de la radiación electromagnética con la materia, se han derivado diferentes métodos ópticos para el análisis de materiales duros y blandos. Por un lado, métodos espectroscópicos donde la medida de la intensidad y la longitud de onda de la energía radiante, indican la presencia de transiciones energéticas en la materia analizada, y por otro lado, los métodos no espectroscópicos que se basan en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia que dan origen a un cambio en las propiedades físicas de la radiación electromagnética.

El modo de propagación de una onda electromagnética en cualquier ambiente, depende de constantes ópticas como el índice de refracción (n) y la constante dieléctrica (k); las cuales a su vez dependen de las constantes del material como permitividad (ϵ), permeabilidad (μ) y conductividad (σ), que pueden variar en un intervalo de frecuencias.

El campo eléctrico se relaciona con el campo magnético por medio de las ecuaciones de Maxwell; para medios dispersos donde no hay presencia de fuentes ni corrientes de conducción, ecuación 2-1.

$$\nabla \cdot \left(\varepsilon + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \right) \vec{E}(\omega) = 0$$

$$\nabla \cdot \mu \vec{H}(\omega) = 0$$

$$\nabla \times \vec{E}(\omega) = i \omega \mu_0 \mu \vec{H}(\omega)$$

$$\nabla \times \vec{H}(\omega) = -i \omega \varepsilon_0 \left(\varepsilon + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \right) \vec{E}(\omega)$$

2-1

Estas ecuaciones se pueden aplicar a medios heterogéneos donde ε_ω , μ_ω y σ_ω varían de un punto a otro y en donde \vec{H} es el campo magnético inducido. En medios homogéneos donde las constantes electromagnéticas dependen de la frecuencia ω y no varían de un punto a otro en el medio. Las ecuaciones de Maxwell se pueden escribir de una forma más simplificada, ecuación 2-2.

$$\nabla \cdot \vec{E}_\omega(\vec{r}) = 0$$

$$\nabla \cdot \mu \vec{H}(\vec{r}) = 0$$

$$\nabla \times \vec{E}(\vec{r}) = i \omega \mu_0 \mu \vec{H}(\vec{r})$$

$$\nabla \times \vec{H}(\vec{r}) = -i \omega \varepsilon_0 \varepsilon_{gen} \vec{E}_\omega(\vec{r})$$

2-2

Al aplicar un campo electromagnético a un material este absorbe o emite radiación electromagnética produciéndose una transferencia de energía al medio absorbente o procedente de este; para entender el concepto físico que ocurre en estos fenómenos se debe tratar la radiación electromagnética, no como onda sino como un flujo de partículas discretas (fotones o cuantos de energía). Cuando un electrón libre colisiona con una partícula (de masa m) en reposo, la energía y el momentum de esta partícula se relacionan con la frecuencia y la longitud de onda de la radiación electromagnética causando su dispersión. La cantidad de energía y de momentum que se presenta a partir de esta interacción entre la onda electromagnética y la partícula cargada corresponden a un fotón^[3].

Este principio es una de las leyes fundamentales de la física y se aplica a todos los procesos radiativos que involucran partículas cargadas y campos electromagnéticos; es así, como las interacciones electromagnéticas se pueden considerar como el resultado de un intercambio de fotones entre las partículas

cargadas interactuantes, las cuales se pueden visualizar a través de un espectro característico.

Desde el punto de vista de la interacción de la radiación electromagnética, con la materia, un espectro puede definirse, como una representación gráfica de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética, emitida o absorbida por una muestra de sustancia, en función de la longitud de onda (o frecuencia) de dicha radiación [3].

Un espectro depende en principio, de la separación entre los niveles de energía; ahora bien, un sistema molecular, puede tener diferentes tipos de energía, como la energía de rotación, asociada al movimiento de giro o rotación de las moléculas; energía de vibración, debida a las oscilaciones periódicas o vibraciones de los átomos alrededor de sus posiciones de equilibrio; energía electrónica, que depende de las posiciones medias de los electrones respecto de los núcleos, etc.

Los diferentes tipos de energía de los sistemas atómicos o moleculares son de orden de magnitud bastante diferente, por lo que las transiciones entre los correspondientes niveles de energía, dan lugar a la emisión o absorción de radiación en distintas zonas de frecuencia. Por esto, se pueden distinguir distintos tipos de espectros, según los niveles de energía que intervienen y las técnicas experimentales utilizadas para su observación.

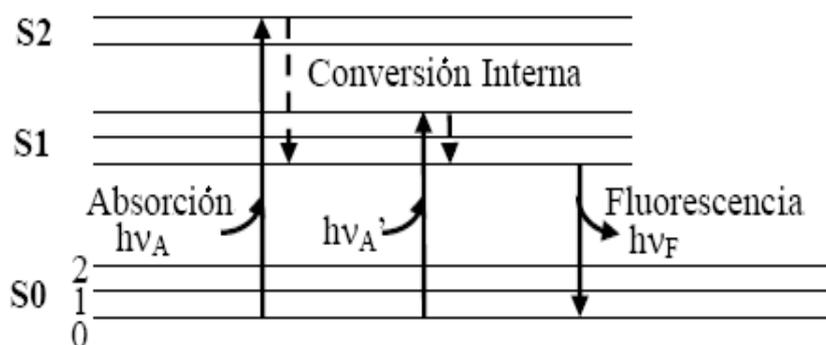


Figura 2-1. Esquema general de los primeros niveles de energía de una molécula orgánica.

En la figura 2-1 se puede observar la transición electrónica inducida por la absorción de un cuanto de luz, dependiendo de la energía que transforma una molécula de su estado base S₀ a alguno de los niveles vibracionales de estados excitados S₁, S₂, S₃, etc. La energía de excitación del estado S₂ o cualquier otro estado de mayor energía, se disipa rápidamente debido a colisiones inelásticas alcanzando la molécula el nivel cero vibracional del estado S₁, debido a la

relajación no radiativa. En el proceso de conversión interna, la energía es transferida desde un punto en la hipersuperficie de la energía potencial, de un estado (por ejemplo S_2) a la hipersuperficie de energía potencial S_1 . Después de esto, el exceso de energía vibracional que posee el estado S_1 , se disipa a través de una relajación vibracional y el sistema alcanza un estado en equilibrio S_1 , de la molécula. La fluorescencia se genera a partir de transiciones radiativas en una molécula, entre niveles de la misma multiplicidad ^[4]. La emisión ocurre como resultado de la transición de la molécula desde S_1 al estado S_0 . En la tabla 2-1 se pueden observar los tiempos en los que ocurren algunos de estos eventos mencionados.

Tabla 2-1 Escala de tiempo para los procesos de fluorescencia

Transición	Proceso	La constante de velocidad	Escala de tiempo (Segundos)
$S(0) \Rightarrow S(1)$ o $S(n)$	Absorción (excitación)	Instantánea	10^{-15}
$S(n) \Rightarrow S(1)$	Conversión interna	$k(ic)$	10^{-14} a 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(1)$	Relajación vibracional	$k(VR)$	10^{-12} a 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Fluorescencia	$k(f)$ o Γ	10^{-9} a 10^{-7}
$S(1) \Rightarrow T(1)$	Cruce entre sistemas	$k(pT)$	10^{-10} a 10^{-8}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Relajación no radiativa Enfriamiento rápido	$k(NR)$, $K(q)$	10^{-7} a 10^{-5}
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Fosforescencia	$k(p)$	10^{-3} a 100
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Relajación no radiativa Enfriamiento rápido	$k(nr)$, $K(QT)$	10^{-3} a 100

El fenómeno de fluorescencia puede dar valiosa información en el estudio de una molécula biológica en particular, figura 2-2:

1. Debido a la pérdida de energía entre la absorción y la emisión que ocurre como resultado de transiciones no radiativas, la fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que las de excitación.
2. Las longitudes de onda de excitación son independientes de las de emisión.

Desde el punto de vista molecular, cuando la radiación electromagnética incide sobre las células, éstas absorben radiación, es decir, las moléculas que constituyen las células absorben la radiación electromagnética y se excitan (figura 2-2, espectros de excitación). La mecánica cuántica nos dice que se produce una

transición entre los niveles de energía de algunas de estas moléculas, dependiendo de la longitud de onda de la radiación electromagnética. Una vez que algunas de las moléculas que constituyen las células se han excitado, puede ocurrir algún proceso de desexcitación, radiativo o no radiativo. En la espectroscopía óptica de fluorescencia se trabaja en los procesos de desexcitación radiativos y en particular en el fluorescente (figura 2-2, espectros de emisión).

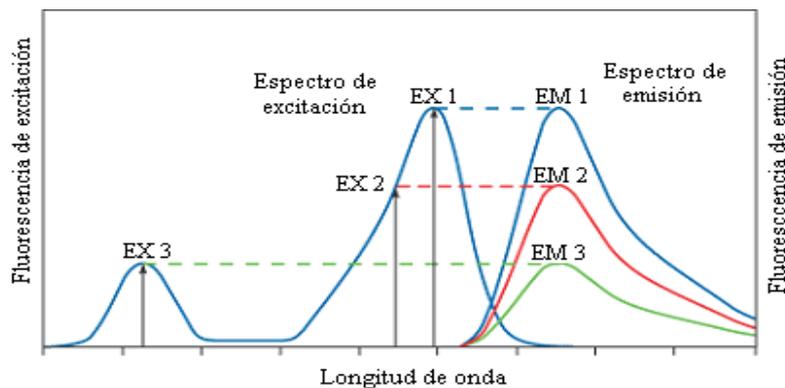


Figura 2-2. Mecanismos de excitación y emisión de fluorescencia

2.2 FORMAS DE INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON MATERIAL BIOLÓGICO

Cuando la radiación electromagnética interactúa con un tejido biológico produce fenómenos como: polarización, refracción, transmisión, reflexión, dispersión, absorción y emisión.

Polarización. Es una característica de las ondas transversales, la cual es causada por la simetría y orientación de los vectores de momento eléctrico y la función de onda involucrada en las transiciones electrónicas, y consiste en permitir el paso de una onda en determinada dirección. Los átomos por presentar una simetría esférica, no tienen momentos eléctricos permanentes, pero si son expuestos, a un campo electromagnético, se polarizan, logrando de esta manera momentos bipolares eléctricos, inducidos en la dirección del campo; consecuencia que se debe a la perturbación del movimiento de los electrones ocasionada por el campo eléctrico aplicado. En el caso de las moléculas que tienen momentos bipolares eléctricos permanentes, cuando se les aplica un campo electromagnético, estas se orientan paralelamente a él, experimentando un torque.

De esta forma, cuando un material es expuesto a la presencia de un campo electromagnético se polariza, haciendo que los momentos bipolares eléctricos de sus átomos y de sus moléculas se orienten en la dirección del campo eléctrico. La polarización es empleada en varios métodos biofotónicos, donde se usa la luz polarizada para excitar y detectar luminiscencia en el tejido ^[5].

Refracción. Este fenómeno se presenta, cuando la radiación electromagnética incide con un ángulo determinado, sobre la interfaz de separación de dos medios con distintos índices de refracción (n). El rayo varía la dirección o se refracta al atravesar el segundo medio, debido a la diferencia de la velocidad de la radiación existente en los dos medios de propagación (medios con diferentes densidades), la cual es determinada por el índice de refracción (n) ^[5]. La velocidad de la radiación electromagnética en un medio determinado depende de su longitud de onda, por lo tanto, para poder encontrar el valor del índice de refracción (n) con un criterio absoluto, debe especificarse la longitud de onda y el medio de referencia ^[6].

El índice de refracción para un medio, determina la velocidad de la luz en éste y el cambio debido al índice de refracción puede ser continuo o abrupto y muestra la dispersión, la refracción y la reflexión. Para determinar el índice de refracción (n) de un tejido el cual es heterogéneo, se hace necesario conocer el índice de refracción de los diferentes componentes presentes en este, y así poder prescribir un valor promedio del índice de refracción del tejido en conjunto; también se indica el promedio del volumen y del peso de los valores de los componentes del tejido.

El componente principal de la mayoría de los tejidos es el agua, esta tiene un índice de $n=1,33$ y representa el mínimo valor para los componentes líquidos y suaves del tejido. Las partículas de melaninas encontradas generalmente en la capa epidérmica de la piel, están en el límite superior de los valores, con un índice de refracción con valores mayores a 1,6. Los índices de refracción para tejidos completos se encuentran en el rango de 1,36 y 1,40. Los fluidos extracelulares e intracelulares, como el citoplasma, están en el rango de 1,35 a 1,38. El índice de refracción para tejido graso es alrededor de 1,45 y para tejidos duros el índice es alrededor de 1,62 ^[5].

Reflexión. Este fenómeno se muestra en la interfaz del medio en que se propaga la luz, y se presenta cuando el haz de luz, incide sobre materiales que tienen diferentes índices de refracción, haciendo que el haz perturbe o no su transmisión y los rayos cambien su dirección haciendo que se produzca una reflexión. Este

suceso depende del ángulo de incidencia y del tipo de superficie donde esté llegando.

Dependiendo de la naturaleza del material se pueden considerar dos tipos de reflexión:

Reflexión especular: el ángulo de reflexión y el de incidencia tienen el mismo valor y el haz de luz reflejado tiene una trayectoria muy definida y concreta. Este tipo de reflexión se puede ver en superficies muy lisas o pulidas, donde la dimensión de la longitud de onda de la radiación es mayor a las irregularidades de la superficie de incidencia.

Reflexión difusa: se puede observar en superficies estriadas, donde los rayos de luz llegan y se dirigen aleatoriamente en múltiples direcciones, es decir, la longitud de onda de la radiación, es menor que las irregularidades de la superficie ^[7].

En el caso de los tejidos biológicos, cuando interactúan con la radiación electromagnética se produce una reflexión difusa, irradiando parte de los fotones en todas las interfaces presentes en el tejido; la menor reflexión que se logra conseguir, para evitar pérdida de energía en un tejido es cuando el ángulo de incidencia del haz, sobre la superficie, es de 90°.

Transmisión. Fenómeno que tiene lugar cuando un haz de luz incide sobre un medio de espesor determinado. La transmisión es la proporción de flujo radiante que atraviesa el medio es $T = I/I_0$, donde, I_0 es la intensidad de luz incidente y I es la intensidad emergente del medio.

A lo largo del espectro óptico, la transmisión varía intensamente para cada longitud de onda. Además, las características de transmisión del medio se modifican enormemente con la naturaleza de éste. La luz transmitida que emerge del tejido dependerá, de los fenómenos de absorción y dispersión, así como de la reflexión en la interfaz del medio.

La radiación transmitida está en función inversa de la atenuación realizada por el medio. Puede considerarse que la atenuación tiene dos componentes: la dispersión, que distrae los fotones del medio y la absorción, que produce la extinción real de dichos fotones. Tanto la dispersión como la absorción dependen de la longitud de onda de la radiación y de las características del medio considerado (tipo de partículas que lo componen, distribución, etc.) ^[5].

El estudio de la transmisión de fotones está basado en las variaciones espaciales de los índices de refracción en la muestra de tejido. Sin embargo, este fenómeno no es de relevancia ya que la mayoría de los tejidos son altamente dispersivos y la radiación electromagnética, que alcanza a entrar en la muestra, es rápidamente absorbida por alguna especie molecular ^[5].

Dispersión. Cuando el haz de luz llega a un material, este se descompone en diferentes longitudes de onda, originándose el fenómeno conocido como dispersión, el cual se refiere a la proporción de flujo radiante que se distrae dentro del tejido; siendo este también la suma de la energía que se refleja y se refracta, aunque atenúa la transmisión y da paso a la absorción. La causa de que se produzca un fenómeno de dispersión es debido a que la velocidad, de la onda de radiación electromagnética, depende de la frecuencia de la misma, es decir, que a frecuencias altas los campos eléctrico y magnético varían haciendo que la polarización de la materia y la magnetización no sigan estas variaciones.

La descripción más simple de la dispersión se puede hacer considerando la luz incidente, como una onda plana, onda que es de amplitud uniforme y que se encuentra perpendicular al plano de la dirección de propagación. Cuando una onda plana monocromática, que tiene una intensidad dada I_0 , se encuentra con un objeto dispersor, una parte de su potencia P es redirigida espacialmente ^[5]. En tejidos biológicos, la dispersión es el mecanismo de interacción dominante en la propagación de la luz. La dispersión es clasificada por la relación del tamaño del objeto dispersor y la longitud de onda de la luz incidente:

El límite Rayleigh: Este tipo de dispersión da lugar a una distribución de las intensidades de la radiación dispersada, que es relativamente simétrica en todas las direcciones alrededor de la partícula. Las estructuras celulares, que hacen dispersar la luz en este límite, o sea, que tienen un tamaño menor que la longitud de onda de la luz incidente, son componentes celulares como membranas y componentes extracelulares compuestos en su mayoría por fibras de colágeno.

El régimen Mie: La teoría de Mie, describe la dispersión de la luz con objetos esféricos, la cual es aplicable a cualquier proporción entre la longitud de onda y el objeto dispersor. En el rango intermedio de esta proporción donde las aproximaciones de Rayleigh y la geométrica no son válidas, se usa esta teoría, es decir, la región donde la longitud de onda es comparable con el tamaño del dispersor, es el régimen Mie. Varias estructuras celulares, como la mitocondria y el núcleo y componentes extracelulares, como fibras de colágeno, poseen tamaños

de cientos de nanómetros y unos cuantos micrómetros, que son comparados con las longitudes de onda utilizadas para aplicaciones biomédicas.

La dispersión ocurre, cuando hay variaciones espaciales de los índices de refracción, ya sean continuos o abruptos. En un tejido biológico, los dispersores más importantes son las organelas celulares, debido a que estas muestran una alta anisotropía, variabilidad en su forma y tamaño, dando origen a fenómenos de este tipo.

La mitocondria, es la organela encargada de la respiración y la producción de energía en las células, además, es uno de los dispersores más dominantes; estas estructuras son un poco cilíndricas y varían en tamaño dependiendo del tipo de célula, con dimensiones que oscilan entre 0.5 hasta 2 μ m, este organelo, además de estar encapsulado en una membrana lipídica, contiene lípidos internos, estas estructuras lipídicas tienen un gran contraste óptico a través del citoplasma y produce efectos de dispersión fuertemente observables.

El órgano celular más grande es el núcleo celular con un diámetro entre 4-6 μ m. La célula varía de forma y tamaño dependiendo del tipo de tejido. Una célula aislada puede ser un fuerte dispersor, pero en un tejido el fenómeno de dispersión es de origen subcelular.

En la piel, los melanosomas, son estructuras muy importantes en la dispersión y tienen un tamaño de 100 nm a 2 μ m. En la sangre, los eritrocitos son los dispersores más fuertes, estos tienen un espesor de 2 μ m aproximadamente y un diámetro entre 7 y 9 μ m; las propiedades de dispersión de la sangre dependen del hematocrito o sea del volumen de eritrocitos y de su grado de aglomeración.

Los tejidos de soporte, están conformados por proteínas celulares y extracelulares, como la elastina y el colágeno, que proveen potencia mecánica y durabilidad. Las propiedades dispersivas de esta clase de tejidos, depende, a pequeña escala, de un conjunto de heterogeneidades y a gran escala, de variaciones en la forma de las estructuras; los tamaños característicos tenidos en cuenta en la pequeña escala son de orden de magnitud más pequeños que la longitud de onda de excitación ^[5].

Absorción. La absorción, es un proceso por el cual, una especie molecular extrae energía de la luz incidente. Este fenómeno tiene lugar cuando la frecuencia de la onda electromagnética, coincide con la frecuencia del espectro de emisión de un átomo o molécula; así, cuando la luz atraviesa un material, ciertas frecuencias se

eliminan selectivamente por la absorción, y este proceso, brinda un medio para caracterizar los componentes de la muestra ^[5].

Este proceso, es la transición de una especie (molécula o átomo) de un nivel de menor energía a uno mayor, esta transición requiere de la absorción de energía, que permita, el cambio de nivel y está dada por $h\nu = \Delta E$, donde, $h\nu$ es la cantidad de energía del fotón y ΔE es la diferencia de energía entre los dos niveles. Este tipo de transiciones se dan en regiones del espectro llamadas bandas de absorción, las cuales, atienden a una especie atómica o molecular en particular. Existen tres procesos de absorción:

Absorción entre niveles electrónicos es cuando un grupo de moléculas que están en equilibrio, tienen una distribución térmica en el nivel vibracional y rotacional, en el estado base (S_0). Cuando una molécula absorbe energía de excitación, esta es elevada desde el estado base hasta algún nivel vibracional de uno de los estados excitados del singulete (S_n), ver figura 2-2.

La intensidad de la absorción (fracción de moléculas en el estado base promovidas a un estado electrónico excitado), depende de la intensidad de la radiación de excitación (número de fotones) y la probabilidad de la transición de la energía de los fotones.

Absorción que involucra los diferentes estados vibracionales son determinados por los niveles vibracionales de los átomos presentes en las moléculas, estas vibraciones a diferentes grados de libertad se encuentran cuantizadas, dando una serie de niveles de vibración para cada modelo vibracional de una molécula. Una transición vibracional, ocurre cuando una molécula pasa de un estado vibracional a otro.

Absorción que envuelve los diferentes estados de rotación de una molécula, son representados por los niveles rotacionales, estos niveles de energía están cuantizados y corresponden a energías fotónicas, desde el infrarrojo a longitudes de onda menores al milímetro. Los niveles de energía electrónicos, de las moléculas, están asociados con los orbitales moleculares que describen la distribución de electrones en la molécula. Cuando una molécula sufre una transición electrónica, un electrón, es transferido desde un orbital molecular a otro. Hay casos para los cuales la excitación es considerada localizada, para un enlace particular o para grupos de átomos ^[5].

2.3 ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL ANÁLISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

La complejidad de los tejidos biológicos, sugiere que las técnicas y estudios estén basados en especies individuales de niveles bioquímicos fundamentales. El análisis de las propiedades de absorción y de emisión de fluorescencia de varios fluoróforos, explican mejor las interacciones complejas, que pueden ocurrir en muestras de tejido. En un estudio, por un método óptico, como la espectroscopía óptica de fluorescencia, se puede obtener información significativa, acerca de varios fluoróforos presentes, como también de su ambiente local. Una de las razones más comunes para investigar especies fluorescentes, es la detección de enfermedades, sin necesidad de utilizar marcadores o fluoróforos exógenos. Esto se debe a que la célula en estados de enfermedad, generalmente tiene velocidades de metabolismo diferentes o estructuras alteradas, por lo tanto hay variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia. Estas diferencias en los espectros están marcadas por la concentración de fluoróforos o su distribución a lo largo del tejido, el ambiente local que rodea el fluoróforo, la arquitectura particular del tejido y la atenuación de la luz, que depende de la longitud de onda, debido, a la cantidad de los cromóforos que no emiten fluorescencia. En la tabla 2-2 se listan algunos fluoróforos endógenos que juegan un rol fundamental, en las transformaciones que ocurren en los tejidos durante la carcinogénesis ^[1].

Tabla 2-2 Longitudes de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos

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

La espectroscopía óptica de fluorescencia para el análisis de tejidos biológicos, depende específicamente, de la concentración y distribución de fluoróforos presentes en los mismos, como también, del entorno bioquímico / biofísico, el cual puede alterar la cantidad de fluorescencia cedida y el tiempo de vida de los fluoróforos. El tejido epitelial o escamoso tiene cuatro capas de células primarias que están sobre la membrana basal y por debajo esta el estroma; los fluoróforos como también su concentración y distribución pueden variar significativamente

entre estas capas de tejido. La espectroscopía de fluorescencia en tejidos también depende de la absorción y dispersión que resulta de la concentración y distribución de la no fluorescencia absorbida y dispersada respectivamente, dentro de las diferentes capas del tejido, todos estos efectos de las variables señaladas en la espectroscopía óptica de fluorescencia de tejidos son dependientes de la longitud de onda de excitación. Los fluoróforos endógenos del cuello uterino serán excitados y de allí emitirán fluorescencia. Las propiedades de absorción y distribución de la luz, en los tejidos, afectarán tanto las longitudes de onda de excitación, como las de emisión, por consiguiente, solo los fluoróforos contenidos en las capas de los tejidos del cuello uterino, en la cual la luz de excitación penetra y de la cual la luz de emisión puede escapar de la superficie del tejido, producirá fluorescencia medible.

La espectroscopía óptica de fluorescencia, proporciona características discriminantes, en el análisis de los cambios bioquímicos y estructurales en materiales biológicos; además, de la observación de cambios en vivo, mediante espectros característicos de los estados de normalidad y patología, de los tejidos biológicos. Es por ello que esta técnica, puede contribuir al diagnóstico médico a través de la observación en vivo, de enfermedades como los precánceres de cuello uterino.

Una revisión de los fluoróforos responsables de la fluorescencia de las células, se encuentra en S. Andersson- Engels et al ^[8], quienes mencionan como fluoróforos mejor conocidos en tejido biológico que contribuyen a la señal de fluorescencia bajo excitación de luz, en el cercano ultravioleta al triptófano (emisión a 350 nm), al colágeno (a 390 nm), a la elástina (a 410 nm), NADH (a 470 nm), a las flavinas (a 520 nm), a la melanina (a 540 nm) y finalmente, a las porfirinas (en la región roja del espectro). R. R. Alfano et al midieron la fluorescencia de células normales y células cancerosas de riñón de rata, encontrando diferencias sustanciales en los espectros ^[9]. Ellos proponen a las flavinas, como responsables de la fluorescencia (a nivel mitocondrial), en especial al dinucleótido de adenina y flavina (FAD). Usaron como longitud de onda de excitación $\lambda = 488$ nm del láser iónico de argón.

2.4 COMPORTAMIENTO ÓPTICO DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS

Los tejidos biológicos considerados como material óptico, se comportan como organismos turbios, que por el contrario a los materiales ópticos clásicos no poseen superficies planas, estructuras cristalinas o un índice de refracción simple.

Los tejidos están compuestos por una enorme variedad de moléculas, habitualmente de tamaño menor que la longitud de onda de la luz visible, la cual no tiene patrones geométricos rígidos y repetitivos de un punto a otro de su ambiente. Por encima de esta escala, se encuentran las unidades celulares, con escasos patrones de regularidad en su distribución. Estas unidades celulares sí pueden ser de un tamaño próximo a las longitudes de onda de la luz. Cuando se irradian estructuras inhomogéneas, como los tejidos, se producen conjuntamente absorción y dispersión en ellos. La forma como se realizan ambos fenómenos, depende de la longitud de onda de la radiación o del tamaño de las partículas del tejido; en la absorción tiene importancia un factor adicional: la presencia de determinados pigmentos, elementos cromóforos (elementos que actúan como cuerpos negros) como la melanina, hemoglobina y la mioglobina ^[7].

La célula se considera la unidad estructural y funcional de la vida; es la unidad más pequeña de materia viva capaz de realizar todas las actividades inherentes a los seres vivos: tipo preciso de organización, metabolismo, homeóstasis, movimiento, irritabilidad, crecimiento, reproducción y adaptación al cambio ambiental ^[10]. La teoría celular es una de las generalizaciones más amplias y fundamentales de la biología y establece que: 1) todos los seres vivos están formados por células y productos celulares; 2) sólo se forman nuevas células por división de células preexistentes; 3) existen similitudes fundamentales en los constituyentes químicos y las actividades metabólicas de todas las células.

Las células de las plantas y animales presentan una gran variedad de tamaños, formas, colores y estructuras internas, que guardan relación con las funciones específicas que éstas deben efectuar, pero todas exhiben ciertas características en común. Casi todas las células contienen un núcleo y otras estructuras internas llamadas organelos. Además, las células vivas, están integradas por moléculas inanimadas ^[11]. Cuando se examinan individualmente, estas moléculas aisladas se ajustan a todas las leyes físicas y químicas que rigen el comportamiento de la materia inerte. Los seres vivos poseen estructuras internas intrincadas que contienen muchas clases de moléculas complejas y se presentan, además, en una variedad asombrosa de especies diferentes.

La mayor parte de los componentes químicos de los organismos, son compuestos orgánicos de carbono en los que este elemento se halla relativamente reducido o hidrogenado, muchas biomoléculas orgánicas contienen también nitrógeno. Los principales grupos moleculares que componen las células, son los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y los carbohidratos. Los organismos vivos tienen la capacidad de extraer y transformar la energía de su entorno a partir de materias

primas sencillas y de emplearla para edificar y mantener sus propias e intrincadas estructuras.

El metabolismo puede definirse, como la suma total de todas las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la célula. Las funciones específicas del metabolismo son principalmente ^[12]: 1) la obtención de energía química de las moléculas combustibles o de la luz solar absorbida, 2) el ensamble de sillares de construcción para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares y, 3) la formación y degradación de las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células.

El metabolismo se divide en dos fases principales: catabolismo y anabolismo. El catabolismo es la fase degradativa del metabolismo, en la cual las moléculas nutritivas complejas y relativamente grandes (glúcidos, lípidos y proteínas) que provienen, o bien del entorno o bien de sus propios depósitos de reserva, se degradan para producir moléculas más sencillas tales como ácido láctico, ácido acético, CO₂, amoníaco o úrea. El anabolismo constituye la fase constructiva o biosintética del metabolismo, en la cual tiene lugar la biosíntesis enzimática de los componentes moleculares de las células, tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos a partir de sus precursores sencillos.

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico, mucho mayor que la de los catalizadores hechos por el hombre. La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan además, uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores; éstos pueden ser un ion metálico, o una molécula orgánica llamada coenzima, aunque algunas enzimas necesitan de ambos. Por lo general, las coenzimas actúan como transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones, los cuales son transferidos en la reacción enzimática global.

Un proceso metabólico determinado puede necesitar varias enzimas o inclusive todo un sistema enzimático, para llevarse a cabo. Los diferentes enzimas y sistemas enzimáticos están localizados, en uno u otro organelo o en alguna parte de la estructura del citoplasma. Las enzimas de óxido-reducción actúan en el centro del metabolismo celular energético. La energía liberada en la oxidación o reducción por compuestos orgánicos es capturada con eficiencias variables en formas muy diversas, tales como ATP, potenciales de membrana, o coenzimas reducidas.

Las deshidrogenasas, enzimas de óxido-reducción, necesitan como coenzimas al NAD (dinucleótido de adenina y nicotinamida) o al NADP (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato). Las deshidrogenasas NAD-dependientes, intervienen de manera primordial en la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno, en la respiración metabólica, proceso a través del cual obtiene energía la célula. La utilidad del NAD⁺ (+ por su forma oxidada) y del NADP⁺ para propósitos de análisis enzimático depende de algunas de sus inusuales propiedades ^[12]. 1) Sirven como agentes naturales de oxidación o reducción en una amplia variedad de sistemas enzimáticos específicos. Con la enzima apropiada como catalizador, pueden oxidar o reducir selectivamente un sustrato particular en presencia de otros muchos compuestos. 2) Las formas reducidas NADH y NADPH, además de absorber luz en el cercano UV, tienen propiedades de emitir luz fluorescente, mientras las formas oxidadas no lo son. NADH y NADPH tienen bandas de absorción idénticas, con el máximo en 340 nm, NAD⁺ y NADP⁺ no absorben a esta longitud de onda. De esta forma, los cambios en el estado de oxidación o reducción son medidos por espectroscopía óptica de fluorescencia.

2.5 ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ESPECIES INDIVIDUALES

Los análisis bioquímicos, se basan en estudios fundamentales o generales de la base constituyente de los sistemas biológicos, los cuales, son compuestos bioquímicos individuales como el triptofano, colágeno, la forma reducida del nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), flavinas (FAD) y hemoglobina entre otros. Tales estudios permiten determinar y caracterizar las propiedades fluorescentes de estas especies que se denominan fluoróforos y pueden ser endógenos o exógenos.

Fluoróforos endógenos. Son especies fluorescentes en sistemas biológicos, la mayoría de estos están asociados con la matriz estructural de los tejidos o con varios procesos metabólicos celulares, pueden ser aminoácidos, estructuras proteínicas, enzimas, coenzimas, vitaminas, lípidos y porfirinas y cada uno tiene un único espectro de emisión ^[12]. En el caso de las matrices estructurales, los fluoróforos más comunes son el colágeno y la elastina; la fluorescencia de estos compuestos se debe principalmente al entrecruzamiento de varios aminoácidos en su estructura ^[5].

Algunos de los fluoróforos endógenos en los sistemas biológicos humanos y animales se relacionan con el metabolismo celular. Las especies predominantes en esta categoría incluyen NADH, FAD y lipopigmentos fluorescentes fuertes

(lipofuscina y ceroides). Además de estos, existen muchos otros fluoróforos endógenos que emiten a varias longitudes de onda y cubren rangos del ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Estos fluoróforos incluyen aromáticos, aminoácidos como triptófano, tiroxina y fenilamina, varias porfirinas (hemoglobina y la mioglobina). La figura 2-3, muestra los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de varios fluoróforos endógenos presentes en los tejidos biológicos [16]. Como estas especies fluorescentes son generalmente estructurales y metabólicas, pueden dar información sobre alteraciones en los tejidos.

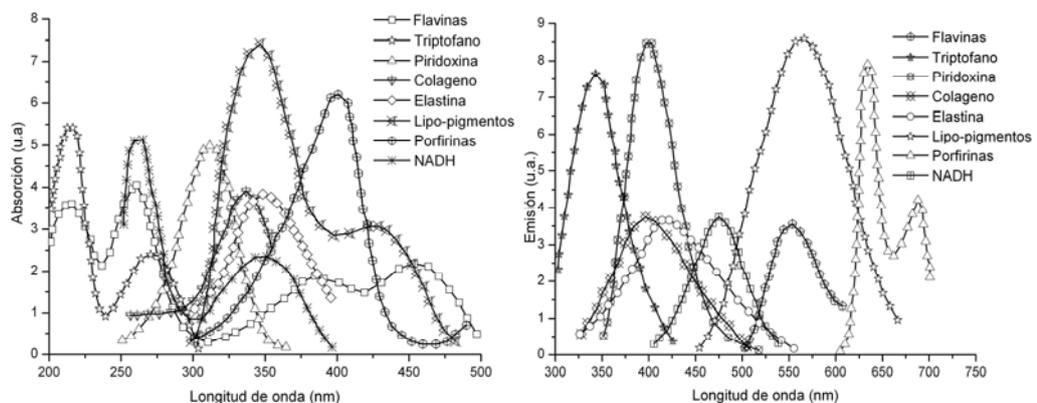


Figura 2-3. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de fluoróforos endógenos.

Fluoróforos exógenos. Son sustancias que al ser suministradas al tejido se acoplan a un cierto tipo de molécula y tienen propiedades de fluorescencia. Además del gran número de fluoróforos endógenos utilizados en el diagnóstico biomédico, se han estudiado y creado fluoróforos exógenos para diferentes propósitos y aplicaciones, como el monitoreo de la función celular, marcación de tumores, para determinar la viabilidad de las células o la permeabilidad de sus membranas entre otros. La ventaja de usar fluoróforos exógenos es que se pueden seleccionar las propiedades fotofísicas y farmacocinéticas de acuerdo a su aplicación, además de emitir con mayor intensidad que los endógenos [13].

2.6 LOS FLUORÓFOROS EN EL ANÁLISIS DE ESTADOS PATOLÓGICOS

El cambio en la concentración de fluoróforos, puede ser atribuido a varios eventos, en ciertos casos algunos químicos pueden dejarse de producir o al contrario producirse más en estados de enfermedad. Del mismo modo, la distribución o la forma del fluoróforo puede variar a lo largo del tejido, por ejemplo NADH es una

molécula fluorescente en su forma reducida y no es fluorescente en su forma oxidada.

El cambio en la microestructura (ambiente local) que rodea al fluoróforo puede tener efectos importantes en las propiedades de fluorescencia, como la eficiencia cuántica, la posición espectral del máximo de la emisión fluorescente, el ancho de su línea espectral y el tiempo de vida de la fluorescencia. Todos estos factores tienen un impacto significativo en la emisión de fluorescencia del tejido ya que varían sus propiedades ópticas.

Un factor importante en las diferencias asociadas con los estados de enfermedad del tejido, es la presencia de cromóforos no fluorescentes como la hemoglobina, ya que varían en concentración, dependiendo del estado y tipo de la enfermedad y pueden absorber la luz a las longitudes de onda de la fluorescencia emitida por el tejido o también absorber longitudes de onda de la luz de excitación empleada en el análisis. Un ejemplo es el incremento de la vascularización del tejido tumoral debido a la angiogénesis, esto incrementa la hemoglobina que absorbe en el rango visible del espectro electromagnético.

REFERENCIAS

- ¹ N. Ramanujan. Spectroscopy fluorescence in vivo, Encyclopedia of analytical chemistry, Ed. Meyers (2000).
- ² T. Breslin, F. Xu, G. Palmer, C. Zhu, K. Gilchrist, N. Ramanujam. Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues. Annual surgery Oncology. 11 (2004) 65-70.
- ³ Alonso y Finn. Física Volumen III. Fundamentos Cuánticos y Estadísticos. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana.
- ⁴ J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press (1983)
- ⁵ T. Vo-Dinh. Biomedical Photonics. Handbook. CRC (2003).
- ⁶ Eugene D. Olsen. Métodos Ópticos de Análisis. Reverté (1986).
- ⁷ F. Sendra Portero. Fototerapia: Propiedades físicas de la luz - interacción con los tejidos.
- ⁸ S. Andersson-Engels et al., Photochem. Photobiol., 53 (1991) 807-814.
- ⁹ R. R. Alfano, et al., IEEE Journal of Quantum Electronics 20 (1984) 1512-1515.
- ¹⁰ C. A. Ville, E. Peal Solomon, P. William Davis, Biología. Nueva editorial interamericana (1987).
- ¹¹ A. L. Lehninger, Bioquímica, Ediciones Omega S.A. (1982).
- ¹² G. Palmer, N. Ramanujam, et al. Autofluorescence and diffuse reflectance properties of malignant and benign breast tissues. Ann Surg Oncol 11 (2004) 65-70.

3. SIMULACIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA

Para el análisis de medios turbios como el tejido biológico, la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia se basa en la Ley de Beer – Lambert. Para observar detalladamente el desarrollo de esta ley comenzaremos por describir la ley de Lambert – Bouger que relaciona la absorción de la luz de un medio homogéneo ópticamente diluido y el espesor del medio [1].

$$\frac{dI}{I} = \mu_a dl \quad 3-1$$

La ecuación 3-1 describe como cada capa sucesiva dl del medio absorbe la misma fracción dI/I de la intensidad de luz incidente I por la constante μ_a (coeficiente de absorción). La intensidad de luz transmitida I a través de la distancia l es $I = I_0 e^{-\mu_a l}$. El coeficiente de absorción puede así ser interpretado como la probabilidad de que un fotón sea absorbido por el medio por unidad de longitud. El recíproco del coeficiente de absorción, conocido como la longitud de absorción, es la distancia requerida por la intensidad de haz de luz para de crecer en e^{-1} de la intensidad de luz inicial, quedando $I = I_0 10^{-Kl}$, donde, K es el coeficiente de extinción, entonces la absorbancia $A = Kl$, y es representada como,

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad 3-2$$

En 1852 Beer, determina que el coeficiente de absorción de una sustancia es linealmente relacionado con la concentración c de la sustancia diluida en un medio no absorbente, $\mu_a = \alpha c$, donde, α es el coeficiente de absorción específico. La ley de Lambert – Bouger se puede escribir entonces como, $I = I_0 e^{-\alpha c l}$ ó $I = I_0 10^{-\epsilon c l}$, conocida como la Ley de Beer – Lambert, donde ϵ es el coeficiente de extinción específico [1].

En una solución que contiene n sustancias, el total de la absorbancia es la suma individual de los coeficientes de extinción K multiplicados por l , $A = (K_1 + K_2 + \dots + K_n)l$ equivalente a decir que $A = (\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \dots + \varepsilon_n c_n)l$.

Para modelar la fluorescencia de un tejido biológico, el tejido es representado como una sola capa, la cual es infinitamente profunda con respecto a la capacidad de penetración de la luz incidente. Este supuesto es más apropiado para longitudes de onda de excitación, para la cual e^{-1} de profundidad de penetración es menor que el espesor de la capa superior. Adicionalmente se realizan otras suposiciones [2]:

1. La intensidad de luz se atenúa exponencialmente en el tejido biológico, debido a la absorción y la dispersión. Esta atenuación es total, ya que no se trata la dispersión y la absorción separadamente.
2. Los fluoróforos son distribuidos homogéneamente en todo el tejido biológico.
3. El haz de luz de excitación se asume uniforme tanto de perfil como infinito de lado.

Estas suposiciones son equivalentes a restringir el modelo a una sola dimensión en la interacción de la luz incidente, con el tejido biológico. La intensidad de fluorescencia $F(\lambda_x, \lambda_m)$ es función de la longitud de onda de excitación λ_x y de la longitud de onda de emisión λ_m y puede ser escrita de la siguiente forma,

$$F(\lambda_x, \lambda_m) = k \int_0^{\infty} P(\lambda_x) e^{-\mu_t(\lambda_x)z} \mu_a(\lambda_x) \frac{\phi(\lambda_x, \lambda_m)}{2} e^{-\mu_t(\lambda_m)z} dz \quad 3-3$$

$P(\lambda_x)$: Potencia de la luz incidente a la longitud de onda de excitación.

$\mu_t(\lambda)$: Atenuación total del tejido.

$\mu_a(\lambda)$: Coeficiente de absorción del tejido.

$\phi(\lambda_x, \lambda_m)$: Rendimiento cuántico, definido como el total de la energía fluorescente emitida a λ_m sobre el total de la energía absorbida a λ_x .

z : Distancia de penetración de la luz en el tejido.

Debido a la dispersión, la máxima intensidad de luz justo adentro de la superficie del tejido puede ser mayor que la intensidad de la luz incidente. Este efecto se incluye en la ecuación 3-3 como k (factor de proporcionalidad que depende del

índice de refracción del tejido, la longitud de onda de la luz incidente y de la eficiencia del detector).

La ecuación 3-3 tiene una simple interpretación física ^[2], donde,

$P(\lambda_x) e^{-\mu_t(\lambda_x)z}$, representa la atenuación de la luz incidente.

$\mu_a(\lambda_x) \frac{\phi(\lambda_x, \lambda_m)}{2}$, es la conversión de la luz incidente en fluorescencia.

$e^{-\mu_t(\lambda_m)z} dz$, representa la atenuación de la luz en el tejido dirigida a fluorescencia.

Integrando la ecuación 3-3 se obtiene que,

$$F(\lambda_x, \lambda_m) = \frac{kP(\lambda_x) \mu_a(\lambda_x) \frac{\phi(\lambda_x, \lambda_m)}{2}}{\mu_t(\lambda_x) + \mu_t(\lambda_m)} \quad 3-4$$

Los términos $\mu_a \phi$ y μ_t contienen contribuciones individuales de todos los fluoróforos presentes en el tejido biológico. Es esta información la que se desea separar, lo que nos impulsa a proponer una forma más general de expresar la ecuación $\mu_a \phi$ y μ_t como una suma sobre todos los N fluoróforos presentes en el tejido biológico ^[2].

$$F(\lambda_x, \lambda_m) = kP(\lambda_x) \frac{\sum_{i=1}^N \mu_{ai}(\lambda_x) \frac{\phi_i(\lambda_x, \lambda_m)}{2}}{\sum_{i=1}^N (\mu_{ti}(\lambda_x) + \mu_{ti}(\lambda_m))} \quad 3-5$$

Recordando que los fluoróforos presentes en el tejido del cuello uterino, que contribuyen a la señal de fluorescencia bajo excitación de luz, a una longitud de onda de 337.1 nm son el colágeno (emisión a 393 nm), la elastina (emisión a 410 nm), el NADH (a 470 nm) y las flavinas (a 520 nm) ^[3].

Usando esta información en la ecuación 3-5 y a una longitud de onda de excitación de 337.1 nm, la forma más general de representar la contribución de todos los fluoróforos presentes en los tejidos de cuello uterino es,

$$F(337.1, \lambda_m) = \frac{C(337.1, \lambda_m) + E(337.1, \lambda_m) + NADH(337.1, \lambda_m) + FAD(337.1, \lambda_m)}{C_1 + C_2 + C_3 + C_4} \quad 3-6$$

Donde,

$$C(337.1, \lambda_m) = \mu_{aCol}(337.1) \frac{\phi_{Col}(337.1, \lambda_m)}{2}, \text{ contribuci3n del col3geno.}$$

$$E(337.1, \lambda_m) = \mu_{aElas}(337.1) \frac{\phi_{Elas}(337.1, \lambda_m)}{2}, \text{ contribuci3n de la elastina.}$$

$$NADH(337.1, \lambda_m) = \mu_{aNADH}(337.1) \frac{\phi_{NADH}(337.1, \lambda_m)}{2}, \text{ contribuci3n del NADH.}$$

$$FAD(337.1, \lambda_m) = \mu_{aFAD}(337.1) \frac{\phi_{FAD}(337.1, \lambda_m)}{2}, \text{ contribuci3n del FAD.}$$

$$C_1 = \mu_{tCol}(337.1) + \mu_{tCol}(\lambda_m), \text{ Atenuaci3n debida al col3geno presente en el tejido.}$$

$$C_2 = \mu_{tElas}(337.1) + \mu_{tElas}(\lambda_m), \text{ Atenuaci3n debida a la elastina presente en el tejido.}$$

$$C_3 = \mu_{tNADH}(337.1) + \mu_{tNADH}(\lambda_m), \text{ Atenuaci3n debida al NADH presente en el tejido.}$$

$$C_4 = \mu_{tFAD}(337.1) + \mu_{tFAD}(\lambda_m), \text{ Atenuaci3n debida al FAD presente en el tejido.}$$

Estas ecuaciones modeladas por medio de gaussianas permiten reconstruir el espectro de fluorescencia, el cual es obtenido por la suma de las contribuciones individuales de cada uno de los fluor3foros presentes en los tejidos biol3gicos, como son los del cuello uterino y mama. As3, de esta forma se puede obtener el modelo matem3tico que permite simular el espectro de fluorescencia cuando interactúa la radiaci3n electromagn3tica con los tejidos biol3gicos. La simulaci3n de los espectros de fluorescencia permite el an3lisis de los diferentes fen3menos que ocurren cuando var3an las contribuciones individuales de cada uno de los fluor3foros presentes en el medio de estudio, buscando obtener espectros caracter3sticos de normalidad y patolog3a de tejidos biol3gicos.

Además, el modelo matemático obtenido para los espectros de fluorescencia puede ser usado también, en el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia de los tejidos biológicos, como método de ajuste por mínimos cuadrados de los espectros, con la finalidad de extraer características discriminantes que permitan diferenciar entre estados patológicos y normales de estos tejidos.

REFERENCIAS

-
- ¹ Skoog, Holler y Nieman: Principios de Análisis Instrumental. McGraw-Hill (2001).
 - ² R. Richards-Kortum et al. A one layer model of laser induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue: applications to atherosclerosis. Journal biomedical optics 9 (2004) 511-522.
 - ³ N. Ramanujam .Spectroscopy Fluorescence in Vivo, Encyclopedia of Analytical Chemistry, Ed. Meyers (2000).

4. SIMULACIÓN DE CÉLULAS BIOLÓGICAS A TRAVÉS DEL MODELO CELULAR DE POTTS

Existen una gran variedad de modelos para simular fenómenos celulares biológicos, sin embargo éstos se pueden clasificar en tres grandes grupos según el manejo que se dé a las variables espacio-temporales: modelos discretos, continuos e híbridos ^[1].

Los modelos discretos en procesos biológicos, son usados cuando el interés es el comportamiento de células individuales y sus interacciones con otras células y con el medio. Se consideran las células como puntos de una red que se mueven de acuerdo a ciertas reglas. En particular, modelos basados en individuos son relativamente nuevos en biología celular, tienen aplicaciones en ecología, formación de patrones, crecimiento de tumores y angiogénesis asociada con malignidad, entre muchos otros. Entre estos modelos se encuentra el modelo celular de Potts.

Los modelos continuos, emplean ecuaciones diferenciales que describen las variaciones espacio temporales de un campo (concentraciones o campo de fuerza), y se basan en la densidad de las células y no en las células discretas. Los modelos continuos, involucran frecuentemente, el desarrollo de una ecuación de reacción - difusión. Son útiles cuando la escala de longitud sobre la cual se quiere investigar el fenómeno es mucho mayor que el diámetro de los componentes individuales. Estos modelos efectivamente describen efectos globales como diferenciación o movimiento celular en respuesta a un campo químico.

En los modelos híbridos se modelan las células como entidades discretas, pero sus movimientos están influenciados por campos espaciales continuos, así que el tejido se modela como una densidad continua. Se encuentran entonces modelos celulares de Potts híbridos, donde las células siguen estando en una red singular pero se utilizan ecuaciones diferenciales acopladas para simular fenómenos como la quimiotaxis, la difusión de químicos, entre otros.

El modelo Potts fue presentado en 1952 como una extensión del modelo de Ising, el cual ha sido usado para simular fenómenos de un tipo de partículas físicas que

modifican su comportamiento a través de la interacción con las partículas vecinas. Una aplicación clásica de este modelo es el estudio de propiedades magnéticas. En este modelo las etiquetas σ son asociadas a los elementos i de una red. Cada etiqueta puede tomar uno de dos valores $+1$ ó -1 , significando la orientación magnética de los elementos de la red. Si existen N elementos en una red, entonces el sistema puede estar en 2^N estados. Una configuración particular de un microestado es especificado por el conjunto de etiquetas de todos los elementos de la red $\{\sigma_{(i1)}, \sigma_{(i2)}, \dots, \sigma_{(iN)}\}$. La energía de un estado en particular está representada por el Hamiltoniano de Ising, ecuación 4-1:

$$H = -J \sum_{ij} \sigma(i)\sigma(j) - B \sum_{i=1}^N \sigma(i) \quad 4-1$$

Donde J es la energía de interacción entre los vecinos más próximos y B es un campo magnético externo.

El modelo original de Potts se usó para describir las propiedades termodinámicas y físicas de dominios magnéticos en los materiales. Con el transcurso de los años estos modelos se han ido aplicando a una variedad de fenómenos tanto físicos como biológicos. El primer intento por desarrollar el modelo de Potts, como un modelo celular, se dió a principios de los años 80 con Anderson, Grest y Srolovitz ^[1], quiénes usaron el modelo de Potts de q estados para estudiar los patrones celulares en granos metálicos. Se demostró la utilidad del modelo para simular el crecimiento del grano conducido por la energía de superficie.

En 1992, François Graner y James A. Glazier ^[2], modifican el modelo de Potts de q estados, con adhesividad diferencial, para simular la organización de una mezcla de dos tipos de células biológicas, figura 4-1. Graner y Glazier desarrollan una extensión en la cual se restringe el tamaño de la célula y permite diferentes energías de superficie (conocido como adhesividad diferencial o DAH) entre diferentes tipos de células.

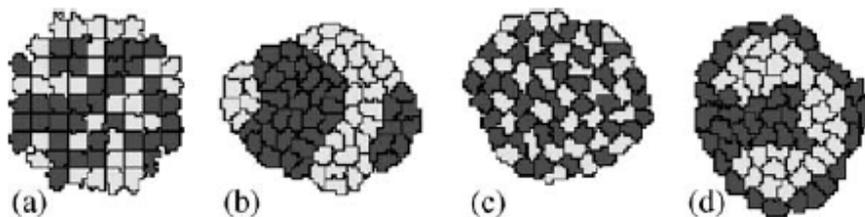


Figura 4-1. Organización celular lograda por el CPM, (a) Condición inicial, (b) Organización celular, (c) Ordenamiento de células en forma de mosaico, (d) engullimiento.

4.1 MODELO CELULAR DE POTTS PARA SIMULAR CELULAS BIOLÓGICAS

El modelo de Potts, trata las interacciones de los elementos de la red con sus vecinos, en términos de las energías de interacción entre ellos. En el caso de aplicaciones biológicas, se estudian las células desde el punto de vista de la interacción de ellas con sus vecinas y el tejido circundante cuantificando, en términos de energías de la adhesión que sufren entre ellas y el tejido. Específicamente el costo de energía de las interacciones se cuantifica en los coeficientes de acoplamiento.

El modelo celular de Potts (CPM) incorpora el comportamiento celular fenomenológicamente observado usando restricciones matemáticas y expresando estas restricciones en términos de la energía efectiva total del tejido. Desde un punto de vista matemático, podemos representar cualquier comportamiento repetitivo de una célula en forma de una respuesta consistente con una restricción. La divergencia de las respuestas demanda una “penalización de energía”. Las dinámicas escogidas, reducen la penalización. Gradualmente, relajando el patrón con uno consistente con la restricción [3]. El método tiene la gran ventaja que puede introducir mecanismos adicionales por medio de restricciones adicionales. Así se introducen fenómenos como la quimiotaxis, la polaridad celular o la mitosis.

4.1.1 ADHESIÓN

Se modelan las interacciones de las superficies de las células con las demás células definiendo unas constantes de acoplamiento $J_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}$, las cuales cuantifican la fuerza de la interacción entre puntos de la red adyacentes con diferentes valores de σ_{ij} . En el sentido físico, las J corresponden a la energía total involucrada en la interacción específica, la cual es proporcional al número de receptores en la superficie de la célula involucrada en la interacción y la energía de unión de los ligaduras involucrados con sus receptores. Por lo tanto, la energía contenida en las interacciones entre células puede ser definida por el Hamiltoniano representado en la ecuación 4-4:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}} \quad 4-2$$

Donde los términos (i,j) describen los puntos en la red: la primera sumatoria va sobre los puntos de red, la segunda sobre los ocho próximos vecinos de (i,j) . Si $\sigma_{ij} = \sigma_{i'j'}$ entonces los dos puntos de red (i,j) y (i',j') están dentro de la misma célula, y su contribución a la energía de interacción de la superficie es cero, por lo tanto, en este caso, $J\sigma_{ij},\sigma_{i'j'}=0$.

Un valor de J grande implica que las uniones requieren mayor energía y por lo tanto son menos probables.

a) **Adhesión Diferencial.** El modelo de Potts permite introducir la hipótesis de la adhesión diferencial (DAH) de Steinberg, bajo la cual la fuerza de unión entre dos células, depende de su tipo, donde la afinidad de las moléculas de adhesión celular en las membranas celulares, determinan la energía de adhesión [4].

Por lo tanto los coeficientes de acoplamiento son dependientes del tipo de célula. Se introduce en el modelo una etiqueta adicional a la célula, la cual determina su tipo: $\tau(\sigma_{ij})$, (por ejemplo: células del endotelio, endometrio...). Para cada punto de la red (i,j) tenemos entonces dos etiquetas: σ_{ij} , etiqueta que identifica la célula, y $\tau(\sigma_{ij})$, que identifica el tipo de esa célula en particular. El Hamiltoniano se modificaría entonces:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}),\tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij},\sigma_{i'j'}}\} \quad 4-3$$

El término delta Kronecker, asegura que $J\sigma_{ij},\sigma_{i'j'}=0$ para $\sigma_{ij} = \sigma_{i'j'}$; lo que significa que uniones entre células del mismo tipo tienen energía cero, o sea que la energía dentro de la célula es cero.

b) **Medio Extracelular.** El medio extracelular puede simularse como otro tipo de células, sin restricción de área. Por lo tanto, las interacciones entre células y el medio son modeladas de la misma forma que las interacciones célula-célula, usando un coeficiente de acoplamiento $J_{célula-ECM}$. La interacción entre las células y la ECM (matriz extracelular) que dan origen al movimiento haptotáctico son tratadas por separado.

4.1.2 TAMAÑO DE LA CÉLULA

Físicamente, tanto el crecimiento como la deformación mecánica de las células requieren energía. Si la simulación se hace en dos dimensiones se tiene en cuenta

los cambios de área, si es en tres dimensiones se tendrán en cuenta cambios de volumen. Modelos más aproximados incluyen restricciones para cambio del volumen, área y perímetro [5].

En general, el modelo tiene estas restricciones en cuenta incluyendo un término elástico $\lambda(v_\sigma - V_T)^2$: en este término, V_T es el volumen de relajación de la célula (el volumen al cual se relaja en la ausencia de fuerzas externas), y las deformaciones que expanden o comprimen la célula por encima o por debajo de este valor: debido a cambios en la presión osmótica, movimiento, crecimiento, división, etc., requerirán energía. Por lo tanto, el término de la energía total ahora es un Hamiltoniano que incluye las restricciones para el volumen:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}\} + \sum_{\sigma} \lambda (v_\sigma - V_T)^2 \quad 4-4$$

Donde la sumatoria es sobre σ y corre sobre el número total de células en la red.

4.1.3 FLUCTUACIONES DE FORMA

A fin de simular la organización de las células que están interactuando energéticamente de acuerdo al anterior Hamiltoniano, se usa el algoritmo Metropolis, se selecciona un sitio (i,j) al azar, luego se selecciona un próximo vecino (i',j') también al azar. Si (i,j) y (i',j') yacen en la misma célula (es decir: $\sigma_{ij} = \sigma_{i'j'}$) se tiene que repetir la selección. Sin embargo, si los dos puntos yacen en diferentes células, se calcula el cambio de la energía producto de la sustitución del sitio (i',j') con la información de (i,j) . Si el cambio resultante en la energía de superficie total ΔH es negativo, se acepta la copia y se cambian los valores para (i',j') adecuadamente, sin embargo, si el cambio en la energía es positiva, se tiene una probabilidad de que se dé el cambio, aunque sea un cambio energéticamente desfavorable. Se describen estas fluctuaciones estadísticamente usando la dinámica de Boltzmann- Monte Carlo, donde T define el tamaño de fluctuación típica [6]. Las fluctuaciones conducen a la configuración de las células a un mínimo en la energía global, en vez de conducirla a uno de los múltiples mínimos locales que pueden coexistir. Por lo tanto:

$$p(\sigma_{ij} \rightarrow \sigma_{i'j'}) = \begin{cases} 1, & \text{si } \Delta H \leq 0; \\ e^{-\Delta H / k_B T}, & \text{si } \Delta H > 0. \end{cases} \quad 4-5$$

El parámetro T , influencia la probabilidad de que tomen lugar eventos energéticamente desfavorables: a mayor T , más fuera del equilibrio está el sistema. Además, mayor será la movilidad aleatoria y mayor será el área a través de la cual las células se moverán en un espacio de tiempo. Por lo tanto el parámetro T es físicamente análogo al coeficiente de difusión D , en la ecuación de difusión. En las aplicaciones del modelo de Potts en física, T es la temperatura, k_B es una constante para convertir T en unidades de temperatura, denominada constante de Boltzmann.

El algoritmo Metrópolis es el más usado para simular el modelo de Potts y es apropiado para sistemas conservativos, como un magneto, pero no, para las células, donde la formación y la destrucción de las uniones es altamente disipativa. Así que se puede hacer el modelo más realista fijando un umbral H_0 para cambios de etiqueta mayor que cero para reflejar la disipación [5]. Así:

$$p(\sigma_{ij} \rightarrow \sigma_{i'j'}) = \begin{cases} 1, & \text{si } \Delta H < -H_0; \\ e^{-(\Delta H + H_0)/k_B T}, & \text{si } \Delta H \geq -H_0. \end{cases} \quad 4-6$$

El modelo anterior describe el fenómeno de clasificación u ordenamiento de las células (*cell-sorting*), el cual ha sido estudiado extensivamente. Se puede aplicar este modelo para simular el fenómeno de la invasión maligna, extendiéndolo para incluir la haptotaxis y la secreción proteolítica de enzimas [7,8].

Con todas las extensiones anteriores, el modelo se conoce como Modelo Celular de Potts, CPM. La energía total es representada en la ecuación 4-7:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}\} + \sum_{\sigma} \lambda (\nu_{\sigma} - V_T)^2 \quad 4-7$$

El primer término es la energía de adhesión dependiente del tipo de célula. El segundo término involucra todas las propiedades de volumen de la célula, como la elasticidad de membrana, las propiedades del citoesqueleto y la presión osmótica. Y teniendo en cuenta las restricciones de volumen y de área:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}\} + \sum_{\sigma} \lambda (\nu_{\sigma} - V_T)^2 + \sum_{\sigma} \lambda' (a_{\sigma} - A_T)^2 \quad 4-8$$

En algunos modelos λ representa la resistencia a la compresión y λ' representa la resistencia de la membrana al alargamiento [9].

El modelo celular de Potts permite simular también el crecimiento, división y muerte celular.

- **Crecimiento celular:** se puede incluir el crecimiento celular por medio de un sub-modelo que aumente el volumen de relajación, V_T , con el tiempo.
- **División Celular:** ocurre cuando la célula alcanza un tamaño fijo, dependiente del tipo de célula. Para incorporar la división celular o mitosis en el modelo, se aumenta el tamaño de la célula hasta el doble y luego se divide en dos a través de su centro de masa, a lo largo del eje de mínima longitud. Cada célula hija asume una nueva identidad σ .
- **Muerte Celular:** Se puede modelar también la muerte celular fijando el volumen de relajación igual a cero.

4.2 GENERALIDADES DEL MODELO CELULAR DE POTTS

Las células se posicionan en una red. A cada célula se le asigna una identificación única. Una célula puede ocupar más de un sitio de red.

Las simulaciones Monte Carlo del modelo de Potts han empleado, tradicionalmente, algoritmos como el de Metrópolis.

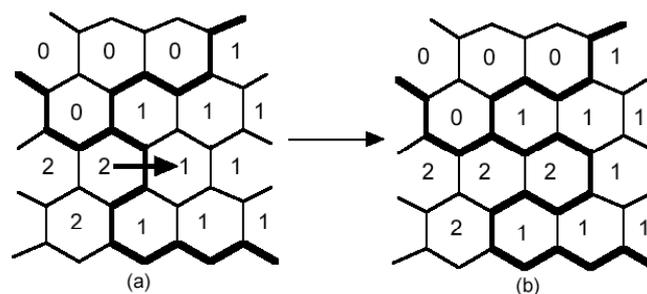


Figura 4-2. (a) Puntos escogidos para realizar el cambio en una red hexagonal; b) Nueva configuración si el cambio se acepta.

En general se puede decir que el modelo de Potts busca por medio del algoritmo de Montecarlo minimizar la energía de una configuración funcional inicial, siguiendo una serie de pasos:

1. Se escoge un sitio de red al azar, entre los q posibles, que tenga sus vecinos

con diferentes células.

2. Se escoge al azar un vecino.
3. Se resuelve el Hamiltoniano para el nuevo sitio basado en cambiar ese sitio para que sea parte de la célula original (como se muestra en la figura 2).
4. Si el cambio de energía es favorable, se hace el cambio.
5. Si no es favorable se aplica la estadística de Boltzmann.
6. Se actualiza la red difundiendo las sustancias químicas, dividiendo las células o según las consideraciones tomadas.

Se mide el tiempo en pasos Monte Carlo (MCS), que comúnmente está definido como tantos intentos de sustitución (pasos de tiempo de simulación) como tantos sitios de red ^[10].

REFERENCIAS

-
- ¹ M. S. Alber et al. On cellular automaton approaches to modeling biological cells. *Mathematical systems theory in biology, communication, and finance*, Springer-Verlag 134 (2002) 1-40.
 - ² F. Graner and J. Glazier. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical review letters* 69 (1992).
 - ³ J. A. Izaguirre et al: CompuCell, a multi-model framework for simulation of morphogenesis. *Bioinformatics* 20 (2004) 1129-1137.
 - ⁴ Y. Jiang et al: Possible cooperation of differential adhesion and chemotaxis in mound formation of dictyostelium. *Biophysical* 75 (1998) 2615–2625.
 - ⁵ R. Chaturvedi et al: On multiscale approaches to three dimensional modeling of morphogenesis. *Journal of the royal society interface* 2 (2005) 237-253.
 - ⁶ J. Glazier, A. Uphadyaya. First steps towards a comprehensive model of tissues. *Dynamical networks in physics and biology*, Springer Verlag (1998) 149-160.
 - ⁷ S. Turner, J. A. Sherrat. Intercellular Adhesion and Cancer Invasion: A Discrete Simulation Using the Extended Potts Model. *J. Theor. Biol.* 216 (2002) 85-100.
 - ⁸ S. Turner et al. From a discrete to a continuous model of biological cell movement. *Physical review* 69 (2004).
 - ⁹ M. H. Merks, J. Glazier. A cell-centered approach to developmental biology. *Roeland. Physica A* 352 (2005) 113–130.
 - ¹⁰ E. Borenstein, E. Cline. Cellular automata model of cystogenesis and tubulogenesis. *Proceedings of the Santa-Fe Institute Complex Systems Summer School* (2004).

5. METODOLOGÍA

La metodología se presenta de manera individual en cada una de las experiencias investigativas desarrolladas en esta tesis. Entre ellas están:

- Desarrollo e implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia.
- Modelamiento y simulación de los espectros de fluorescencia que reflejan la interacción de la radiación electromagnética con sistemas biológicos. Además, se presenta la simulación a través del modelo celular de Potts del crecimiento de células normales y cancerosas en un ordenamiento celular.
- Procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia de los tejidos de cuello uterino, con la finalidad de determinar los espectros característicos de tejidos normales y patológicos de cuello uterino.
- Aplicación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en el soporte al diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino y en tejidos en biopsias de mama.
- Considerando las anteriores experiencias se plantea una metodología basada en los resultados del procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y el procesamiento digital de las imágenes obtenidas por colposcopia de tejidos de cuello uterino, ofreciendo así a los profesionales de la salud una nueva herramienta como soporte al diagnóstico médico de estas patologías.
- Además, se desarrollo una metodología para el procesamiento digital de imágenes de placas de biopsia, que permite a los médicos patólogos procesar en su totalidad la muestra de biopsia de tejidos de cuello uterino y mama.

6. DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

Un esquema de los componentes básicos para el desarrollo e implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en el análisis de tejidos biológicos, se representa en la figura 6-1; este consiste de una fuente de luz, un conducto flexible que contiene la fibra óptica para la iluminación y recolección de la luz, un elemento de dispersión que separa la luz emitida entre las respectivas longitudes de onda y un detector que mide las intensidades a estas longitudes de onda; en este escenario, la emisión de fluorescencia, es medida en una reemisión geométrica en la cual la iluminación y recolección de la luz son representadas en la misma superficie del tejido biológico.

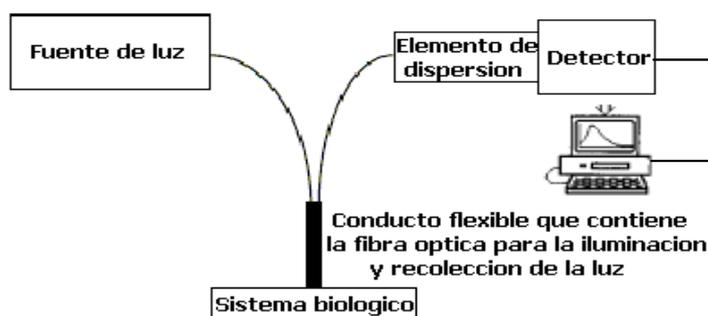


Figura 6-1 Esquema de componentes básicos de un instrumento usado para espectroscopía óptica de fluorescencia de tejidos

Después de varios estudios sobre la espectroscopía óptica de fluorescencia y de la presentación de diferentes proyectos de investigación, se contó con la colaboración de diferentes entidades que aportaron para la adquisición de los elementos y equipos que permitieron el desarrollo de una técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia portátil. Esta técnica se desarrolló, para el análisis bioquímico de tejidos biológicos en pacientes de diferentes municipios de Caldas, en la figura 6-2 se pueden visualizar la mayoría de los elementos y equipos que la componen:

Fuente de excitación, **láser de gas N₂ (pumped dye)**, la cual permitirá tener la radiación electromagnética de excitación a una longitud de onda fundamental de

337.1 nm, por medio de las cubetas de tintes para obtener las longitudes de onda de 380 nm y 460 nm. Estas longitudes de onda de acuerdo a la literatura, se han utilizado para excitar los fluoróforos presentes en los tejidos biológicos (aminoácidos, estructuras proteínicas, enzimas, coenzimas, lípidos y porfirinas), que puedan emitir luz fluorescente en diferentes longitudes de onda ^[1].

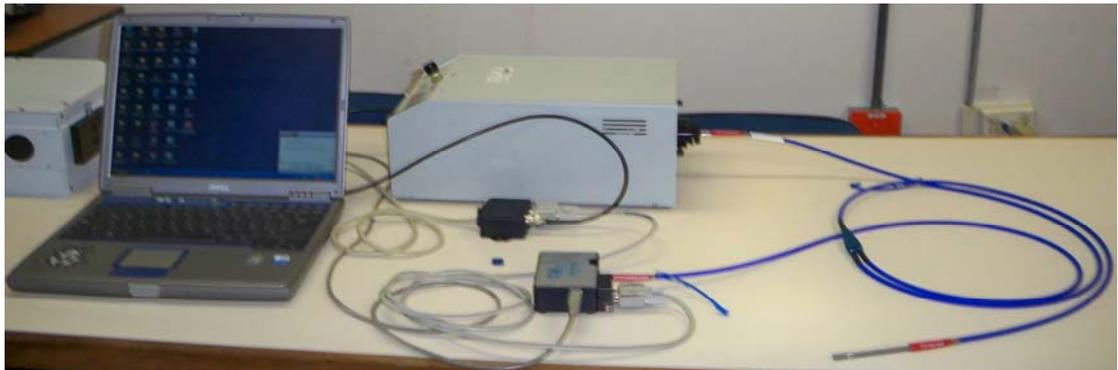


Figura 6-2 Montaje de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia

Tabla 6-1 Especificaciones del sistema laser de gas nitrógeno

Longitud de onda de salida: 337.1 nm
Ancho de banda: <0.1 nm
Ancho del pulso: 5 ns
Energía / pulso: >300 μ J a 15 Hz
Estabilidad pulso a pulso: <3%
Potencia pico: 60 Kw
Potencia máxima promedio: 15 mW a 50 Hz
Modulo de tintas: Sintonizable de 360 a 750 nm, según el tipo de tinta utilizado.

Fibra óptica, a través de ella se iluminara el tejido del cuello uterino y se recolectará la fluorescencia que escapa de la superficie del tejido, la cual es una función de las propiedades de absorción y dispersión del medio a esa longitud de onda. Una de las sondas de fibra óptica, es de diámetro 220 μ m, con área de contacto de aproximadamente 0.34 mm² y se compone de tres fibras para la iluminación y cuatro para la recolección de la luz en la superficie del tejido. Además, se tiene otra sonda de fibra óptica, de diámetro 650 μ m, con área de contacto de aproximadamente 2.98 mm² y se compone de una fibra para la iluminación y seis para la recolección de la luz en la superficie del tejido.

Espectrógrafo UV/VIS con un rango de longitud de onda de 200 – 850 nm, resolución de 1.5 nm. Este equipo se compone de una rendija de entrada que proporciona una imagen óptica rectangular, un filtro para producir bandas

estrechas de radiación, bloqueando efectos de segundo y tercer orden, un lente colimador que produce un haz paralelo de radiación, una rejilla que dispersa la radiación entre sus longitudes de onda individuales, un elemento que focaliza la banda de radiación de primer orden, en el plano del detector y un detector CCD que mide las intensidades a estas longitudes de onda. El espectrógrafo trae incluida la tarjeta de adquisición de datos y trabaja con los sistemas operativos Windows 98/Me/2000/XP.

Tabla 6-2 Especificaciones del espectrómetro USB2000

Dimensiones: 89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm
Rango Detector: 200-1100 nm
Detector: 2048 píxeles, tamaño píxel 14 μm x 200 μm , Sony ILX511 arreglo CCD lineal
Rejilla: 14
Apertura de entrada (slit): 25 mm
Filtros: filtros instalados pasabandas y pasalargos
Longitud focal: f/4, 42 mm (entrada); 68 mm (salida)
Resolución óptica: ~0.3-10.0 nm
Sensibilidad (estimada): 400 nm – 90 fotones/cuentas
Conector fibra óptica: SMA 905 para fibra óptica (0.22 NA)
Velocidad de transferencia de datos: 13 milisegundos
Tiempo de integración: 3 milisegundos a 65 segundos
Sistema operativo Windows 98/Me/2000/XP cuando se usa interfase USB

Control, se desarrolló un modulo para controlar y sincronizar los tiempos de integración del espectrógrafo y el número de pulsos del láser, que permite adquirir y almacenar la información espectral de fluorescencia de los diferentes tejidos biológicos analizados. El algoritmo computacional, para el modulo de control, fue desarrollado en C++, el cual permite realizar 30 disparos de duración de 1 milisegundo y con un tiempo de espera de 45 milisegundos. En cada señal de disparo, a través del puerto paralelo de un computador portátil, se activan al mismo tiempo el sistema láser de gas nitrógeno y el espectrógrafo USB2000, este último se toma alrededor de 13 milisegundos para enviar a través de un puerto USB la información al software de adquisición de datos, con un tiempo de integración de 3 milisegundos para la recolección de la información espectral, en un rango de longitudes de onda de 179.54 a 875.85 nanómetros, con un paso de 0.29 nanómetros. Con este sistema se obtienen 30 espectros de la información de fluorescencia de cada punto de análisis de los tejidos de cuello uterino.

¹ N. Ramanujam .Spectroscopy fluorescence in vivo, Encyclopedia of analytical chemistry. Ed. Meyers (2000).

7. SIMULACIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA Y DE CÉLULAS BIOLÓGICAS

Para tener un modelo matemático de la interacción de la radiación electromagnética con material biológico, se debe considerar tanto los modelos para la radiación electromagnética como para los tejidos y las células con las que ésta va a interactuar. Considerando que la técnica empleada para el diagnóstico de precánceres, en este trabajo, contiene elementos ópticos y con el fin de lograr una buena aproximación desde el punto de vista teórico, tanto para la técnica, como la simulación, se usa el desarrollo de un método analítico para el modelo basado, en la ley de Beer – Lambert, del cual se obtuvo características de los espectros de fluorescencia en vivo, esto permitió construir la simulación de los espectros de la información de fluorescencia, desde la simulación celular basada en el modelo Potts para estudiar los estados de normalidad y patología de los tejidos de cuello uterino.

7.1 MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

En el estudio del espectro de fluorescencia de un conjunto de fluoróforos presentes en un tejido biológico, deben ser considerados la totalidad de los fotones emitidos, cualquiera que sea su energía. El análisis que se presenta en esta experiencia de investigación, se centra en el estudio de la distribución de energía de los fotones emitidos, por lo tanto, es conveniente expresar la intensidad de fluorescencia, por cada fotón que absorbe el medio como una función de la longitud de onda de los fotones emitidos, determinada por $F_{\lambda}(\lambda_F)$ y satisface la ecuación 7-1,

$$\int_0^{\infty} F_{\lambda}(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F \quad 7-1$$

Donde Φ_F es el rendimiento cuántico de fluorescencia, $F_\lambda(\lambda_F)$, representa el espectro de fluorescencia o espectro de emisión, el cual refleja la distribución de probabilidad de las diferentes transiciones de niveles vibracionales más bajos de S_1 a los diferentes niveles vibracionales de S_0 . El espectro de emisión es característico de cada uno de los fluoróforos presentes en el tejido biológico.

En la práctica, la intensidad de fluorescencia $I_F(\lambda_F)$ medida a una longitud de onda de emisión λ_F es proporcional a $F_\lambda(\lambda_F)$ y al número de fotones que son absorbidos a la longitud de onda de excitación λ_E . Es conveniente reemplazar este número de fotones que son absorbidos por la intensidad de absorción $I_A(\lambda_E)$, que se define como la diferencia entre la intensidad de la luz incidente $I_0(\lambda_E)$ y la intensidad de luz transmitida $I_T(\lambda_E)$, es decir,

$$I_A(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) - I_T(\lambda_E) \quad 7-2$$

La intensidad de fluorescencia puede así ser escrita como,

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F_\lambda(\lambda_F) I_A(\lambda_E) \quad 7-3$$

El factor de proporcionalidad k , depende de varios parámetros en particular de la configuración óptica de observación y del ancho de banda del monocromador.

Además, la intensidad de la luz transmitida puede ser expresada usando la ley de Beer – Lambert como,

$$I_T(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) \exp[-2.3\varepsilon(\lambda_E)lc] \quad 7-4$$

Donde $\varepsilon(\lambda_E)$ es el coeficiente de absorción molar de los fluoróforos a la longitud de onda λ_E ($L/mol.cm$), l es la longitud de la cubeta (cm) y c la concentración (mol/L). La cantidad $\varepsilon(\lambda_E)lc$ representa la absorbancia $A(\lambda_E)$ a la longitud de onda λ_E . Esto quiere decir que $I_F(\lambda_E, \lambda_F)$ puede expresarse como,

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F_\lambda(\lambda_F) I_0(\lambda_E) (1 - \exp[-2.3\varepsilon(\lambda_E)lc]) \quad 7-5$$

En la práctica, la medida de las variaciones en I_F como una función de λ_F , para una longitud de onda de excitación fija, refleja las variaciones en $F_\lambda(\lambda_F)$ y así proporciona el espectro de fluorescencia. Debido a que el factor de proporcionalidad k es generalmente desconocido, el valor numérico de la intensidad I_F no tiene ningún significado, en términos generales, I_F se expresa en unidades arbitrarias. En el caso de bajas concentraciones la siguiente expansión puede usarse, $1 - \exp[2.3\epsilon lc] = 2.3\epsilon lc - (2.3\epsilon lc)^2 + \dots$

En soluciones altamente diluidas, los términos de orden superior son insignificantes, por lo tanto solamente se tiene en cuenta el primer término de la expansión, entonces,

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = kF_\lambda(\lambda_F)I_0(\lambda_E)(2.3\epsilon(\lambda_E)lc) \quad 7-6$$

Es decir,

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = 2.3kF_\lambda(\lambda_F)I_0(\lambda_E)A(\lambda_E) \quad 7-7$$

Esta relación permite observar que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración, a una baja absorbancia, por lo tanto, la variación lineal se pierde con el aumento de la absorbancia. Es decir, cuando la concentración de los fluoróforos es alta, provocan efectos de filtro interior en la muestra reduciendo la intensidad de fluorescencia, lo que puede depender de las condiciones de observación. En particular, los fotones emitidos a longitudes de onda correspondientes que coinciden en los espectros de absorción y emisión pueden ser reabsorbidos (transferencia radiativa). Consecuentemente, cuando la espectroscopía óptica de fluorescencia es usada para evaluar cuantitativamente la concentración de fluoróforos, se debe tener en cuenta que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración solo para soluciones diluidas ^[1].

Este análisis de la intensidad de fluorescencia se presenta con el objetivo de de comparar con la ecuación 3-3, capítulo 3. La intensidad de fluorescencia representada de esta manera permite desarrollar la simulación del espectro de fluorescencia por medio de un modelo matemático basado en bandas gaussianas. El espectro de fluorescencia obtenido de la simulación, permite visualizar y estudiar las contribuciones de cada uno de los fluoróforos presentes en los tejidos biológicos.

7.1.1 ESTRUCTURA DEL PROGRAMA

En la figura 7-1 se muestran los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de cada uno de los fluoróforos presentes en los tejidos de cuello uterino (colágeno, elastina, NADH y flavinas) [2]. Al realizar un ajuste gaussiano a cada uno de los espectros de absorción y emisión de los fluoróforos se obtuvieron características como el ancho medio a la altura media (FWHM), intensidades de los picos y la longitud de onda central, estas características se presentan en la tabla 7-1.

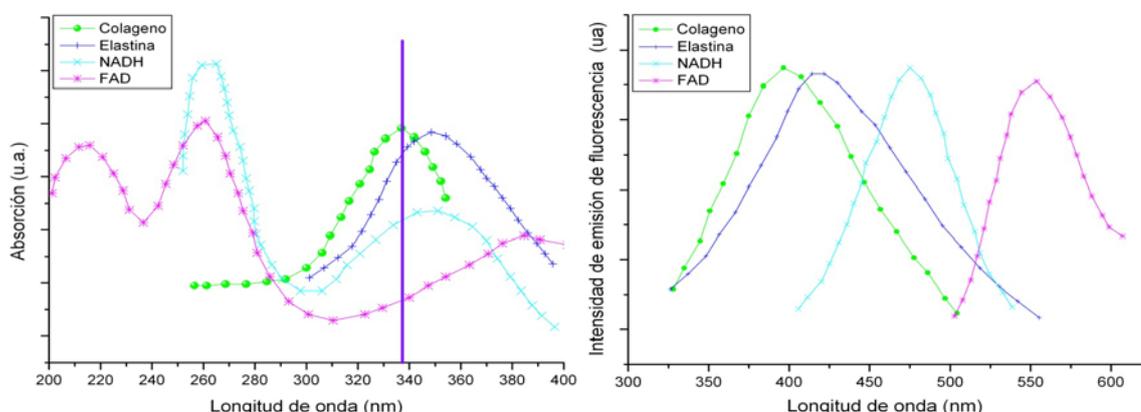


Figura 7-1 espectros de absorción y emisión de los fluoróforos (colágeno, elastina, NADH y FAD).

Tabla 7-1 . Características de los picos de absorción y emisión de cada uno de los fluoróforos presentes en el tejido de cuello uterino obtenidas por ajuste gaussiano.

fluoróforos	Absorción			Emisión		
	Longitud de onda (λ_{kx}) (nm)	Intensidad (a_{kx}) (u.a.)	FWHM (w_{kx}) (nm)	Longitud de onda (λ_{km}) (nm)	Intensidad (a_{km}) (u.a.)	FWHM (w_{km}) (nm)
Colágeno	336.35	1	34.85	393.85	1	60.69
Elastina	352.03	1	46.40	405.48	1	73.08
NADH (pico 1)	262.61	1	25.8	474.58	1	55.42
NADH (pico 2)	345.51	0.45	54.41			
Flavinas (pico 1)	260.17	1	28.77	557.44	1	65.51
Flavinas (pico 2)	387.2	0.45	112.29			
Flavinas (pico 3)	457.57	0.5	100.58			

Con base en los datos de la tabla 1 se obtienen los factores de contribución de cada uno de los fluoróforos a la longitud de onda de excitación ($\lambda_x = 337.1$ nm) (CF_{kx}), empleando la ecuación 7-8 y los factores de contribución de cada uno de

los fluoróforos a la longitud de onda de emisión ($\lambda_m = 457.8 \text{ nm}$) (CF_{km}) empleando la ecuación 7-9.

$$CF_{kx} = a_{kx} * e^{-2\left(\frac{\lambda_x - \lambda_{kx}}{w_{kx}}\right)^2} \quad 7-8$$

$$CF_{km} = a_{km} * e^{-2\left(\frac{\lambda_x - \lambda_{km}}{w_{km}}\right)^2} \quad 7-9$$

k depende de cada uno de los fluoróforos ($k=1$ -colageno, $k=2$ -elastina, $k=3$ -NADH y $k=4$ -flavinas). A partir de estos factores se halla la absorción debida a la longitud de onda de excitación (A_x), ecuación 7-10 y a la longitud de onda emisión (A_m), ecuación 7-11.

$$A_x = \sum_{k=1}^4 (\mu_{ak} * c_k * CF_{kx}) \quad 7-10$$

$$A_m = \sum_{k=1}^4 (\mu_{ak} * c_k * CF_{km}) \quad 7-11$$

c_k representa las contribuciones de cada uno de los fluoróforos, que son variables desconocidas dentro del modelo y que deben calcularse para aportar en el estudio de la normalidad y la patología de los tejidos de cuello uterino. Posteriormente se calcula la transmisión debido a la longitud de onda de excitación (T_x), ecuación 7-12 y debido a la longitud de onda de emisión (T_m), ecuación 7-13.

$$T_x = 10^{-A_x} \quad 7-12$$

$$T_m = 10^{-A_m} \quad 7-13$$

A continuación se calcula la absorbancia y la transmisión totales en un rango de longitudes de onda de $200 \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$, con un paso de aproximadamente 0.3 nm , que concuerda con la resolución del espectrógrafo empleado en las medidas en vivo. Con este fin se calculan los factores de contribución como una función de la longitud de onda $CF_{k\lambda}$, ecuación 7-14.

$$CF_{k\lambda} = a_{kx} * e^{-2\left(\frac{\lambda-\lambda_{kx}}{w_{kx}}\right)^2} \quad 7-14$$

Empleando estos nuevos factores, se calculan la absorbancia, ecuación 7-15 y la transmitancia total, ecuación 7-16.

$$A = \sum_{k=1}^4 (\mu_{ak} * c_k * CF_{k\lambda}) \quad 7-15$$

$$T = 10^{-A} \quad 7-16$$

A partir de estas contribuciones se calcula la intensidad de emisión de fluorescencia (I_m) debida a cada uno de los fluoróforos presentes en los tejidos de cuello uterino, utilizando la ecuación 7-17:

$$I_m = \sum_{k=1}^4 \left(T_x * T * a_k * e^{-2\left(\frac{\lambda-\lambda_k}{w_k}\right)^2} * c_k * CF_{kx} \right) - I_{rr} \quad 7-17$$

Siendo a_k , λ_k , w_k las intensidad, la longitud de onda central y el FWHM de los picos de emisión de cada uno de los espectros de cada uno de los fluoróforos, presentes en la información espectral de fluorescencia obtenida de los tejidos de cuello uterino en vivo. I_{rr} es una banda de dispersión Raman del agua y es otra variable de ajuste dentro del sistema

$$I_{rr} = T_x * T * a_{rr} * e^{-2\left(\frac{\lambda-\lambda_{rr}}{w_{rr}}\right)^2} * c_{rr} \quad 7-18$$

a_{rr} , λ_{rr} , w_{rr} y c_{rr} las intensidad, la longitud de onda central, el FWHM y la contribución de la banda de dispersión.

En la experimentación en vivo para obtener las variables a_k , λ_k , w_k y c_k (k=1,2,3,4) y a_{rr} , λ_{rr} , w_{rr} y c_{rr} , se emplea el método de mínimos cuadrados para ajustar cada uno de los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos de cada punto de análisis de los tejidos de cuello uterino en vivo.

7.1.2 GENERALIDADES

Basados en las anteriores consideraciones se desarrolló la simulación de los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente de los cuatro fluoróforos que interactúan en solución diluida. Se puede sugerir que los componentes de esta solución son los fluoróforos presentes en los tejidos biológicos que son estudio de esta tesis, como son el colágeno + elastina, el NADH y la FAD. La simulación incluye un pico de dispersión relacionado con las dispersiones de Rayleigh y Raman, este pico está relacionado con el disolvente (agua), el cual sólo existe una banda Raman observable. El pico de la dispersión Rayleigh se fija en amplitud, pero la banda Raman varía inversamente en altura con la 4ª potencia de la longitud de onda excitación y emisión utilizadas para la simulación [3]. La simulación también incluye la auto-absorción (filtro-interior), para el efecto de haz de excitación y la emisión de fluorescencia. Además de la visualización de la intensidad, también se puede realizar una lectura de la absorbancia, obtenida a la longitud de onda de excitación, para comparar la medición de fluorescencia con la absorción, y como un indicador de la presencia de auto-absorción.

7.2 SIMULACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE CELULAS BIOLÓGICAS

En este aparte se presentan diferentes condiciones necesarias para simular el ordenamiento celular a través del modelo celular de Potts (CPM). También se presenta, cómo evolucionan las células patológicas, al favorecer estas a partir de una energía de interacción adecuada, hasta el punto de ser las células de mayor presencia en la simulación.

En agregados de 2 tipos de células biológicas disociadas se pueden exhibir organización normal, organización parcial, engullimiento o mezcla. Se ha demostrado que un modelo simple que incluya solo adhesión diferencial y fluctuaciones de membrana, puede reproducir estos comportamientos [4]. La organización celular no involucra división celular ni diferenciación, solo reorganización espacial de las posiciones celulares [5].

La adhesividad diferencial celular puede dirigir el movimiento de las células [6]. Las células se unen unas a otras por medio de las moléculas de adhesión distribuidas en sus membranas y tienen una energía libre asociada con los contactos célula-célula, los cuales se pueden crear o destruir reversiblemente durante la

organización celular. La energía libre de adhesión, $F(A)-F(0)$, es el trabajo mecánico integrado entre el estado adherido, con área de contacto, A , y el estado separado. La energía libre de superficie, J , entre dos superficies está definida como la energía libre de adhesión por unidad de área de contacto: $\partial F/\partial A$, este es equivalente al trabajo reversible requerido para incrementar la superficie en una unidad de área. Una energía libre de superficie también puede definirse con un medio externo, como la matriz extracelular o el medio de cultivo. A partir de las energías libres de superficie, se pueden definir las tensiones superficiales, γ :

$$\gamma_{ld} = J_{ld} - \frac{J_{dd} + J_{ll}}{2},$$

$$\gamma_{lM} = J_{lM} - \frac{J_{ll}}{2},$$

$$\gamma_{dM} = J_{dM} - \frac{J_{dd}}{2}.$$

7-19

Donde las J , representan los coeficientes de acoplamiento entre dos células:

$J_{ld}=J_{dl}$: célula blanca (*light*) o menos cohesiva y una célula negra (*dark*) más cohesiva;

J_{dd} : negra-negra ;

J_{ll} : blanca-blanca;

$J_{dM}=J_{Md}$: negra-medio (ECM);

$J_{lM}=J_{Ml}$: blanca-medio;

$J_{MM}=J_{MM}$: medio-medio.

Las tensiones de superficie representan la diferencia en energía entre interfaces heterotípicas y homotípicas por unidad de área de membrana. Durante la organización celular, las células no se mueven directamente hacia el mínimo en gradientes de energía, para alcanzar la minimización de la energía global, las células y los grupos de células deben moverse a través de estados transitorios que tienen una configuración de energía mayor que la del estado previo. Las células tienen que atravesar mínimos locales en la energía para poder alcanzar un mínimo global [5].

Las energías de superficie determinan la irregularidad local de la energía interna y las dinámicas, las tensiones de superficie describen las configuraciones con energía mínima absoluta, es decir los estados de equilibrio estables [5]. La figura 7-1 muestra ejemplos esquemáticos de cada caso típico.

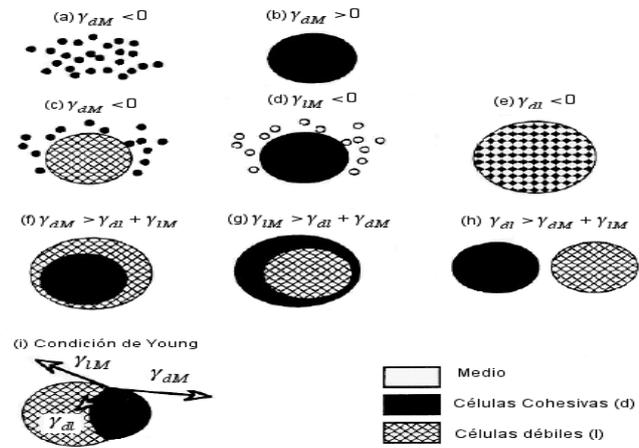


Figura 7-2 Las tensiones superficiales determinan la configuración de equilibrio con mínima energía global (a) Las células de un solo tipo se disocian, (b) las células se agregan, (c) y (d) Las células de dos tipos no se agregan, (e) configuración de tablero de ajedrez, (f) y (g) “cell sorting” típico (h) otro tipo de organización, (i) condición de Young.

Para un solo tipo de células en contacto con un medio, dos casos pueden ocurrir: dispersión o cohesión, (a) y (b). Cuando γ_{dM} y γ_{IM} son negativas, las células no se agregan, (c) y (d). Cuando γ_{dl} es negativa, las células negras y blancas se mezclan formando un patrón similar a un tablero de ajedrez, (e). En la mayoría de los casos las tensiones superficiales son positivas. El mínimo de energía ocurre cuando las células se organizan formando dos dominios homotípicos, (f)-(i). Los dos dominios están en contacto entre ellos y con el medio. En el caso de la Condición de Young, (i), las tres interfaces se encuentran a lo largo de una línea de triple contacto. Un punto en esta línea está sometido a fuerzas (debido a las tensiones superficiales) mostradas en la figura 7-2 ^[7], cuya suma se anula.

Si una de las tensiones superficiales es mayor a las suma de las otras dos, no se puede establecer una triple intersección y la interfaz de mayor costo energético desaparece, (f)-(h). Si $\gamma_{dM} > \gamma_{dl} + \gamma_{IM}$, la interfaz de las células negras y el medio desaparece, las células blancas rodean un solo dominio de células negras, un caso típico de organización celular (cell sorting) ^[8,5]. Para una organización celular (cell sorting) típica las tensiones superficiales deben cumplir la relación $\gamma_{dM} > \gamma_{dl} + \gamma_{IM}$, por lo tanto, las energías de superficie (según la ecuación 7-9) deben cumplir ^[5]:

$$0 < J_{dd} < \frac{J_{dd} + J_{ll}}{2} < J_{dl} < J_{ll} < J_{IM} = J_{dM}$$

7-20

Para el caso de las células normales que se vuelven tumorales, los valores de las energías de interacción, J , se alteran, y puede ocurrir que las interacción entre las célula y el medio sean más favorables energéticamente que las interacciones célula-célula, es decir $J_{dd} > J_{dM}$ o $J_{ll} > J_{IM}$, lo que lleva a que las células se separen de las otras células y penetren en el medio generando metástasis.

Las células se mueven con la ayuda de las deformaciones de membrana, las cuales les permiten escapar de los mínimos locales ^[5]. La temperatura T , corresponde a la amplitud de las fluctuaciones de membrana, por lo tanto es una temperatura de fluctuación efectiva y no tiene nada que ver con la temperatura del tejido ^[5]. Las oscilaciones de membrana tienen una amplitud aproximada del 10% del diámetro celular, lo que corresponden en las simulaciones a un sitio de red ^[7].

Se ha estudiado el efecto de inhibir las fluctuaciones de membrana en la organización celular por medio de experimentos y simulaciones ^[9]. En los experimentos se logra inhibir las deformaciones de membrana por medio de la droga Cytochalasin B, y en las simulaciones se logra esto fijando una temperatura, T , baja. Los estudios han demostrado que no se logra una organización celular completa en ausencia de fluctuaciones.

7.2.1 MODELO MATEMÁTICO

Basados en las consideraciones anteriores se define la energía total de la configuración celular como la suma de las energías de adhesión, las restricciones de volumen y las restricciones de superficie:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}\} + \sum_{\sigma} \lambda (v_{\sigma} - V_T)^2 + \sum_{\sigma} \lambda' (a_{\sigma} - A_T)^2$$

7-21

También es posible usar solo un término de restricción para el cambio de tamaño de la célula ^[5,3], entonces la ecuación 7-10 quedaría como:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} \{1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}\} + \sum_{\sigma} \lambda (v_{\sigma} - V_T)^2$$

7-22

A partir de este modelo celular de Potts se desarrolla el programa CPM.exe, basado en la hipótesis de Adhesión Diferencial de Steinberg (DAH), para simular la organización celular, en el cual no se tiene en cuenta otras propiedades de conjunto como la quimiotaxis, la haptotaxis, diferenciación celular o la proliferación.

7.2.2 PROGRAMA

Los algoritmos del programa se desarrollaron en lenguaje C++ en base a las siguientes referencias: [10,11,12,13]. En el desarrollo de los algoritmos para el programa CPM se definen algunos parámetros [9], haciendo la analogía entre los términos del modelo de Potts y programación orientada a objetos (OO):

- Tipo de célula (τ): se considera la clase en OO. Las células del mismo tipo tienen las mismas propiedades por ejemplo el mismo valor para los parámetros. Esta clase puede tener valores diferentes para cada instancia, pero el conjunto de propiedades en general son las mismas.
- Red: cuadrícula de $n \times n$ (dos dimensiones) o $n * n * n$ (tres dimensiones) usada como marco físico del modelo.
- Sitio de Red: punto en la red, también se refiere como un pixel o un voxel (volume pixel).
- Spin (σ) o célula: en OO se refiere a la instancia u objeto de la clase. Puede estar ocupando uno o más puntos de red.

7.2.3 ESTRUCTURA DEL PROGRAMA

Inicializar red()

Do for n pasos Monte Carlo:

while (un sitio no tenga vecinos extraños):

 sitio=EscogerSitioDeRedAleatorio()

 vecino=EscogerVecinoAleatorio(sitio)

ΔE =CalcularEnergiaParaElCambio(vecino, tipo(sitio))

 if $\Delta E < 0$

 cambiar(sitio, vecino)

 else if aleatorio() $< \exp(-\Delta E/T)$: // Paso de Metropolis

 cambiar(sitio, vecino)

7.2.4 GENERALIDADES

Se tiene una red cúbica de $100*100*100$, con tres tipos de células, $\tau=\{1,2,3\}$, el número de células es variable.

Las células tipo 1 corresponden a la ECM o medio, M en notaciones anteriores (color). Las células tipo 2 corresponden a las células negras o dark (d) y las tipo 3 son las células blancas o light (l) (en la visualización de CPM.exe estas células se grafican de color verde).

Los pasos Monte Carlo se definen como un múltiplo entero, de la totalidad de los sitios de red, por lo tanto el tiempo de simulación medido en el número de iteraciones del programa está dado por: $100*100*100*MCS$.

La red de la simulación es inicialmente una red de matriz extracelular, luego se pasan a crear las células tipo 2 y 3, en posiciones aleatorias restringidas por los valores que introduzca el usuario.

Debido a que se está tratando con una red cúbica, la energía de superficie por unidad de longitud de frontera depende fuertemente de la orientación. La relación entre la mayor energía de superficie y la menor como función de la orientación, miden la anisotropía, por lo tanto, al aumentar el rango de interacción entre vecinos se puede reducir esta relación entre energías ^[5,14]. Para reducir la anisotropía investigadores como Upadhyaya, tienen en cuenta la interacción con los terceros próximos vecinos ^[5]; Knewitz reporta interacción con cuartos próximos vecinos ^[7] y Mombach reporta simulaciones donde se consideran interacciones con los octavos próximos vecinos, es decir los 116 sitios adyacentes a un sitio dado en una red cúbica ^[15]. Por lo tanto, en CPM el rango de interacción puede ser escogido desde los primeros vecinos cercanos hasta los octavos vecinos cercanos.

7.3 VISUALIZACIÓN

La visualización de los resultados de la simulación se realiza por medio del programa CPM.m, en MATLAB, el cual permite recolectar la información obtenida en la simulación del ordenamiento celular que comprende la ubicación espacial en

tres dimensiones, volumen y área. Luego de la simulación es posible visualizar el estado inicial, el estado final y varios estados intermedios de la red. Además, se simula el espectro de fluorescencia de la interacción de la radiación electromagnética a una longitud de onda de 337.1 nm con las células simuladas a través del modelo celular de Potts. En la simulación de los espectros de fluorescencia se tiene en cuenta que:

- Los fluoróforos NADH y FAD que se relacionan con el metabolismo celular se ubicaron en la parte interior de las células simuladas por el modelo de Potts.
- Los fluoróforos colágeno y la elastina que hacen parte de la estructura celular se ubicaron en la parte exterior de las células simuladas por el modelo de Potts. Además, se sumaron en una sola figura, por lo tanto solo se representara con un solo pico en el espectro.

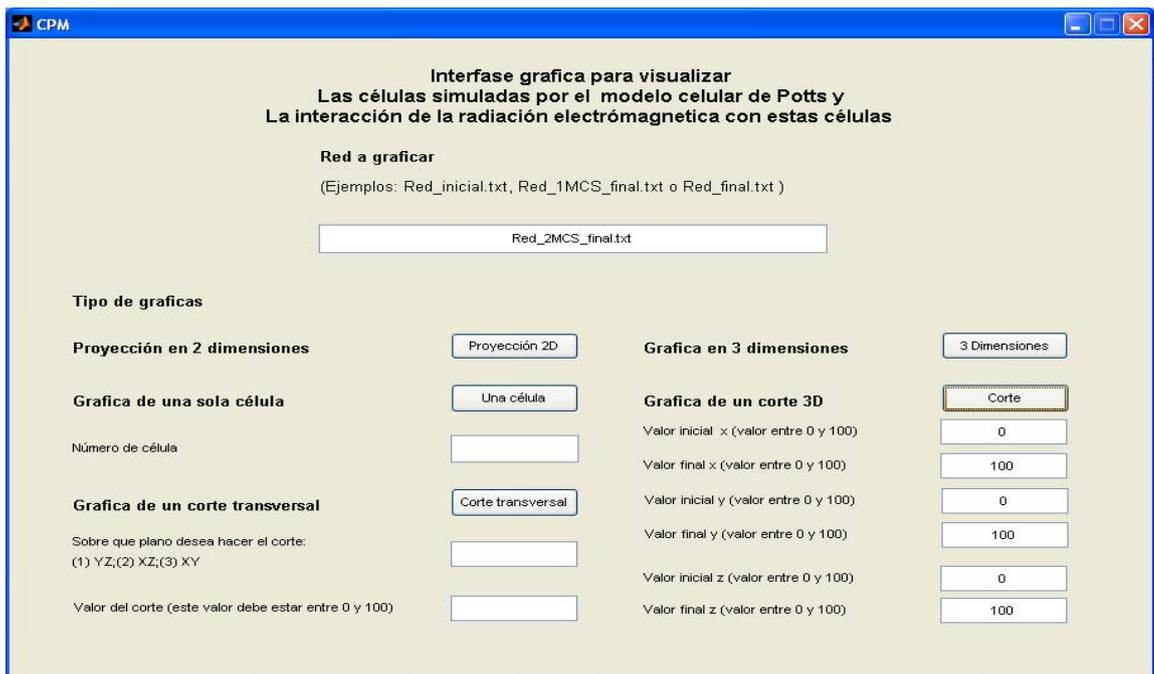


Figura 7-3 Interfaz grafica CPM

7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Usando los datos de la tabla 7-2 se logra una organización celular típica luego de 20 MCS: una capa de células verdes, menos cohesivas (se relacionan con las

células normales), rodea un solo dominio de células negras, más cohesivas (se relacionan con las células patológicas). En la figura 7-4 se presenta la evolución del agregado de células en tres dimensiones, sin embargo, es en la proyección de ésta gráfica en dos dimensiones (figura 7-5), donde se puede ver el patrón de organización celular y se puede observar la evolución de estados de normalidad, a estados de patología, en los espectros de fluorescencia a medida que se logra la organización celular, con la premisa que el agregado busca disminuir las fronteras negra-medio y negra-verde, debido a que son más costosas energéticamente que las fronteras negra-negra, por lo tanto, las células negras tienen mayor presencia y se van uniendo en un solo dominio, rodeadas por una capa de células verdes separadas del medio: las fronteras negra-verde son más favorables que las negra-medio.

Tabla 7-2 Datos para la simulación 1 de organización celular

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
MCS	40	$\beta=1/T$	32
Volumen inicial células tipo 2	91	Número células tipo 2	20
Volumen inicial células tipo 3	91	Número células tipo 3	20
Volumen target células tipo 1	0	Área target células tipo 1	0
Volumen target células tipo 2	580	Área target células tipo 2	200
Volumen target células tipo 3	100	Área target células tipo 3	170
$J(1,1)$	16	Rango de Interacción	3
$J(2,2)$	2	Región inicialización de la Red	0.333
$J(1,2)=J(2,1)=J(1,3)=J(3,1)$	8	$\lambda = \lambda'$ para tipo 1	0
$J(2,3)=J(3,2)$	5	λ para tipo 2 y 3	1
$J(3,3)$	7	λ' para tipo 2 y 3	1

La evolución de los estados de normalidad a estados de patología que se representan en los espectros de fluorescencia se debe a que las células negras (patológicas en esta simulación) presentan mayor cohesión, por lo tanto en áreas muy pequeñas se pueden encontrar un gran número de elementos de red, lo que permite a la simulación del espectro de fluorescencia, encontrar mayor información o moléculas que pueden ser excitadas a la longitud de onda 337.1 nm y emitir luz fluorescente a una determina longitud de onda que depende del tipo de moléculas.

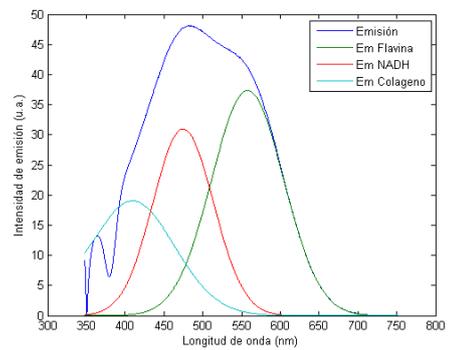
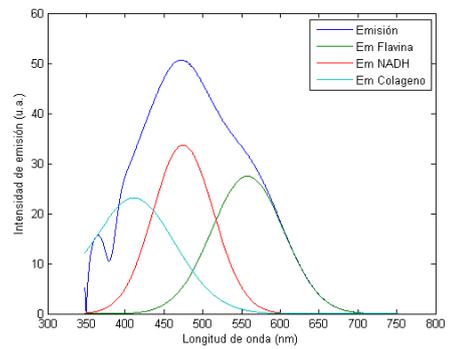
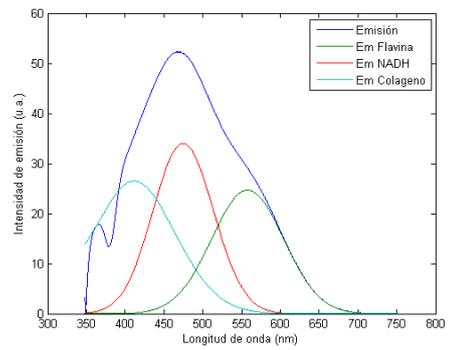
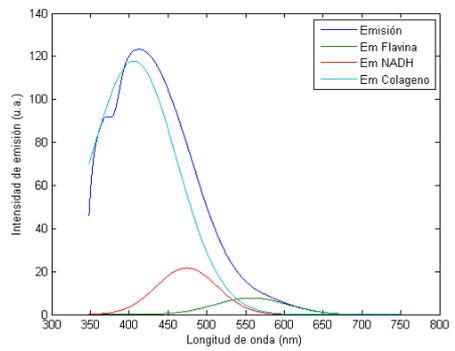
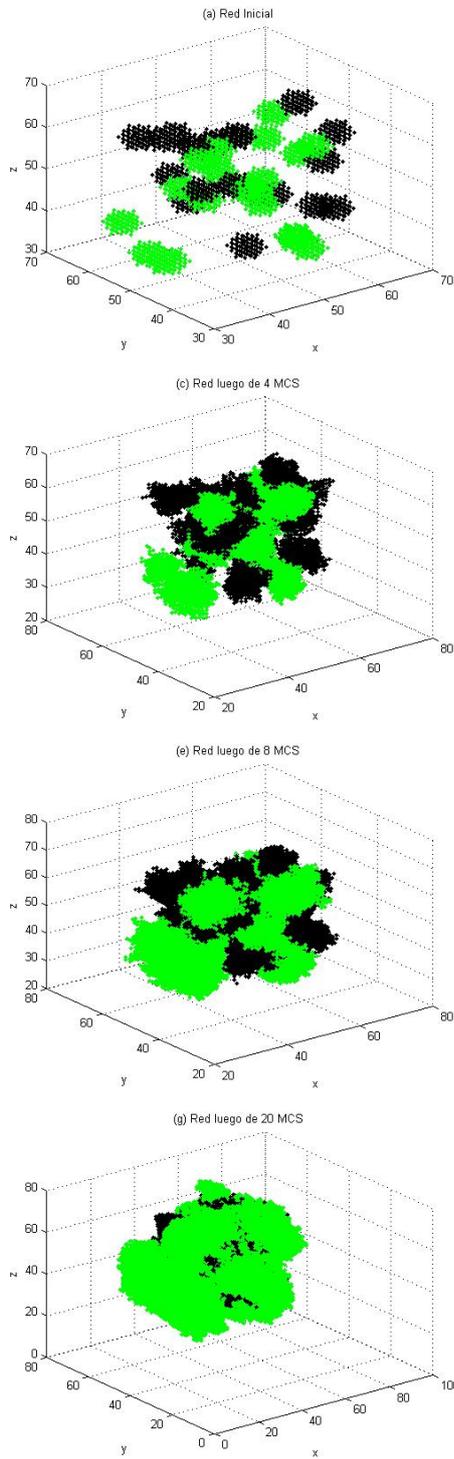


Figura 7-4 Organización celular en 3D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) Red en 4MCS, (c) 8 MCS, (d) 20 MCS

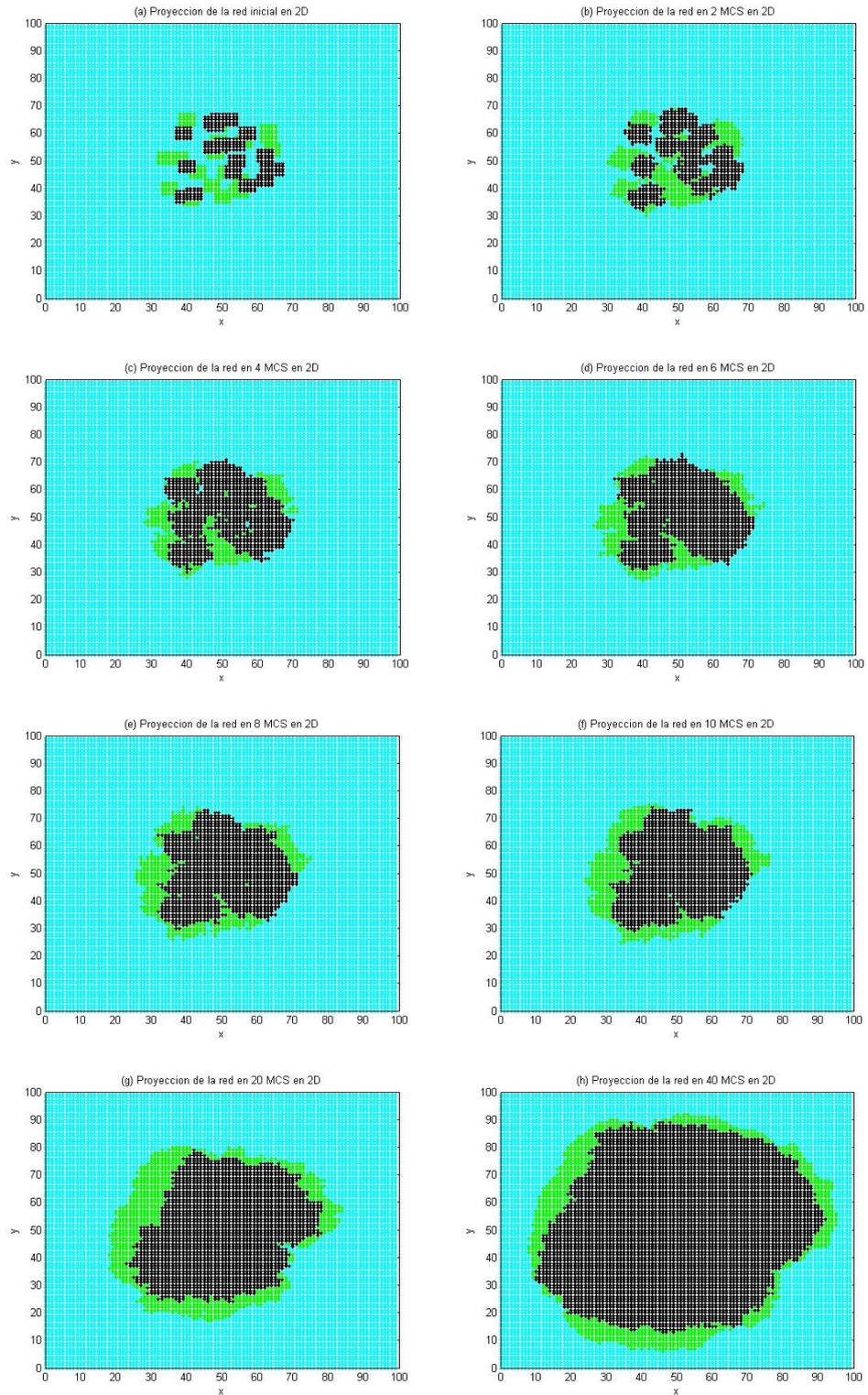


Figura 7-5 Organización celular en 2D. (a) Red Inicial, (b) Red en 2MCS, (c) 4 MCS, (d) 6 MCS, (e) 8 MCS, (f) 10 MCS, (g) 20 MCS, (h) 40 MCS, Red Final

Sin embargo, en esta simulación las células crecen de forma descontrolada, alcanzando volúmenes muy grandes, como se muestra en la figura 7-6. El crecimiento descontrolado de las células a pesar de las restricciones de superficie y volumen del modelo se puede dar debido a que las células tienen un volumen inicial muy alejado del volumen target, especialmente las células tipo 2, y de acuerdo a la ecuación 7-21 contribuyen con grandes fluctuaciones en las relaciones de energía y así se tendría un sistema muy inestable.

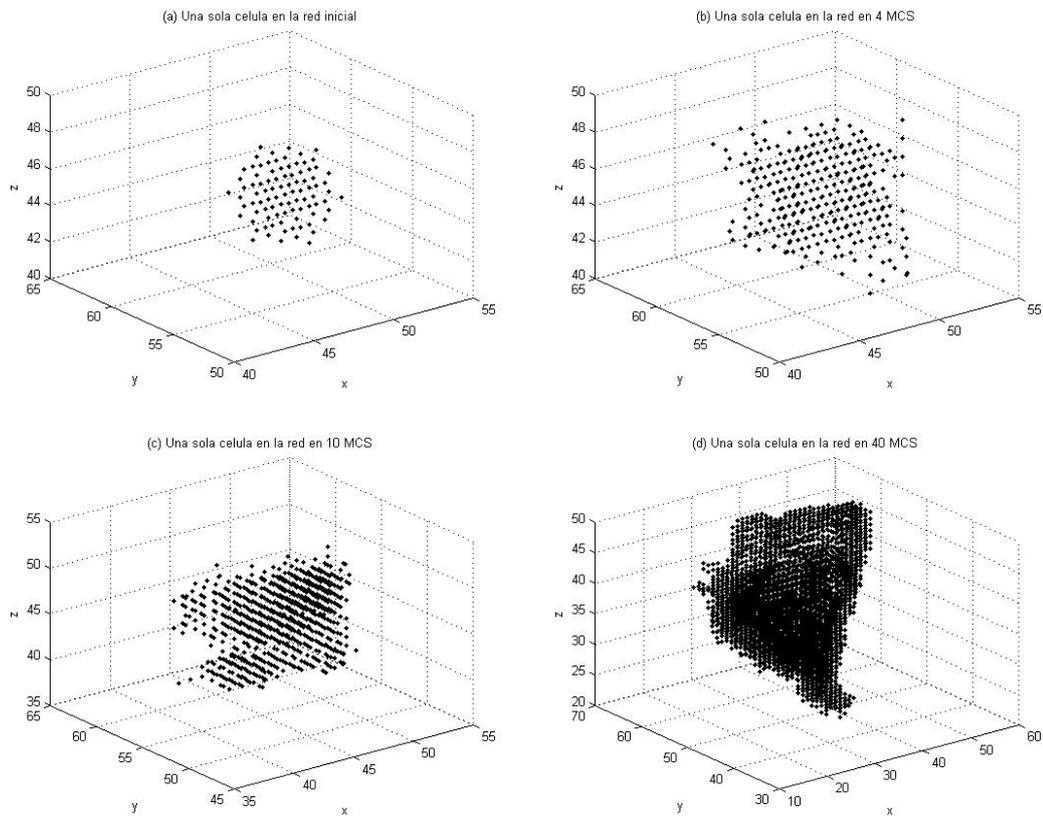


Figura 7-6 Evolución de una sola célula escogida aleatoriamente, (a) célula en su estado inicial, (b) luego de 4 MCS, (c) luego de 10 MCS, (d) configuración final de la célula.

7.4.1 ORGANIZACIÓN CELULAR PARCIAL

En la figura 7-7 se muestra la evolución de una sola célula, puede verse que la célula aumenta su tamaño, sin salirse de los límites del crecimiento normal, el cual llega hasta que la célula alcance el doble de su volumen target, tamaño en el cual debe dividirse.

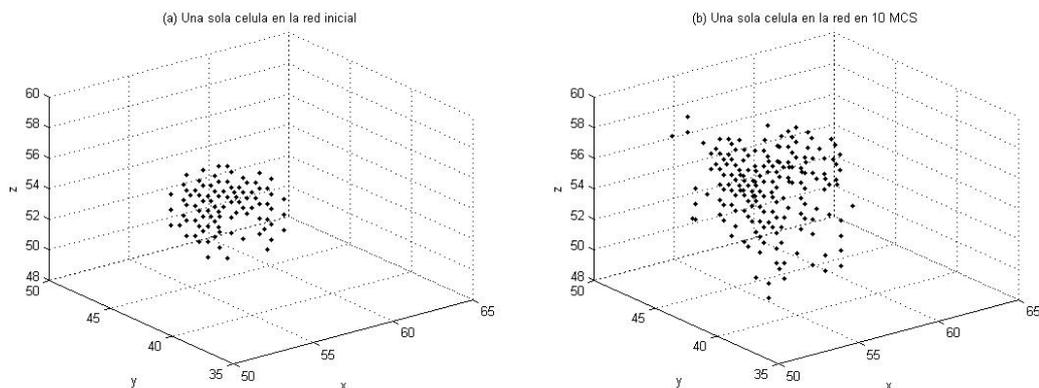


Figura 7-7 Evolución de una sola célula escogida aleatoriamente, (a) célula en su estado inicial, (b) célula en su estado final

Tabla 7-3 Datos para la simulación 2

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
MCS	10	T	32
Volumen inicial células tipo 2	116	Número células tipo 2	20
Volumen inicial células tipo 3	20	Número células tipo 3	160
Volumen target células tipo 1	0	Rango de Interacción	3
Volumen target células tipo 2	174	Región inicialización de la Red	0.333
Volumen target células tipo 3	30	λ para tipo 1	0
J(1,1)	3.2	λ para tipo 2 y 3	1
J(2,2)	0.4	J(2,3)=J(3,2)	1.0
J(1,2)=J(2,1)=J(1,3)=J(3,1)	1.6	J(3,3)	1.4

Usando los valores de la tabla 7.3 y solo con restricciones para cambio de volumen, se logra una organización celular parcial, lo cual se puede observar en la figura 7-8 donde se muestra las proyecciones de la evolución de la red hasta 10 MCS. Además, se presenta la evolución de los espectros de fluorescencia. Se puede observar como de la figura (a) a la figura (b) logra una disminución de la frontera negra-medio, debido a que son más favorables energéticamente las fronteras negra-verde y negra-negra. En la figura (d) puede verse como las células negras buscan unirse en un solo dominio, inclusive dejando unas células verdes en su interior.

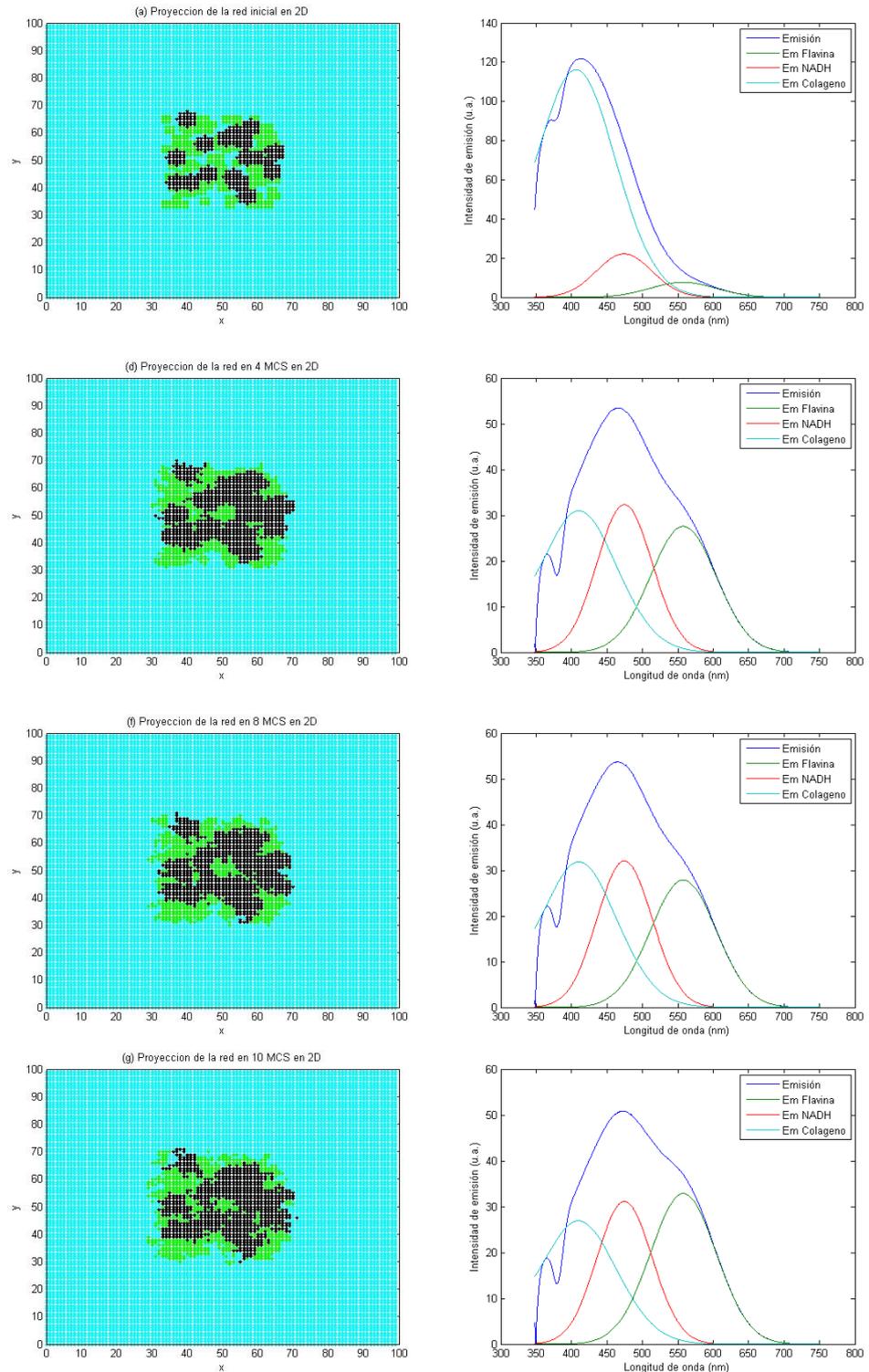


Figura 7-8 Organización celular parcial en 2D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) Red en 4MCS, (c) 8 MCS, (d) 10 MCS.

Todas estas consideraciones pueden ser observados también en la evolución de los espectros de fluorescencia que presentan cambios en las figuras gaussianas de cada uno de los fluoróforos. A partir del paso 4, el agregado deja de buscar la minimización de las fronteras mencionadas y no evoluciona más hacia una organización completa.

Se cree que no se logra una organización completa porque casi dos terceras partes de la red están ocupadas por matriz extracelular o células tipo 1, lo que puede influenciar fuertemente en la energía global del agregado, llevando a que la configuración logre un mínimo de energía del cual no le es fácil salir.

7.4.2 MÍNIMOS LOCALES DE ENERGÍA

Otra de las posibles razones de las configuraciones que se quedan atrapadas en mínimos locales, en vez de alcanzar un mínimo global, puede ser el hecho de comenzar con cierta organización parcial inherente. En la figura 7-9 se muestran los resultados obtenidos a partir de los datos de la tabla 7-4.

Tabla 7-4 Datos para la simulación 3

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
MCS	1000	$\beta=1/T$	32
Volumen inicial células tipo 2	120	Número células tipo 2	60
Volumen inicial células tipo 3	21	Número células tipo 3	420
Volumen target células tipo 1	0	Área target células tipo 1	0.0
Volumen target células tipo 2	160	Área target células tipo 2	143
Volumen target células tipo 3	28	Área target células tipo 3	45
$J(1,1)$	16	Rango de Interacción	3
$J(2,2)$	2	Región inicialización de la Red	0.333
$J(1,2)=J(2,1)=J(1,3)=J(3,1)$	8	$\lambda = \lambda'$ para tipo 1	0.005
$J(2,3)=J(3,2)$	5	λ para tipo 2 y 3	1
$J(3,3)$	7	λ' para tipo 2 y 3	1

En la figura 7-9(a) se puede observar cómo la configuración inicial tiene cierto grado de ordenamiento, a pesar de haberse formado aleatoriamente.

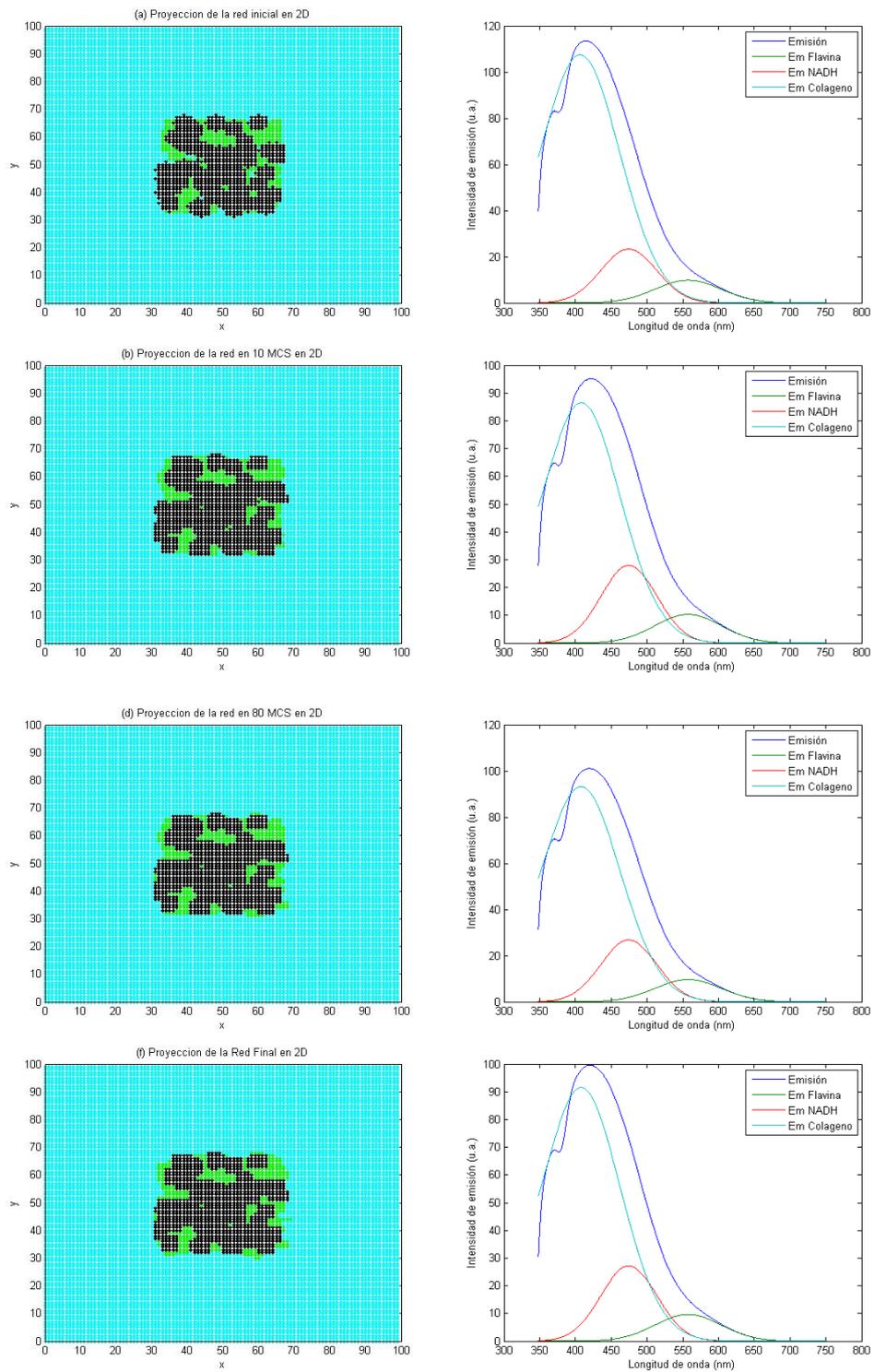


Figura 7-9 Red que se “congela”, Proyecciones en 2D y evolución de los espectros de fluorescencia. (a) Red Inicial, (b) 10 MCS, (c) 80 MCS, (d) 1000 MCS, Red Final.

En la figura 9 (b), el agregado de células ha evolucionado muy poco, se han disminuido algunas fronteras negra-medio, en esa configuración se congela la evolución del ordenamiento celular y permanece sin cambios significativos hasta la red final luego de 1000 MCS.

El ordenamiento celular de las células biológicas simuladas aparentemente no presenta cambios, contrario a los resultados de los espectros de fluorescencia que en un análisis la forma de los espectros, parecen no evolucionar, pero las contribuciones de cada uno de los fluoróforos presentes en la simulación si cambian. Esto quiere decir, que aunque existan pequeños cambios en los elementos de la red de cada célula, no se visualiza una promoción del conjunto células de estados normales a patológicos, hecho que se ve representado en cada uno de los espectros de fluorescencia.

7.4.3 MEDIO EXTRACELULAR QUE CRECE

Cuando la energía de interacción o adhesión entre las células tipo 1 es cero, o sea en el medio extracelular, se ve un fenómeno muy particular, en donde las células tipo 2 y 3 reducen su tamaño significativamente y el medio extracelular crece. En la figura 7-11 se puede observar éste comportamiento, generado con los valores de la tabla 7-5.

Tabla 7-5 Datos para la simulación 4

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
MCS	2	$\beta=1/T$	5
Volumen inicial células tipo 2	8	Número células tipo 2	300
Volumen inicial células tipo 3	8	Número células tipo 3	300
Volumen target células tipo 1	0	Área target células tipo 1	0.0
Volumen target células tipo 2	20	Área target células tipo 2	16
Volumen target células tipo 3	20	Área target células tipo 3	16
$J(1,1)$	0	Rango de Interacción	3
$J(2,2)$	2	Región inicialización de la Red	0.5
$J(1,2)=J(2,1)=J(1,3)=J(3,1)$	16	$\lambda = \lambda'$ para tipo 1	0.0
$J(2,3)=J(3,2)$	11	λ para tipo 2 y 3	1
$J(3,3)$	14	λ' para tipo 2 y 3	0.5

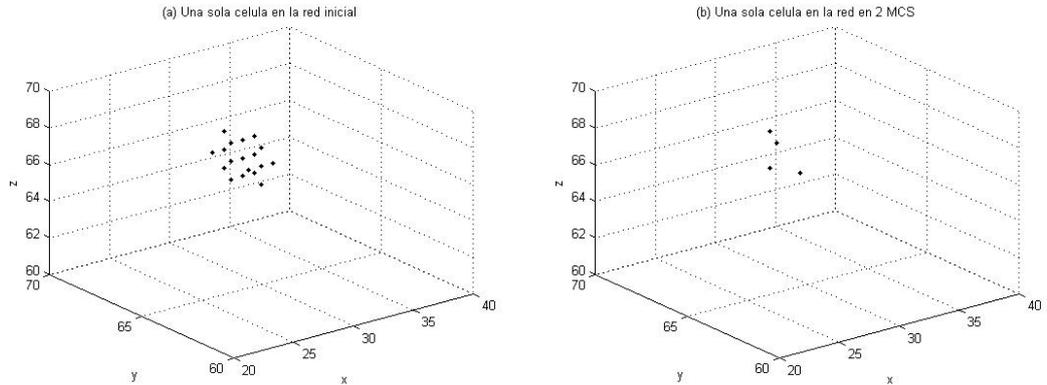


Figura 7-10 Una sola célula tipo 2 que disminuye de tamaño, (a) célula en su estado inicial, (b) la misma célula luego de 2 MCS

En la figura 7-10 se muestra la evolución de una sola célula tipo 2 escogida aleatoriamente. La célula está compuesta inicialmente por 18 puntos de red como se puede observar en la figura (a), luego de 2 MCS, solo está compuesta por 4 elementos de red, figura (b).

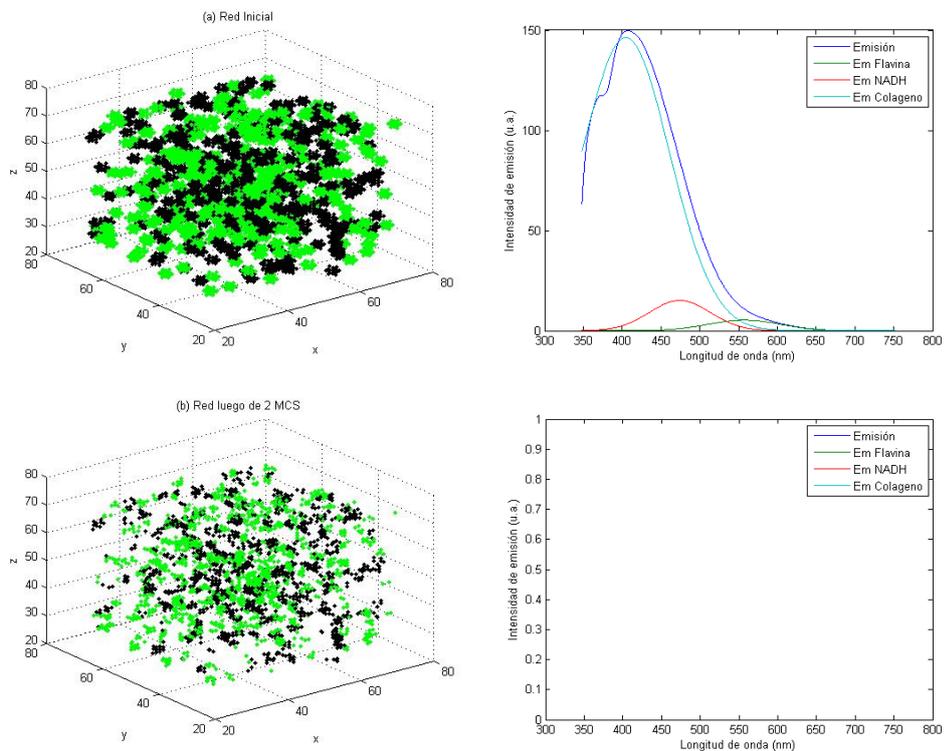


Figura 7-11 Células que disminuyen de tamaño y evolución de los espectros de fluorescencia, (a) Red Inicial, (b) Red en 2 MCS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría concluir que se observa un fenómeno parecido a la apoptosis o muerte celular, donde la matriz extracelular ECM, debido a sus características representadas en esta simulación, presenta una energía de interacción con ella misma, que limita el crecimiento de las células e inclusive las lleva a disminuir su tamaño considerablemente.

En el análisis de este fenómeno a partir de los espectros de fluorescencia, se puede considerar que debido a que no se encuentran elementos de red, en un número razonable, con los que se puedan interactuar, el espectro de fluorescencia no se produce, figura 7-11 (b). Lo cual, afirma que se hace necesario que en el medio analizado se presenten suficientes moléculas (para esta simulación elementos de red) que interactúen con la radiación electromagnética para obtener una fluorescencia medible.

7.5 CONCLUSIONES

El programa permite al usuario tener una gran flexibilidad en el momento de simular y de experimentar variando parámetros como volúmenes, áreas, energía de interacción entre células entre otros, para obtener comportamientos celulares, ya que se tiene un amplio rango de valores para configurar el programa. Además, las variadas opciones de visualización y los reportes de los estados intermedios de la red, le permiten al usuario analizar los resultados desde varios puntos de vista tanto gráficos como a nivel de información sobre las células y la red.

Las simulaciones donde se obtuvo una organización celular parcial, pueden sugerir que todos los valores para los parámetros del programa deben ser concordantes y en los rangos permitidos por el programa en el momento de simular las células biológicas, es decir, el usuario debe disponer de todos y cada uno de los valores para los parámetros en la configuración inicial y adaptados adecuadamente en el programa.

Se pudo comprobar la evolución de la no enfermedad a la enfermedad de los tejidos biológicos a través del análisis de los espectros de fluorescencia de las células simuladas. En cada uno de los casos en donde se presentaron cambios o evoluciones de estados normales a estados patológicos, se representó los cambios en las contribuciones de cada uno de los fluoróforos presentes en el análisis, que de acuerdo a la literatura, en la evolución de la normalidad a la

patología se presenta debido a las contribuciones de colágeno-elastina disminuyen y aumentan las del NADH.

En los resultados obtenidos en la simulación 4 se encontró que por medio de los valores para la energía de interacción de la matriz extracelular con ella misma, se puede controlar indirectamente el crecimiento y/o muerte de las células. Evento que también se representa en los espectros de fluorescencia.

REFERENCIAS

- ¹ B. Valeur, Molecular fluorescence, principles and applications. Wiley-Verlag GmbH (2002).
- ² T. Vo-Dinh. Biomedical Photonics. Handbook. CRC (2003).
- ³ T. O'Haver. Interactive computer models for analytical chemistry instruction, Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Maryland at College Park (2001-2009).
- ⁴ J. Glazer et al. The energetics of cell sorting in three dimensions. Interplay of genetic and physical processes in the development of biological form. World Scientific Publishing Company (1995)54-61.
- ⁵ A. Gierer et al. Regeneration of hydra from reaggregated cells. Nature (London), New Biol. (1972) 239, 98.
- ⁶ A. Upadhyaya. Thermodynamic and fluid properties of cells, Tissues and Membranes. Ph.D. dissertation. Arpita Upadhyaya. University of Notre Dame (2000).
- ⁷ F. Graner y Y. Sawada. Can surface adhesion drive cell-rearrangement? Part II: A geometrical model. J. Theo. Biol. 164 (1993) 477-506.
- ⁸ M. A. Knewitz, Um Modelo Para Investigação Do Crescimento E Da Morfologia De Tumores. Dissertação de mestrado em computação aplicada: Computação Científica. Universidade do Vale do Rio Dos Sinos. São Leopoldo (2002).
- ⁹ M. Mombach et al, Quantitative Comparison between Differential Adhesion Models and Cell Sorting in the Presence and Absence of Fluctuations. Physical Review Letters 75 (1995).
- ¹⁰ C. Mueller. Potts Model 2.0 Collaboration Requirements. CompuCell (2003).
- ¹¹ CompuCell. Laboratory for Computational Life Sciences: www.nd.edu/~lcls/compuCell/
- ¹² J. A. Izaguirre y T. Cickovski. COMPUCCELL3D Version 2.1.0 - User Guide (2005). <http://www.nd.edu/~lcls/compuCell>.
- ¹³ J. A. Izaguirre et al, COMPUCCELL, a multi-model framework for simulation of morphogenesis. Bioinformatics 20 (2004)1129–1137.
- ¹⁴ Y. Jiang, Cellular Pattern Formation. Ph.D. dissertation. University of Notre Dame (1998).
- ¹⁵ M. Mombach, Simulation of embryonic cell self-organization: A study of aggregates with different concentrations of cell types. Physical Review E. 59 (1999).

8. PROCESAMIENTO DIGITAL DE LA INFORMACIÓN ESPECTRAL DE FLUORESCENCIA

La metodología para el análisis de las alteraciones de los estados bioquímicos y morfológicos de los tejidos del cuello uterino en vivo y ex vivo, se basa en el desarrollo de un algoritmo computacional para el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia. Este procesamiento digital se compone de los siguientes pasos:

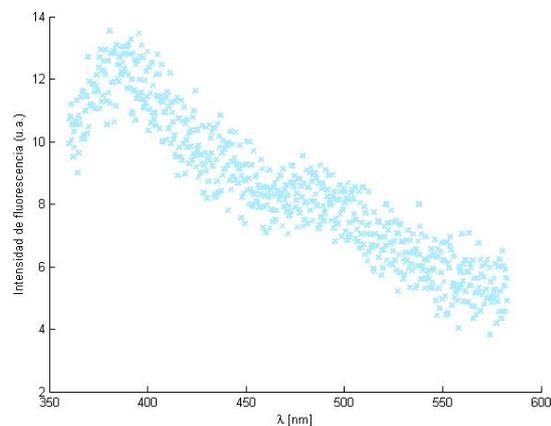


Figura 8-1 Promediado conjunto de la información espectral de fluorescencia

Paso 1: Adquisición. La información espectral de fluorescencia de cada punto de análisis de cada una de las pacientes es adquirida y registrada individualmente en archivos de texto.

Después de tener esta información espectral guardada como archivo de texto a través de los disparos consecutivos, se leen en MatLab, para generar una matriz de datos en donde se guarda la información de las mediciones tomadas por paciente. La matriz de datos tiene un número de columnas igual al número de puntos de medida multiplicado por treinta más una columna que contiene la información de las longitudes de onda, que servirá de referencia para las otras columnas que representan la intensidad de la medida de fluorescencia. Además, tiene 2048 filas que representan el rango de longitudes de onda desde 179.54 nm a 875.85 nm con un paso de 0.29 nm.

De esta manera queda un archivo que contiene las mediciones de todos los puntos de una paciente.

Paso 2: Promediado conjunto. Con el objetivo de asegurar la medida de la información espectral de fluorescencia de los tejidos biológicos en cada uno de los puntos de análisis, se tomaron 30 espectros, de los cuales se eliminan los 3 primeros y los 3 últimos, quedando un total de 24 espectros, los cuales son promediados, figura 8-1.

El promediado conjunto de los espectros. Sucesivas series de datos almacenados en memoria como matrices, se recogen y se suman punto por punto, los datos se promedian dividiendo la suma para cada punto por el número de barridos realizados, para aumentar de forma eficaz la relación señal/ruido.

Para comprender por qué el promediado conjunto aumenta de forma eficaz la relación señal/ruido, se realizan n medidas repetidas de S y se calcula el valor medio de la señal mediante la ecuación 8-1

$$S_x = \frac{\sum_{i=1}^n S_i}{n} \quad 8-1$$

Donde $S_j, i= 1,2, 3...n$ son las medidas individuales de la señal, incluyendo el ruido. En cada medida el ruido es, por tanto, $S_x - S_j$. Si se elevan al cuadrado y se suman las desviaciones de la señal con respecto de la media, S_x , y se divide entre el número de medidas n , se obtiene el ruido cuadrático medio que viene dado por la ecuación 8-2

$$\text{Ruido cuadrático medio} = \frac{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}{n} \quad 8-2$$

El ruido cuadrático medio se denomina normalmente a la varianza de la señal, y el ruido eficaz, o rms, es su desviación estándar, la cual viene dada por la ecuación 8-3

$$\text{Ruido eficaz} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}{n}} \quad 8-3$$

La relación señal/ruido para la medida es el valor medio de la señal dividido por su desviación estándar, ecuación 8-4.

$$\frac{S}{R} = \frac{S_x}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}{n}}} \quad 8-4$$

Si se multiplica en la ecuación 8-4 el numerador y el denominador por n se obtiene,

$$\frac{S}{R} = \frac{\sqrt{n}S_x}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}} \quad 8-5$$

La última expresión muestra que la relación señal/ruido es proporcional a la raíz cuadrada del número de datos recogidos para determinar el promediado conjunto.

Paso 3: Filtrado. Cuando se está tomando la información espectral de fluorescencia de los tejidos biológicos a través de la espectroscopía óptica de fluorescencia, se está filtrando análogamente las señales espectrales de segundo y tercer orden, por medio de un filtro de absorción y de un espejo focalizador, los cuales están instalados en la parte interna del espectrógrafo. Además, la información espectral de fluorescencia promediada, se filtra por medio de un filtro digital FIR (Respuesta de Impulso Finito), filtro de Savitzky-Golay, el cual opera directamente en el dominio de la distancia, y tiene la ventaja que minimiza el error cuadrático al ajustar con un polinomio los datos [15].

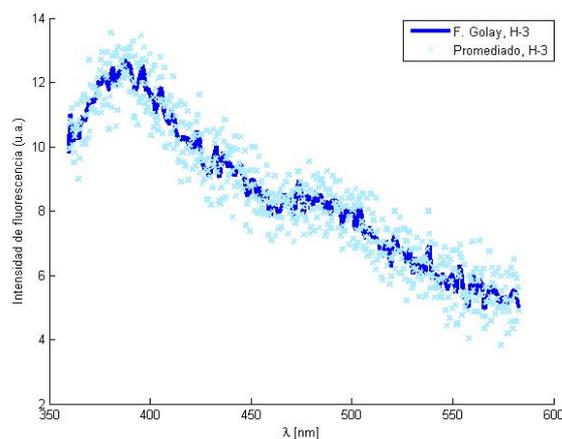


Figura 8-2 Espectro filtrado a través del filtro Savitzky-Golay de octavo orden, 30 puntos

El método de *Savitzky-Golay*, consiste en que cada dato promediado es sustituido por una combinación lineal de este y puntos cercanos. Para cada punto promediado (f_i), se ajusta un polinomio por mínimos cuadrados a los puntos $n_L + n_R + 1$ y luego se obtiene g_i , ecuación 8-6, como el valor del polinomio en la posición i . Al moverse a la posición $i+1$ se realiza otro ajuste por mínimos cuadrados para obtener un nuevo polinomio, y así sucesivamente.

$$g_i = \sum_{n=-n_L}^{n_R} c_n \cdot f_{i+n} \quad 8-6$$

Donde n_L es el número de puntos a la izquierda del dato i , mientras que n_R es el número de puntos a la derecha. Los coeficientes c_n dependen del ancho de la ventana ($2m+1$, $m=30$).

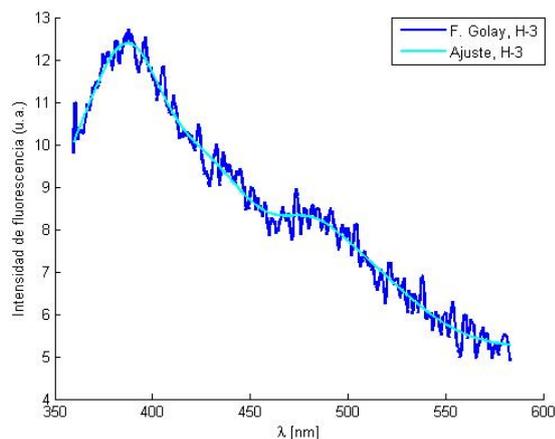


Figura 8-3 Ajuste de la información espectral de fluorescencia

Paso 4: Ajuste de los espectros. Cada espectro promediado y filtrado es ajustado por medio de un modelo matemático desarrollado en esta tesis doctoral, el cual permite simular el espectro característico de fluorescencia, ecuación 7-8, a través de cada una de las bandas gaussianas que representan las contribuciones de los fluoróforos en los procesos de absorción, excitación, emisión y transmisión presentados en el desarrollo del modelo matemático. El ajuste se desarrolla a través del método no lineal de los mínimos cuadrados para extraer un conjunto de características de la información espectral de fluorescencia como las intensidades de fluorescencia, los anchos medios, longitudes de onda centrales, las contribuciones, entre otras, de cada uno de los diferentes fluoróforos endógenos (como colágeno, elastina, NADH y Flavinas) presentes en los tejidos de cuello uterino. Este procedimiento se realiza por cada punto de análisis obtenido de las medidas de la información espectral de fluorescencia en el tejido de cuello uterino.

Después de realizar un ajuste, por un método gráfico, se calcula el coeficiente de correlación R y R^2 , que son la medida normalizada de la relación de las variables representativas del espectro promediado y filtrado, con el espectro ajustado. A partir de estos valores se descartan los espectros de los puntos de análisis cuyo índice de correlación este por debajo de 0.9. Si, ningún punto de análisis pasa la condición, no se procesa esta información y se muestra una ventana diciendo que ningún punto de la paciente ha superado el ajuste y se termina el proceso, si en cambio, existen puntos de análisis que superan el umbral de 0.9, se indica cuales puntos no superaron el ajuste y se continúa el proceso.

Debido a que los modelos no lineales son más difíciles de ajustar que los modelos lineales, se requiere un acercamiento iterativo que comienza con una estimación inicial, para cada coeficiente, produciéndose un ajuste de la curva para el conjunto de coeficientes actuales y el ajuste, lo cual responde al valor de, ecuación 8-7:

$$\hat{y} = f(X, \beta) \quad 8-7$$

Donde y es un vector de respuesta de $n \times 1$, f es una función de β y X , β es un vector de coeficientes de $m \times 1$, X es la matriz diseñada para el modelo de $n \times m$. Se ajustan los coeficientes y se determina si el ajuste mejora utilizando el algoritmo de *Gauss-Newton*, que asume los valores residuales cercanos a cero e itera el proceso volviendo a producir un nuevo ajuste de la curva hasta que se alcancen los criterios de convergencia especificados por la ecuación 3-6.

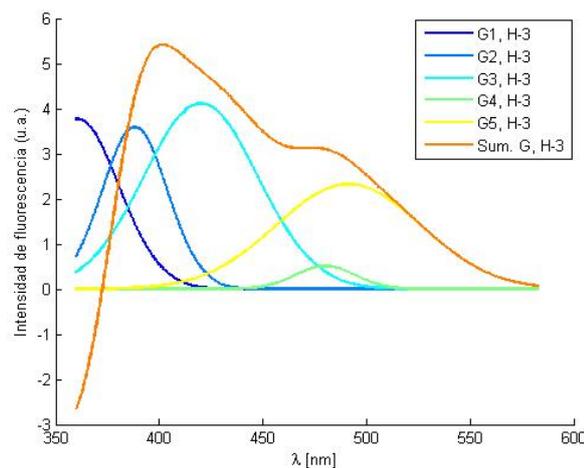


Figura 8-4 Contribución representada en bandas Gaussianas de cada uno de los fluoróforos

La primer banda gaussiana se atribuye a la información proporcionada por dispersión (Raman y/o Rayleigh) del agua, por tal motivo se la restamos al ajuste obtenido. De esta forma se analiza la información espectral obtenida a tiempo, ofreciéndose un diagnóstico de normalidad o patología a los tejidos de cuello uterino.

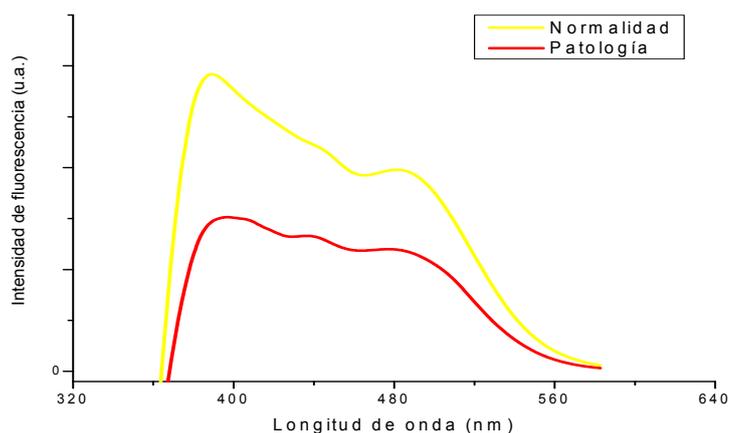


Figura 8-5 Espectros característicos de fluorescencia de normalidad y patología

Mahadevan et al, (1993) muestran en la figura 8-6, la información espectral de fluorescencia a longitudes de onda de 330 nm y 350 nm, se observan diferencias entre tejidos normales (curvas en área superior) y tejidos con patología (curvas en la zona inferior), allí especifican las del VPH, Inflamación y NIC; estas curvas son similares a las encontradas en nuestra investigación, trabajadas en una longitud de onda intermedia (337.1 nm) a las referenciadas ^[1].

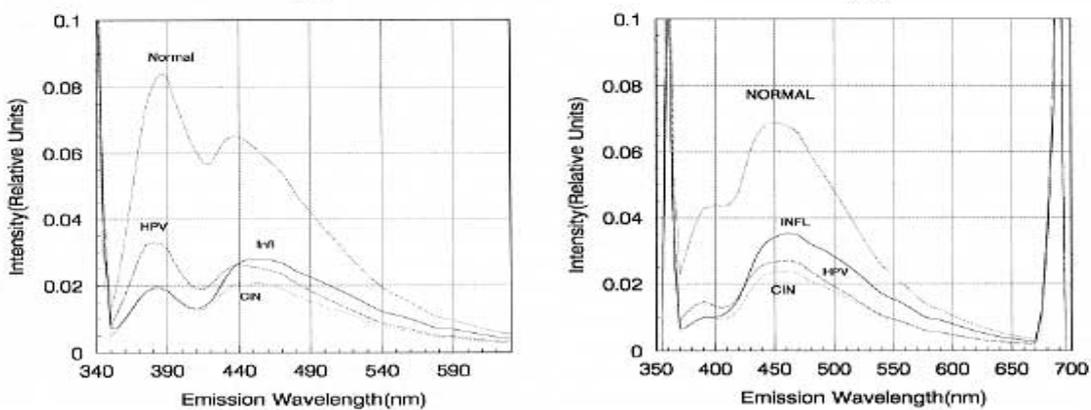


Figura 8-6 Información espectral de fluorescencia a longitudes de onda de 330 nm y 350 nm

Paso 5: Análisis de Componentes Principales. Después de extraer las características de la señal ajustada, se procede a identificar las variables más relevantes por medio del análisis de componentes principales PCA, que tiene por objetivo principal reducir la dimensión de un conjunto de variables, conservando la mayor cantidad de información que sea posible. Esto se logra mediante la transformación a un nuevo conjunto de variables las cuales son no correlacionadas y se ordenan de modo tal que unas pocas (las primeras) retengan la mayor cantidad de variación presente en el conjunto original de variables. Esto con el fin de hacer el trabajo más fácil para el clasificador.

Tenemos la matriz de datos X , la cual contiene todas las características de la señal. Se busca la posibilidad de representar adecuadamente la información, con un número menor de variables que son construidas como combinaciones lineales de las originales. La matriz de datos X es de dimensión $n \times 36$ (n filas que representan el número de pacientes (individuos) analizados y 36 columnas que son las variables)

En primer lugar como las variables tienen unidades o escalas de medida distintas, porque las características son de diferentes tipos; buscar la maximización de la varianza puede generar ambigüedades cuando se modifica la escala de medida de una variable cualquiera, por ejemplo, pasar de medir una longitud de onda de la señal a un área de la señal, tiene efectos directos sobre la varianza de la variable medida, lo cual se refleja en el peso que representan los valores propios, y por consiguiente, sus respectivos vectores propios. Por tal razón, se estandariza las variables antes de calcular las componentes, haciendo que las magnitudes de los valores numéricos para las variables de la matriz de datos X sean similares. Luego se centraliza la matriz de características X , para esto se obtiene la media de cada columna (variable), luego se resta la media a cada componente dentro de esa columna; es decir que cada variable(columna) tenga media cero. Después se halla la matriz de covarianza dada por la ecuación 8-8.

$$S = \frac{1}{n} X^T X$$

8-8

Se calcula los valores propios λ_i de S , el número de valores propios es igual al rango de S . Ordenamos los valores propios de mayor a menor. Se encuentran los vectores propios U_k de acuerdo a los valores propios, ecuación 8-9.

$$u_k = \begin{pmatrix} u_{1k} \\ \cdot \\ u_{jk} \\ \cdot \\ u_{pk} \end{pmatrix}$$

8-9

Con los vectores propios se encuentran las componentes principales.

$$c_k = \sum_{j=1}^p u_{jk} y_j, k = 1, \dots, p$$

8-10

Definimos así p nuevas variable principales, combinaciones lineales de las p variables centradas y llamadas componentes principales, ecuación 8-11.

$$\left(c_{ik} = \sum_{j=1}^p u_{jk} y_{ij}, k = 1, \dots, p, i = 1, \dots, n \right)$$

8-11

Al sacar la media de la matriz de componentes principales se verifica que es cero, se analizo que las varianzas de la matriz de componentes principales son los eigenvalores de la matriz de covarianza de los datos originales y las covarianzas de las componentes es igual a cero, dicho de otra forma las componentes principales son centradas, no correlacionadas y sus varianzas son los vectores propios.

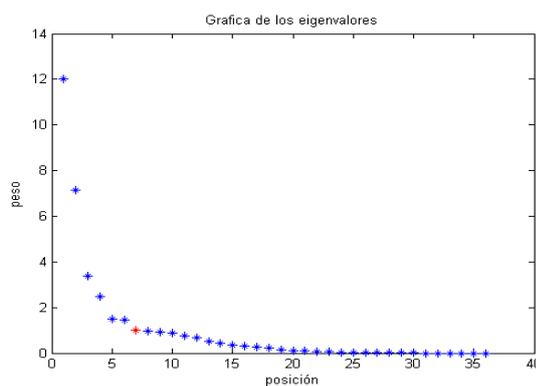


Figura 8-7 Gráfica de los eigenvalores

La matriz de componentes principales hallada tiene las mismas dimensiones que la matriz original, pero con diferentes propiedades estadísticas. Como el objetivo de PCA es reducir el número de variables de análisis, por tanto, se seleccionan los primeros componentes hasta alcanzar un valor fijo a priori de varianza acumulada, por ejemplo el 80%, el 90% ó el 100%, para determinar qué y cuántos

componentes principales se deben usar en la nueva representación de los datos. Se realiza un gráfico de los valores propios ordenados contra su respectiva posición ordinal. A través de esta regla, se seleccionan las componentes asociadas a valores propios superiores a una cota, la cual suele establecerse como la varianza media, que es 1, entonces se selecciona los valores propios mayores que la unidad. Por ejemplo, de acuerdo al criterio de la varianza media, en la anterior representación, figura 8-7, se seleccionaron 7 componentes principales. Al hacer una representación de los individuos sobre el primer plano principal se obtiene la siguiente gráfica.

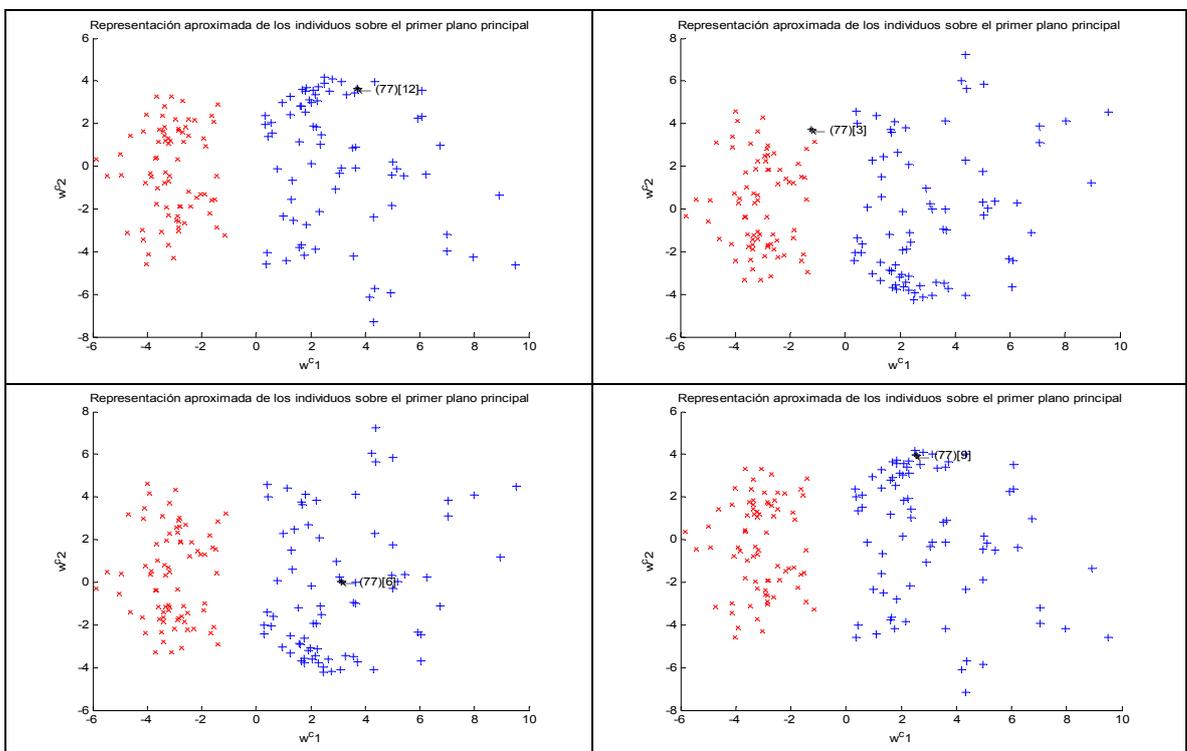


Figura 8-8 Gráficas de la representación de los individuos en el primer plano principal

Se puede ver como se separan los individuos en dos grupos (*cluster*), mostrando una separabilidad que es de gran utilidad al momento de trabajar con un clasificador.

REFERENCIAS

¹ A. Mahadevan, M. Follen, E. Silva, S. Thomsen, R. Richards-Kortum. Study of the fluorescence properties of normal and neoplastic human cervical tissue. *Lasers in surgery and medicine* 13 (1993) 647-655.

9. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA EN EL SOPORTE AL DIAGNÓSTICO MÉDICO DE PRECÁNCERES DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

En el estudio de los tejidos biológicos la medida de fluorescencia depende de: a) la concentración de los fluoróforos y de su distribución dentro del tejido; b) el ambiente bioquímico y biofísico en el que están presentes los fluoróforos, el cual altera su rendimiento cuántico y su tiempo de vida; c) la absorción y dispersión que resulta de la concentración y distribución de la no fluorescencia absorbida y dispersada dentro de las diferentes capas del tejido. Todos los efectos anteriores son causa de las variaciones de los espectros de fluorescencia y dependen de la longitud de onda de excitación.

Evidencias en investigaciones científicas sugieren que la técnica EOF puede ser usada para discriminar la normalidad y patología de los tejidos de cuello uterino. Los fluoróforos potenciales que contribuyen en la fluorescencia de estos tejidos, son identificados en la literatura como colágeno, elastina, NADH y FAD. El resultado de los análisis bioquímicos, indica que la contribución absoluta de la fluorescencia debida al colágeno decrece y la contribución del NADH se incrementa, cuando el tejido progresa de normalidad a patología.

9.1 ESTUDIO DE PRECANCERES EN TEJIDOS DE CUELLO UTERINO EN VIVO A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

El cuello uterino está compuesto por tejido fibroso, vascular, muscular y elástico y posee dos clases de epitelios: escamoso y columnar. El contraste de la luz fluorescente del tejido epitelial escamoso estratificado, en lesiones preneoplásicas y cáncer depende de la profundidad de la lesión ^[1], siendo ésta determinante en todos los análisis de espectroscopía óptica de fluorescencia, problema que se controla y soluciona con una distribución apropiada de las fibras ópticas o sondas que envían la radiación de excitación y recogen la emisión de fluorescencia. En el

cuello uterino la espectroscopía óptica de fluorescencia puede registrar la presencia y contribución de los fluoróforos endógenos como elastina, NADH, FAD y colágeno. Las diferencias de los espectros entre los tejidos patológicos y normales son atribuidas básicamente al incremento del NADH y a la reducción en la concentración del colágeno. NADH se encuentra en las células epiteliales y se asocia al metabolismo celular, el colágeno es un componente estructural de la matriz extracelular. En el análisis de fluorescencia debe tenerse en cuenta que el tejido del cuello uterino presenta cambios no patológicos asociados con la variación hormonal del ciclo menstrual, embarazo o menopausia. Algunos estudios muestran que el NADH y el FAD no tienen cambios significativos con la edad lo que si ocurre con el colágeno².

9.1.1 METODOLOGÍA

Se desarrolló un estudio sobre el uso de la espectroscopía óptica de fluorescencia en el análisis de precánceres de tejidos de cuello uterino, de tipo descriptivo, exploratorio en mujeres que asistieron a la consulta con citología previa normal o anormal. Inicialmente fueron 104 pacientes y por criterios de inclusión y exclusión quedaron 79, revisadas en diferentes unidades de la red de Patología Cervical y Colposcopia del Departamento de Caldas, las cuales fueron Aguadas, Palestina, Arauca y la unidad central de Manizales correspondientes a nivel I de complejidad. Dado que el número de muestras no fue suficiente, el grupo investigador planteó que el estudio debe ser considerado como prueba piloto.

Para el ingreso al estudio, se les diligenció el consentimiento informado, y el registro de la información se consignó en la hoja precodificada de la historia clínica de la red, los hallazgos clínicos de la colposcopia se registraron, así como el reporte de citología, el reporte de biopsias y el de espectroscopía óptica de fluorescencia. Dichos formularios fueron aplicados por los diferentes integrantes del equipo de investigación y a cada paciente se les asignó un número consecutivo (código) con el fin de organizar la base de datos.

A las pacientes se les aplicó la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en cuatro puntos correspondientes a las 12, 3, 6 y 9 convención horaria, figura 9-1; las colposcopias fueron realizadas por el ginecólogo investigador y tres colposcopistas que apoyaron el trabajo de campo, los hallazgos fueron registrados por cada médico en la historia clínica; las biopsias fueron tomadas por los médicos colposcopistas y analizadas por la médica patóloga investigadora.

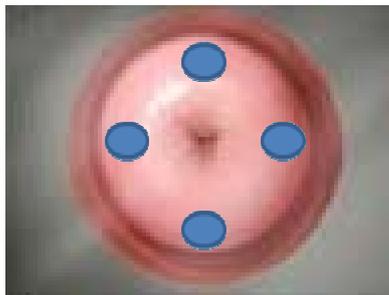


Figura 9-1 Imagen de los puntos de análisis en el tejido de cuello uterino

La información espectral obtenida por la técnica de Espectroscopía Óptica de Fluorescencia fue analizada mediante el cálculo de variables cuantitativas relevantes; las cuales permitieron hacer una mejor discriminación de los datos para poder clasificar los grupos de normalidad y patología. Estas variables cuantitativas son: anchos medios, concentraciones e intensidades de cada uno de los fluoróforos (Colágeno, Elastina, NADH y flavinas) y cálculo del índice de correlación entre los datos filtrados y ajustados en el caso de fluorescencia.

Finalmente se compararon los datos de los 4 métodos diagnósticos: de la citología, de la colposcopia y de la espectroscopía óptica de fluorescencia comparándolas con la biopsia, que fue la prueba de oro para evidenciar la capacidad de discriminación que tienen las diferentes técnicas en cuanto a la definición de los conceptos de normalidad y de patología de los tejidos analizados en el estudio, además se consideró la edad y la procedencia como un referente de la población.

9.1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9-1 Información pacientes analizadas por los diferentes métodos

RESULTADOS	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA	BIOPSIA	FLUORESCENCIA
PATOLÓGICA	39 (49.4%)	37 (46.8%)	48 (60.8%)	169 (53.5%)
NORMAL	26 (32.9%)	42 (53.1%)	22 (27.8%)	139 (44%)
SIN DATO	14 (17.7%)	0	9 (11.4%)	8 (2.5%)
TOTAL	79	79	79	316

En la tabla 9-1 se observa cómo a través de las diferentes técnicas se identifica la normalidad y la patología en las pacientes analizadas, las técnicas utilizadas en el

100% de las pacientes fueron la colposcopia y la fluorescencia, esta última se informa sobre un total de 316 mediciones que corresponden a 4 puntos por paciente. Los análisis mostrados en el gráfico 8-5 se realizaron con 331 espectros, por razones de exclusión de pacientes de la muestra, de manera que en estas tablas se presentan el análisis de 79 mujeres con un promedio de 4 espectros por paciente para un total de 316 mediciones.

9.1.2.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Con el objetivo de realizar un primer acercamiento al cálculo de sensibilidad y especificidad de la prueba (fluorescencia) el grupo investigador realiza el cálculo de estos valores los cuales se presentan a continuación:

Los resultados de la tabla 9-2 muestran una correlación en 31 pacientes en cuanto a la identificación del estado patológico por citología y fluorescencia, sin embargo en cuanto a la identificación de normalidad no es tan evidente al cruzar las dos técnicas.

Tabla 9-2 Fluorescencia vs. Citología

CITOLOGÍA \ FLUORESCENCIA	PATOLÓGICA	NORMAL	TOTAL
PATOLÓGICA	31 (83.8%)	6(16.2%)	37
NORMAL	21(80.8%)	5(19.2%)	26
TOTAL	52	11	63

Al analizar el total de pacientes diagnosticados por citología como patológicas (37 pacientes), el 83.8% fueron identificados también como patológicas a través de la fluorescencia.

Se resalta cómo el 80.8% de los resultados que fueron dados a través de citología como normales, la técnica de fluorescencia los identifica como patológicos, lo anterior puede sugerir que la técnica de fluorescencia dado que identifica cambios bioquímicos, podría identificar de manera temprana, cambios que no son notorios en la morfología celular, la cual es evaluada a través de la citología.

Tabla 9-3 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia /citología

		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Prevalencia de la enfermedad	58,73%	45,64%	70,76%
Pacientes correctamente diagnosticados	57,14%	44,09%	69,32%
Sensibilidad	83,78%	67,32%	93,23%
Especificidad	19,23%	7,31%	39,98%
Valor predictivo positivo	59,62%	45,13%	72,69%
Valor predictivo negativo	45,45%	18,14%	75,44%

La relación entre la colposcopia y la fluorescencia resultó precisa y coincidente en cuanto a patología y normalidad en 29 y 33 pacientes que corresponde al 80.5% del total de pacientes respectivamente en cada categoría.

Tabla 9-4 Fluorescencia vs. Colposcopia

COLPOSCOPIA \ FLUORESCENCIA	PATOLÓGICA	NORMAL	TOTAL
PATOLÓGICA	29(80.5%)	7(19.5%)	36
NORMAL	8(19.5%)	33(80.5%)	41
TOTAL	37	40	77

Tabla 9-5 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia / colposcopia

		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Prevalencia de la enfermedad	46,75%	35,42%	58,41%
Pacientes correctamente diagnosticados	80,52%	69,60%	88,34%
Sensibilidad	80,56%	63,43%	91,20%
Especificidad	80,49%	64,63%	90,63%
Valor predictivo positivo	78,38%	61,34%	89,58%
Valor predictivo negativo	82,50%	66,64%	92,11%

Tabla 9-6 Fluorescencia vs. Biopsia

BIOPSIA \ FLUORESCENCIA	PATOLÓGICA	NORMAL	TOTAL
PATOLÓGICA	38 (64.4%)	21(35.6%)	59
NORMAL	9(42.9)	12(57.1%)	21
TOTAL	47	33	80

Al comparar la biopsia con la fluorescencia se encuentra que 38 pacientes coinciden en el diagnóstico de patología y 12 pacientes en el diagnóstico de normalidad en ambas técnicas.

En cuanto a los resultados de normalidad dados a través de la biopsia y la colposcopia, nótese en las dos tablas anteriores, cómo continúan presentándose en menor proporción casos identificados como patológicos a través de la fluorescencia, lo cual está más a favor de la hipótesis planteada de que la fluorescencia, puede identificar cambios bioquímicos tempranos de los tejidos de una forma más precisa, lo que no pueden hacer las otras técnicas, que evalúan cambios morfológicos y estructurales que se presentan más tardíamente, por tanto el uso de la fluorescencia como método diagnóstico beneficiaría a la paciente en cuanto a posibilidades de intervención más temprana.

En las tablas 9-2, 9-4 y 9-6 se observa cómo al comparar la sensibilidad y la especificidad de la prueba (Fluorescencia) con la Citología, colposcopia y biopsia, la sensibilidad resulta ser mejor con la citología y la colposcopia, quedando con un menor porcentaje al compararlo con la biopsia. Al respecto es importante resaltar cómo la sensibilidad ha sido definida como la posibilidad de una prueba para clasificar correctamente a un individuo enfermo, o la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad. En este sentido se recuerda que el número de muestras en este caso se determina como un factor condicionante de estos resultados.

Tabla 9-7 Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica fluorescencia/biopsia

		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Prevalencia de la enfermedad	73,75%	62,52%	82,67%
Pacientes correctamente diagnosticados	62,50%	50,92%	72,87%
Sensibilidad	64,41%	50,80%	76,13%
Especificidad	57,14%	34,44%	77,41%
Valor predictivo positivo	80,85%	66,27%	90,35%
Valor predictivo negativo	36,36%	20,96%	54,86%

En relación a la especificidad, ésta resultó ser más alta al compararla con los resultados de la colposcopia, en segundo lugar con los de la biopsia y el resultado más bajo resultó ser con el de la citología. Es importante recordar que la especificidad es la capacidad de la prueba para detectar a los tejidos sanos, que al compararla con los resultados de la Biopsia o Gold Standard resultó ser de 57,1%.

Si se tiene en cuenta lo que significa el valor predictivo positivo, probabilidad de padecer la enfermedad si se tiene un resultado positivo en el test, este valor en la fluorescencia resultó ser más alto al compararlo con la biopsia, en segundo lugar con la colposcopia y en último lugar con la citología; de igual manera el valor predictivo negativo resultó más bajo en la comparación con los resultados de la biopsia.

9.1.2.2 CORRELACIÓN DE RESULTADOS ENTRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS

Tabla 9-8 Colposcopia vs. Citología

COLPOSCOPIA \ CITOLOGÍA	PATOLÓGICA	NORMAL	TOTAL
PATOLÓGICA	16 (48.5%)	17(51.5%)	33
NORMAL	23(71.9%)	9(28.12%)	32
TOTAL	47	33	65

Nótese en la tabla anterior, cómo en relación a la identificación de patología existe concordancia en 16 pacientes (48.5%) entre el resultado dado por citología y Colposcopia y en relación a la normalidad hay concordancia en 9 pacientes (28.12%). Es bueno aclarar que muchas de las citologías realizadas en la red de patología cervical y Colposcopia del departamento de Caldas, son realizadas únicamente en endocérvix, debido a la experiencia obtenida a través de la evaluación colposcópica que se realiza de rutina en el exocérvix.

En la tabla 9-9 se observa cómo al cruzar colposcopia y biopsia existe una concordancia mayor que en el cruce con la citología, no solo en identificación de patología 34 pacientes (94.4%), sino también en normalidad 21 pacientes (60%).

Tabla 9-9 Colposcopia vs. Biopsia

COLPOSCOPIA \ BIOPSIA	PATOLÓGICA	NORMAL	TOTAL
PATOLÓGICA	34 (94.4%)	2(9.55%)	36
NORMAL	14(40%)	21(60%)	35
TOTAL	48	23	71

Los anteriores datos sugieren y confirman lo descrito en la literatura por Disaia-Creasman ^[5], la cual plantea cómo en el diagnóstico de patología a nivel cervical es más concordante, cuando se usan las técnicas de biopsia y colposcopia.

9.1.3 CONCLUSIONES

Se desarrolló la técnica de la espectroscopía óptica de fluorescencia a través de la implementación de hardware y software que permitieron obtener información espectral de los tejidos del cuello uterino, para ofrecer soporte al diagnóstico médico y manejo de neoplasias.

Se obtuvieron diferentes patrones de la información espectral de fluorescencia basados en la acumulación de gran número de datos de las áreas analizadas en el cuello uterino, al correlacionar los espectros obtenidos con los resultados de las citologías, colposcopias y las biopsias (prueba de oro para el diagnóstico), de manera que se caracterizaron las curvas como patológicas y normales.

Se analizó el pico de NADH y su relación con el pico colágeno y elastina. En los tejidos normales la relación NADH/ colágeno-elastina es menor que en los tejidos patológicos.

Si bien se siguió un protocolo estricto en cuanto a los sitios de toma de la señal en el cuello uterino, las mediciones fueron realizadas por 4 médicos colposcopistas con diferente nivel de entrenamiento, lo que conlleva a subjetividad, esto dificultó lograr uniformidad en el reporte de diagnóstico colposcópico, además en la presión aplicada a la sonda para obtener la señal espectral de fluorescencia del tejido; la toma de la biopsia puede no coincidir exactamente con el sitio de obtención de la señal espectral, además en la lectura anatomo-patológica de las muestras se evalúan varios cortes a 7 μm y los sitios evaluados no necesariamente coinciden con el punto preciso de la información espectral.

El número de la muestra no permitió obtener cifras de sensibilidad y especificidad estadísticamente significativas pero la evidencia obtenida hasta el momento muestra cómo al parecer la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia podría ser sensible y específica en el diagnóstico de lesiones intraepiteliales, el proceso investigativo debe continuar para confirmar ésta hipótesis.

De acuerdo a los resultados y a la hipótesis planteada de que la fluorescencia, puede identificar cambios bioquímicos de los tejidos de una forma más precisa y más temprana, lo que no pueden hacer las otras técnicas, que evalúan cambios morfológicos y estructurales que se presentan más tardíamente, por tanto el uso de la fluorescencia como método diagnóstico beneficiaría a la paciente en cuanto a posibilidades de intervención en fases iniciales.

9.1.4 RECOMENDACIONES

Se propone continuar con el desarrollo de la espectroscopía óptica de fluorescencia como herramienta sensible, específica y no invasiva, para el diagnóstico de las lesiones del cuello uterino, para ello, se propone una siguiente etapa en el desarrollo de una investigación prospectiva, diseñada y controlada a doble ciego en pacientes con NIC I y NICII/NICIII, para determinar la sensibilidad y especificidad de la espectroscopía óptica de fluorescencia, frente al estudio anatómo-patológico siendo esta la prueba de oro; esta herramienta, ha sido probada por científicos de varios centros del mundo, no solo en patología del cuello uterino, sino también en patología de piel, orofaringe y tubo gastrointestinal.

El proyecto de investigación sobre espectroscopía óptica de fluorescencia debe continuar con estudios diseñados y controlados, con el objeto de descentralizar el conocimiento y esta tecnología debe ser utilizada en los grandes municipios, donde está funcionando la red de patología cervical y colposcopia. Para esto es necesario obtener una técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia más avanzada, que funcione en la unidad central de patología cervical y colposcopia de la Universidad de Caldas, que sirva como apoyo en el diagnóstico de otras neoplasias del organismo humano.

El desarrollo y la aplicación de la espectroscopía óptica de fluorescencia puede plantearse como una tecnología portable, no invasiva, más sensible, de mayor especificidad y de menor costo que la histología, para el diagnóstico y orientación del tratamiento en precánceres de varios órganos del cuerpo humano.

9.2 ESTUDIO DE PRECÁNCERES EN BIOPSIAS DE MAMA A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

Como complemento a las experiencias investigativas y con la finalidad de probar la sensibilidad de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, en esta experiencia investigativa se presenta el análisis de la información espectral de fluorescencia obtenida de muestras de biopsias de tejido mamario preservadas en una disolución acuosa al 10% (formol), mediante la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, en el rango de 360 a 760 nm, la cual permite detectar los

cambios bioquímicos, que presentan los tejidos de mama en estado normal y patológico. La información espectral se analizó extrayendo las características presentes en los espectros tales como anchos medios, concentraciones e intensidades de cada uno de los fluoróforos (Colágeno, Elastina, NADH y Flavinas) presentes en el tejido mamario. Luego a este estudio, se realizó un análisis estadístico, el cual permitió obtener medidas de tendencia central que permitieron identificar las diferencias más significativas que presentan los fluoróforos en tejidos de mama normal y en presencia de algún tipo de lesión.

En Colombia, durante el año 2001 se diagnosticaron 4.389 casos nuevos de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, 333 casos más que en el año 2000, lo que representó un incremento de 8,2% en relación con el año anterior, siendo el cuello uterino, la mama, la piel y el estómago las cinco zonas de localización anatómica más frecuentes ^[3]. El cáncer de mama es la causa de muerte de aproximadamente 1.700 mujeres cada año, constituyendo la segunda neoplasia maligna más frecuente en las mujeres, lo que la convierte en un problema de salud pública que va en aumento en los últimos 20 años ^[4].

Ante este incremento y teniendo en cuenta que el éxito del tratamiento del cáncer corresponde a una detección temprana de la enfermedad, se ha hecho necesario la búsqueda de estrategias que logren reducir este tipo de problemas, surgiendo soluciones como la de implementar nuevas técnicas de detección de pre-cáncer que al ser comparadas con procedimientos comunes permitan realizar un diagnóstico más ágil y oportuno, disminuyendo el tiempo entre los procesos de diagnóstico y de intervención ^[5]. Es por esto que la técnica de Espectroscopía Óptica de Fluorescencia se ha empleado como una herramienta de soporte al diagnóstico de lesiones precancerosas en diferentes órganos del cuerpo humano, incluyendo la glándula mamaria.

Algunos grupos han utilizado la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia para discriminar entre tejidos de mama normales y malignos. Alfano y colaboradores ^[6], usando una fuente de excitación de 300 nm, calcularon la relación de intensidad de fluorescencia a 340 nm y 440 nm, desde tejidos de mama normales, benignos y malignos. Obteniendo, en sus resultados una relación de intensidad para las muestras cancerosas, superior a los valores hallados para las muestras de tejido benigno y maligno.

Por otra parte, Gupta y su grupo de trabajo ^[7], adquirieron el espectro de emisión de fluorescencia desde muestras de tejido mamario normal, benigno y canceroso

usando como fuente de excitación un láser de gas N₂ de 337 nm, encontrando que el espectro promedio de cada muestra se caracterizó por presentar tres picos a 390, 430 y 520 nm, predominando este último en las muestras cancerosas. Estas bandas de fluorescencia, se asociaron a fluoróforos como proteínas estructurales (Colágeno, Elastina), coenzimas (NADH) y Flavinas. En otros estudios realizados, se caracterizó la información espectral de fluorescencia de tejidos de mama normal y maligno a diferentes longitudes de onda de excitación en el rango de 300 nm a 460 nm, encontrándose que estas longitudes permiten caracterizar fluoróforos como colágeno, NADH y FAD [8].

9.2.1 METODOLOGÍA

Esta prueba piloto del estudio de la información de fluorescencia de muestras de biopsias de mama, se realizó sobre muestras de tejido mamario, suministradas por el Instituto Caldense de Patología y provenientes de mujeres que presentaron anomalías en el examen mamográfico. Una vez obtenidas de la paciente las muestras de tejido, se preservaron en una disolución acuosa al 10 % (formol), y se estudiaron en estos los estados de normalidad o patología a través de la histopatología y de la técnica de Espectroscopía Óptica de Fluorescencia.

Para realizar las medidas de fluorescencia, se iluminó el tejido mamario con un láser de gas nitrógeno de 337.1 nm a través de una sonda de fibra óptica, esta presenta un arreglo de siete fibras, seis para la recolección de la información de fluorescencia y una para iluminar la superficie del tejido mamario. La información espectral obtenida, se registró en el intervalo que va desde los 179 nm hasta los 900 nm, por medio de un espectrógrafo USB 2000, el cual se compone de un elemento de dispersión que se encarga de separar la luz, emitida por el tejido a las respectivas longitudes de onda y de un detector que mide las intensidades a estas longitudes de onda. Por último, se usó un software desarrollado por el Grupo de Magnetismo y Materiales Avanzados de la Universidad Nacional-Sede Manizales, el cual controla el funcionamiento del equipo de fluorescencia y registra la información espectral obtenida por la técnica a través de algoritmos (uno para el análisis de la información espectral de fluorescencia y otro para el sistema de disparo, que controla y sincroniza los tiempos de integración del espectrógrafo y los pulsos del láser). El algoritmo encargado de analizar la información espectral de fluorescencia promedia, filtra, ajusta, segmenta y además, caracteriza los datos obtenidos utilizando una solución numérica de la ecuación de Beer-Lambert para medios turbios, ecuación 1. Los parámetros característicos de la medida de fluorescencia de estos tejidos son intensidad normalizada, longitud de onda,

anchos medios, composición, *background*, y coeficiente de correlación entre otros, para cada uno de los fluoróforos (Colágeno, Elastina, NADH y FAD) presentes en el tejido.

9.2.2 RESULTADOS

En la Figura 1 se presenta un esquema alusivo a la manera como se adquirió la información espectral de fluorescencia en muestras de tejido mamario, las cuales presentaban una forma de cubo con dimensiones 5 mm de espesor y un área de la cara superior de 1cm². Las medidas de fluorescencia, se realizaron solo en la cara superior de la muestra, posicionándose la sonda de fibra óptica en nueve diferentes puntos de la superficie del tejido mamario, medidos de izquierda a derecha e iniciando en la parte superior de la cara. Los espectros obtenidos por la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia fueron seleccionados estimando un valor para el coeficiente de correlación mayor al 90 % después de ser analizados y otros simplemente fueron excluidos del estudio porque presentaban artificios en el perfil espectral, hecho que pudo presentarse por la presencia de luz parasita proveniente de las lámparas de mercurio, presentes en el lugar donde se realizaron las medidas de fluorescencia. La figura 9-2, muestra los resultados de la medida de fluorescencia en la superficie del tejido mamario, que evidencia los espectros de fluorescencia de los tejidos patológicos respecto a los tejidos normales. Esta clasificación se apoyó en diagnósticos histopatológicos.

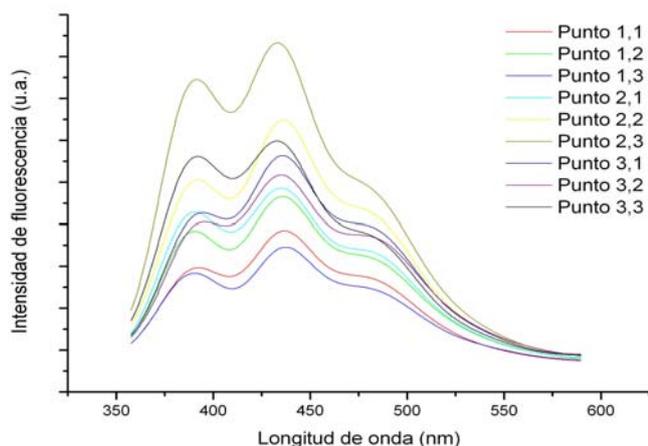


Figura 9-2 Información espectral de fluorescencia de muestras de biopsias de mama

El análisis estadístico que presenta en la tabla 9-10 sugiere que valores de las características como la media de la intensidad y de las contribuciones relativas de cada uno de los fluoróforos son estadísticamente significativos, esto permite una discriminación entre los grupos de normalidad y patología. La media de las muestras patológicas, presenta una intensidad para el Colágeno, Elastina y NADH (0.97, 0.96 y 0.97) mayor a los valores encontrados para el grupo de normalidad (0.95, 0.24 y 0.80). De igual forma, el parámetro de concentración, evidencia valores de la media para los mismos tres fluoróforos mayor en el grupo patológico (33.13, 38.23 y 53.49), comparado con en el grupo de normalidad (6.11, 5.13 y 17.17).

Tabla 9-10 Análisis Estadístico de la información espectral de fluorescencia en biopsia de mama

PARAMETROS		MEDIA		SD		MEDIANA	
		N	P	N	P	N	P
Intensidad normalizada	Colágeno	0,95	0,97	0,04	0,02	0,97	0,98
	Elastina	0,24	0,96	0,41	0,08	0,06	0,98
	NADH	0,80	0,97	0,04	0,05	0,82	0,99
	Flavinas	0,85	0,70	0,17	0,31	0,89	0,75
Longitud de onda	Colágeno	378,79	387,95	4,80	1,36	380,12	388,22
	Elastina	410,20	433,77	32,64	1,68	410,96	433,58
	NADH	437,69	477,03	1,57	15,52	437,11	477,95
	Flavinas	470,74	533,80	2,32	37,72	471,46	537,82
FWHM	Colágeno	34,03	35,83	8,55	2,81	36,96	34,88
	Elastina	54,68	34,54	36,15	10,62	55,14	32,86
	NADH	21,80	54,19	1,04	10,93	21,65	53,39
	Flavinas	68,45	40,75	10,52	15,92	69,21	39,28
Contribuciones	Colágeno	6,11	33,13	3,68	10,92	4,69	32,53
	Elastina	5,13	38,23	6,96	17,92	2,89	40,56
	NADH	17,17	53,49	6,05	17,12	15,34	53,01
	Flavinas	26,25	21,08	3,57	18,23	25,57	16,02
Background		6,60	8,62	0,37	0,77	6,70	8,71
Coeficiente de Correlación		0,99	0,99				

Las diferencias encontradas en los valores de la media para el parámetro de la longitud de onda de emisión para los fluoróforos como Colágeno, Elastina y NADH en el grupo patológico (387.95, 433.77 y 477.03) y normal (378.79, 410.20 y 477.03), puede darse por la presencia de centros dispersores dentro del tejido, siendo este corrimiento mucho mayor para la Elastina y NADH. La dispersión en los tejidos biológicos se asocia principalmente a la presencia de organelas celulares. Por otra parte, se tiene un valor para la media de las flavinas (533,80) mayor en el grupo patológico comparado con el grupo normal (470,74), lo cual se

debe a que esta molécula presenta una amplia banda de emisión de fluorescencia desde los 460 a 520 nm.

De acuerdo a los análisis histopatológicos de las biopsias de mama y a los resultados obtenidos a través de la espectroscopía óptica de fluorescencia, se sugiere que la forma de los espectros de fluorescencia para tejido normal y tejido patológico encontrados en este estudio son los que se pueden observar en la figura 9-3. Se presenta dos índices tanto para la normalidad como para la patología, esto se debe a la presencia de la luz parasita de las lámparas de mercurio, y sugiere que aunque exista otra perturbación externa, no se presenta modificación en la información espectral de fluorescencia.

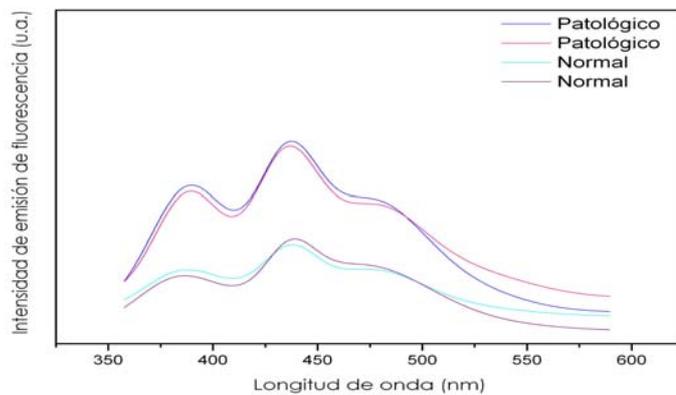


Figura 9-3 Información espectral de fluorescencia normal y patológica

9.2.3 CONCLUSIONES

En este estudio se analizó la información espectral de fluorescencia obtenida de las biopsias de tejido mamario con el fin de identificar las características más significativas en el estudio de los fluoróforos presentes en estos tejidos. Se observó que las moléculas como colágeno, elastina y NADH juegan un rol importante en el análisis de los estados de patología y normalidad de los tejidos mamarios, debido a que estos presentan valores relevantes en el análisis estadístico, lo cual concuerda con resultados similares reportados en la literatura.

REFERENCIAS

- ¹ S. Chang, M. Yusoff Dawood, G. Staerke, U. Utzinger, R. Richards-Kortum, M. Follen. Fluorescence spectroscopy for cervical pre-Cancer detection: Is There Variance Across the Menstrual Cycle. *Journal biomedics optics* 7 (2002)595-602.

-
- ² E. Gill, A. Malpica, R. Alford, A. Nath, M. Follen, R. Richards-Kortum, N. Ramanujam. Relationship between collagen autofluorescence of the human cervix and menopausal status. *Photochemistry and photobiology* 77 (2003) 653-658.
 - ³ M. Piñeros. Registro Institucional de Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, empresa social del estado. Resultados principales, Año 2001. *Revista Colombiana de Cancerología*. 6 (2002).
 - ⁴ M. Molano. Factores pronósticos del cáncer de mama. Una mirada hacia el futuro. *Revista colombiana de cancerología* 11 (2007).
 - ⁵ N. Ramanujam. Spectroscopy fluorescence in vivo, *Encyclopedia of analytical chemistry*, ed. Meyers (2000).
 - ⁶ R. R. Alfano. Light sheds light on cancer-distinguishing malignant tumors from benign tissues and tumors. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 67(1991) 3-4.
 - ⁷ P. K. Gupta. Breast cancer diagnosis using N₂ laser excited autofluorescence spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 21 (1997).
 - ⁸ G. Palmer, N. Ramanujam, et al. Autofluorescence and diffuse reflectance properties of malignant and benign breast tissues. *Ann Surg Oncol* 11 (2004) 65-70.

10. PROPUESTA DE METODOLOGÍA PARA EL SOPORTE AL DIAGNÓSTICO MÉDICO EN VIVO DE PRECANCERES DE TEJIDOS DE CUELLO UTERINO

De acuerdo a cada uno de los resultados obtenidos, en las diferentes experiencias investigativas, relacionadas con el análisis de los tejidos biológicos a través de la espectroscopía óptica de fluorescencia, basados en el procesamiento digital, de la información espectral de fluorescencia, permitieron visualizar el potencial que ofrece esta técnica en la caracterización de estados de normalidad y patología de los tejidos del cuello uterino. Estas consideraciones y cada uno de los resultados desde la simulación, hasta la aplicación permiten **PLANTEAR una nueva Metodología para el soporte en el diagnóstico médico de patologías de tejidos de cuello uterino, basada en las técnicas de espectroscopía óptica de fluorescencia, procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y el procesamiento digital de las imágenes obtenidas por colposcopia**, figura 10-1.

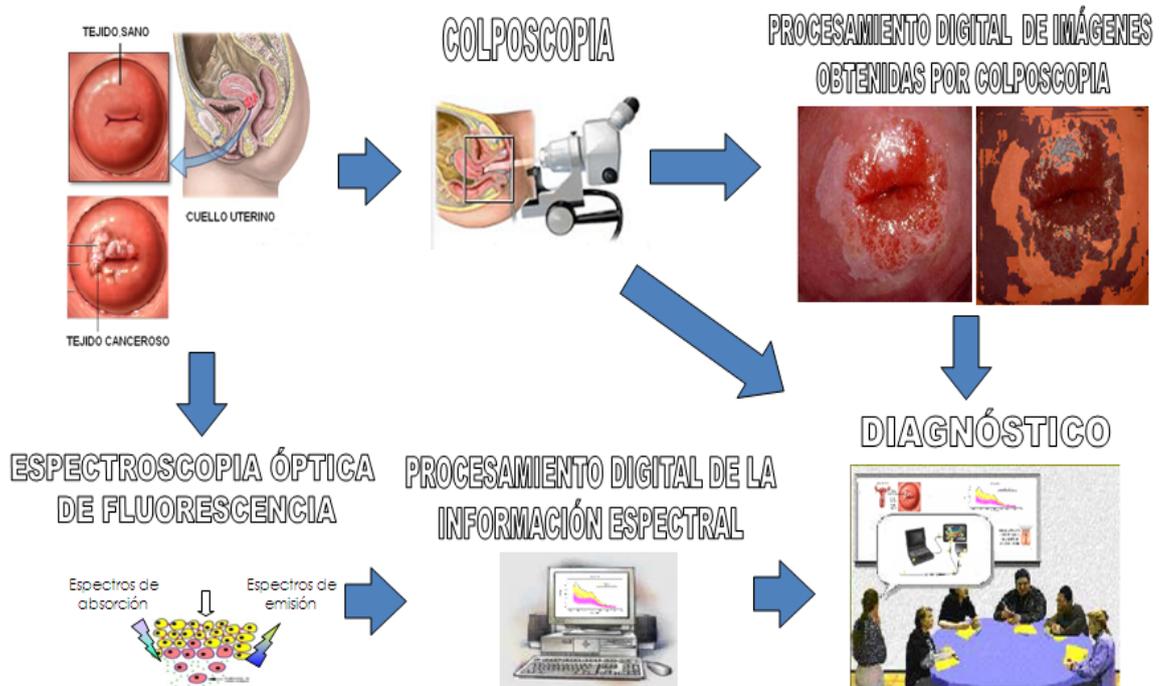


Figura 10-1 Metodología para el diagnóstico de precánceres de cuello uterino

Esta metodología propone a los profesionales de la salud, que al ingresar pacientes que a su criterio requieran el análisis de colposcopia, que adquiera una o varias imágenes. Estas imágenes serán procesadas inmediatamente, para obtener las regiones patológicas y sanas, y se realice como paso seguido un análisis a través de la espectroscopía óptica de fluorescencia, con el fin de confirmar el estado de estas regiones obtenidas. El diagnóstico final estará soportado por el resultado de las tres técnicas: la colposcopia, el procesamiento de la información espectral obtenida por la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia y por el procesamiento digital de las imágenes de cuello uterino.

Se plantea que esta metodología de diagnóstico permita tener mayor sensibilidad, especificidad, confiabilidad y reproducibilidad que las técnicas convencionales para el análisis de los tejidos biológicos, disminuir el tiempo en el proceso de diagnóstico y ofrecer a las pacientes tratamiento oportuno, minimizando así los costos en la detección temprana de precánceres de los tejidos de cuello uterino, y buscando llegar de esta forma a mucha más población, beneficiando a un mayor número de mujeres en forma asertiva.

10.1 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES DE TEJIDO CUELLO UTERINO OBTENIDAS POR COLPOSCOPIA

Como una herramienta complementaria del estudio de los tejidos de cuello uterino en vivo, se realizó una investigación tipo experimental sobre el procesamiento digital de imágenes obtenidas por colposcopia de los tejidos de cuello uterino.

La colposcopia es un examen visual especializado del cérvix, la vagina, y de los labios vaginales externos o la vulva. Este examen es empleado para evaluar pacientes con citologías o prueba de Papanicolaou anormales. Y requiere de un instrumento llamado colposcopio el cual ayuda a identificar cambios, muchas veces leves, en el cérvix y la vagina ^[1,2]. Los resultados del examen colposcópico se clasifica en tres grupos: (a) Hallazgos colposcópico normales: Epitelio escamoso original, epitelio columnar o cilíndrico y zona de transformación típica. (b) Hallazgos colposcópico anormales: Zona de re-epitelización atípica, zona de transformación atípica, epitelio acetoblanco, leucoplasia, punteado de base, mosaico, vasos atípicos y sospecha de carcinoma francamente invasivo y (c) Hallazgos colposcópico no directamente relacionados con malignidad: cambios inflamatorios, cambios distróficos, entre otros.

Se puede decir que la colposcopia es satisfactoria cuando se observan los límites de la zona de transformación en toda su extensión, y no satisfactoria Cuando no se visualiza totalmente la zona de transformación (unión escamo-columnar) o si sólo se visualiza una parte ^[3].

El área de procesamiento y análisis de imágenes digitales posee la ventaja de tener una amplia gama de aplicaciones en diferentes sectores, que involucran desde la academia y la ingeniería hasta la industria y la medicina, donde la obtención de información, a partir de imágenes permite ofrecer soporte a las decisiones con base en modelos de patrones establecidos desde las mismas. Esto implica la realización de pruebas para lograr un procedimiento idóneo que permita caracterizar las imágenes de los tejidos de cuello uterino, para determinar los rasgos que establezcan diferencias en el momento de hacer una clasificación entre normalidad y patología ^[4].

En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación de la técnica de procesamiento y análisis digital de imágenes obtenidas por el método de colposcopia, como recurso para la clasificación de normalidad y patología de los tejidos del cuello uterino.

10.2 METODOLOGÍA

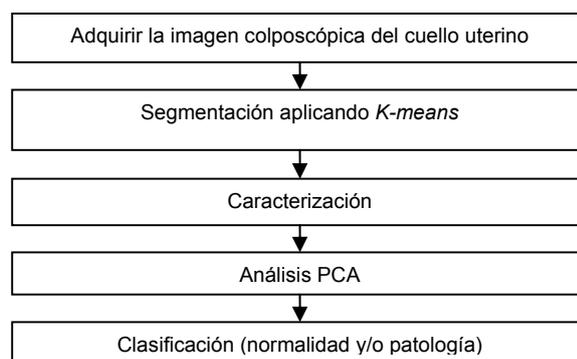


Figura 10-2 Diagrama de flujo de la metodología usada

Es prueba piloto de carácter investigativo – exploratorio presenta la segmentación de las imágenes colposcópicas de cuello uterino usando, el algoritmo *K-means*, que separa la imagen obtenida en 4 *Cluster's*, y luego muestran los resultados de la extracción de las características seleccionadas como relevantes para el análisis, posteriormente, se realiza el Análisis de Componentes Principales (PCA) usando

las matrices de correlación, y así obtener las componentes principales que representarán mejor el conjunto de datos original y por último presenta los resultados de la clasificación de los tejidos en normalidad y patología.

En la primera etapa del proceso mostrado en la figura 10-3, se adquiere la imagen del cuello uterino en formato JPG, esta es redimensionada a un tamaño de 256 filas por 250 columnas, la siguiente etapa de la metodología es la segmentación en donde se obtienen las zonas de importancia por medio de la aplicación del algoritmo de agrupación *K-means*. En el espacio de color cartesiano *Lab*, se obtienen 4 *cluster's* con las diferentes zonas interés en el estudio: fondo, zonas de iluminación no uniforme, tejido de cuello uterino normal y tejido cuello uterino patológico, según el análisis médico. Para este caso en particular, se escogieron automáticamente a través del algoritmo de *K-means* 4 medias, es decir, se agrupan en 4 *cluster's*, los *pixeles* que presentan características similares, ver figura 10-4.

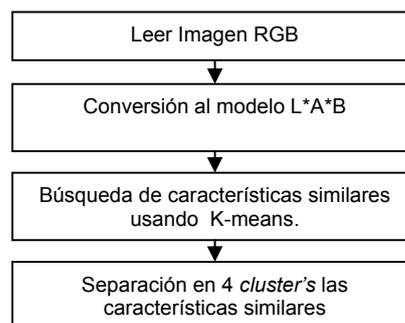


Figura 10-3 Algoritmo utilizado para la segmentación de la zona de transformación

Después de obtener los 4 *cluster's* de cada imagen, se procede a caracterizar cada uno de ellos, para esto se seleccionaron características dentro de las cuales se encuentran la varianza, desviación estándar, media y contraste. Cada una se obtiene por medio de ventanas de 8 filas por 10 columnas que recorren cada *cluster*, siendo guardada cada característica en una matriz individual.

Antes de realizar el análisis por PCA, se obtiene la matriz observaciones/variables, en la cual las filas (observaciones) son cada ventana de 8*10 que recorre cada *cluster* y las columnas (variables) son todas las características extraídas anteriormente. La siguiente fase consiste en la aplicación del análisis de componentes principales (PCA), usando las matrices de correlación aplicadas a la matriz observaciones - variables anteriormente obtenidas, encontrándose los eigen-valores y eigen-vectores correspondientes, y seleccionando los eigen-valores mayores a 1 y su respectivo eigen-vector, porque estos valores explican la mayor varianza del conjunto original. Finalmente se multiplican los eigen-vectores

escogidos, por la matriz observaciones -variables, para poder realizar el análisis de comportamiento de cada componente principal frente a los datos originales.

10.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la segmentación se agrupó en 4 *cluster's*, los *pixeles* que presentaban características similares en la imagen y haciendo uso de la distancia Euclidiana en el algoritmo *K-means*, como distancia de búsqueda, se obtienen 4 centroides con las siguientes posiciones:

Tabla 10-1 Centroides figura 10-4

Centroides	Posición x	Posición y
<i>Cluster 1</i>	177.3731	166.5111
<i>Cluster 2</i>	157.2111	141.1539
<i>Cluster 3</i>	137.8379	134.0579
<i>Cluster 4</i>	164.2141	147.9911

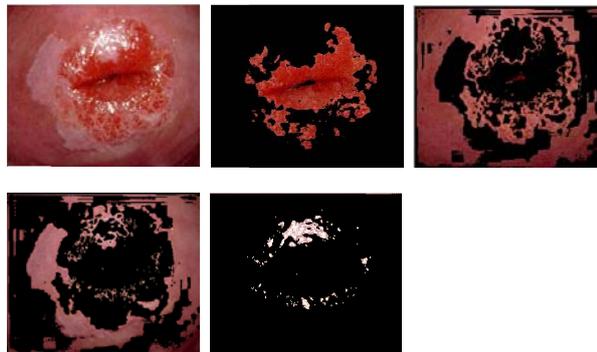


Figura 10-4 Proceso de segmentación. a) Imagen original en RGB. b) Endocervix. c) Tejido normal. d) Tejido patológico. e) Zonas de iluminación no uniforme

En el proceso de segmentación en algunas de las imágenes procesadas, se observó que en el *cluster* en el cual quedaban agrupadas las zonas con iluminación no uniforme, también existían zonas consideradas portadoras de patologías. Esto se debe a que las regiones con falta de compensación de iluminación, afectan en gran medida estas zonas y al momento de hacer la separación en los 4 *cluster's*, la media del *cluster* de iluminación no uniforme se centra en estas regiones, afectando así, la selección óptima de las tonalidades, trayendo consigo pérdida de información. Las imágenes que presentan problemas de iluminación no uniforme se procesaron sin tener en cuenta la información que

no se podía recuperar en condiciones óptimas y por lo tanto estas zonas se excluyeron del análisis aplicado al *cluster*.

Tabla 10-2 Centroides figura 10-5

Centroides	Posición x	Posición y
<i>Cluster 1</i>	171.0042	146.1944
<i>Cluster 2</i>	135.2538	129.4687
<i>Cluster 3</i>	160.2251	138.5710
<i>Cluster 4</i>	177.4163	153.7808

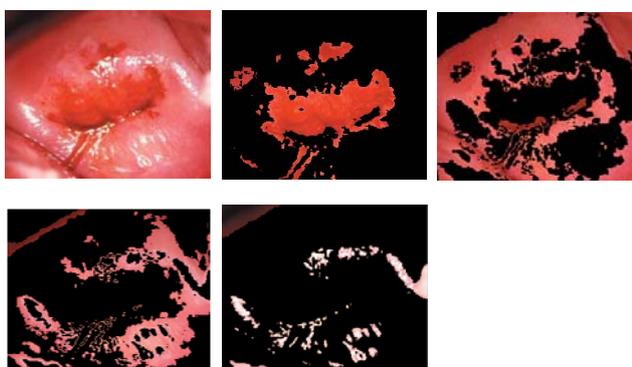


Figura 10-5 Proceso de segmentación. a) Imagen original en RGB. b) Endocervix. c) Tejido Normal. d) Tejido anormal. e) Zonas de iluminación no uniforme. Fuente: Manual para la detección visual de neoplasias cervicales

Para cada *cluster's* segmentado fue aplicado un muestreo por ventanas de 8×10 , en las cuales para cada posición i,j , existía una ventana M , de la cual se extraían las características como medias, desviación estándar, entropía, varianzas y homogeneidad. Estas características sugirieron una separabilidad entre el tejido considerado normal, el tejido considerado patológico, el endocervix y las zonas de iluminación no uniforme. Se observó como las medias más altas, son de las zonas de iluminación no uniformes, debido a que la media de tonalidad tiende a ser cercana a un valor de 255 en escalas de grises, y la más baja, la presentaba el endocervix. Estos resultados permitieron diferenciar entre los *cluster's*, zonas consideradas con patologías y normales. Por otro lado analizando las entropías se observó que las más bajas las presentan las zonas consideradas como patológicas. Estos dos criterios permitieron analizar y etiquetar los 4 *cluster's* segmentados, con el fin que el análisis PCA solo sea realizado a los dos *cluster's* de interés y así ahorrar tiempo computacional y hacer más eficiente el proceso. A continuación se presentan los resultados del etiquetamiento en las figuras 6 y 7 usando los criterios anteriormente expuestos.

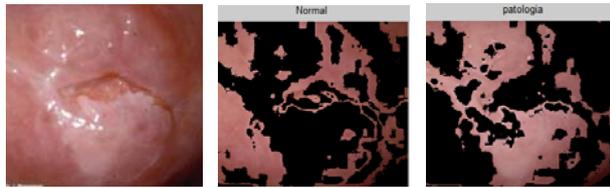


Figura 10-6 Imagen original. *Cluster* etiquetado como Normal. *Cluster* etiquetado como patológico.

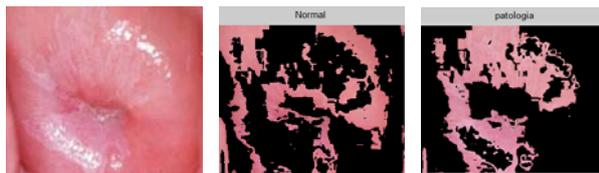


Figura 10-7 Imagen original. *Cluster* etiquetado como Normal. *Cluster* etiquetado como patológico.

El criterio de clasificación usado, fue el promedio de las medias del total de la base de datos, presentando resultados muy satisfactorios en la discriminación de las zonas consideradas como patológicas. Fue escogida esta característica debido a que presentó mayor relevancia visual con respecto a las otras cuatro. En las figuras 10-8, 10-9, 10-10 y 10-11 se presentan algunos de los resultados de la clasificación de las imágenes obtenidas por colposcopia de tejido cuello uterino. La zona seleccionada como patología está marcada con un color naranja:



Figura 10-8 Imagen Original e Imagen clasificada

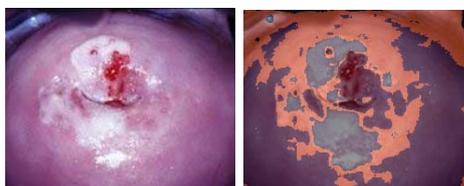


Figura 10-9 Imagen Original e Imagen clasificada

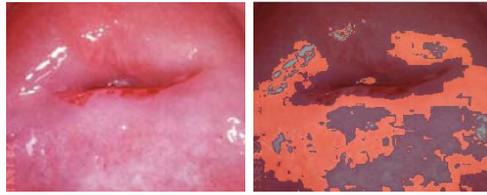


Figura 10-10 Imagen Original e Imagen clasificada



Figura 10-11 Imagen Original e Imagen clasificada

10.4 CONCLUSIONES

El uso de modelos de color distintos del *RGB*, permiten tener una independencia de los dispositivos con los que sean capturadas las imágenes, siendo el modelo *Lab*, una buena herramienta para la segmentación de estas imágenes.

Se comprobó que el algoritmo de agrupación *K-means*, funciona de una manera eficiente, en cuanto al proceso de segmentación de los 4 *cluster's* de interés, siendo este aplicado a la imagen convertida al modelo de color *Lab* con una distancia de búsqueda Euclidiana.

Las condiciones de iluminación en la toma de las imágenes por colposcopia afectan en gran medida el proceso de segmentación, ya que dificultan la extracción de las zonas con alguna patología.

REFERENCIAS

- ¹ C. Pardo, R. Murillo, M. Piñeros y M. A. Castro. Casos nuevos de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. *Revista Colombiana de Cancerología* 7(2003) 4-19.
- ² B. S. Apgar, G. L. Brotzman, M. spitzer. *Colposcopy Principles and Practice an Integrated textbook and Atlas*. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia (2002).
- ³ I. Meza. MD. Colposcopia su importancia actual en el diagnostico de la neoplasia cervical intraepitelial. *Colombia Médica*, 26 (1995)106-13.
- ⁴ Fei Gao. An efficient approach to automated segmentation In medical image analysis. A Thesis In Electrical Engineering Texas Tech University (2005).

CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrolló la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia a través de la implementación de un *hardware* y *software*, que permitieron obtener información espectral de los tejidos biológicos.

Se determinaron características discriminantes a través del procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia, de los tejidos de cuello uterino y mama, que permitieron plantear metodologías para ofrecer soporte en el diagnóstico médico de precánceres.

Se desarrollaron algoritmos computacionales para el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia, con el objeto de ofrecer soporte al diagnóstico médico en vivo, en el manejo de los precánceres de los tejidos de cuello uterino.

Se comprobó a través de la simulación, la evolución de la no enfermedad a la enfermedad de los tejidos biológicos, a través del análisis de los espectros de fluorescencia de las células obtenidas por el modelo celular de Potts. En los casos en donde se presentaron cambios o evoluciones de estados normales, a estados patológicos, se logró representar los cambios en las contribuciones de cada uno de los fluoróforos presentes en el análisis, acercándose a lo expuesto en la literatura.

Se planteó una metodología para el soporte en el diagnóstico médico en vivo de precánceres de cuello uterino, basada en la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia, procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y del procesamiento digital de imágenes de cuello uterino obtenidas por colposcopia.

De acuerdo a los resultados y a la hipótesis planteada, que la fluorescencia, puede identificar cambios bioquímicos de los tejidos, de una forma más precisa y estados más tempranos (lo que no pueden hacer las otras técnicas, que evalúan cambios morfológicos y estructurales que se presentan más tardíamente), el uso de la fluorescencia como método diagnóstico beneficiaría a la paciente en las posibilidades de intervención en fases iniciales.

TRABAJOS CONCLUIDOS

1. Implementación de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia para el diagnóstico de precánceres de cuello uterino.
2. Uso de la técnica EOF para el diagnóstico de precánceres de cuello uterino.
3. Modelo matemático y simulación del espectro de fluorescencia en sistemas biológicos.
4. Correlación de las técnicas EIE y EOF para el diagnóstico de precánceres de cuello uterino.
5. Detección automática de anomalías celulares en muestras de biopsia. (Artículo en revisión, Revista Ingeniería y Ciencia - ISSN 1794-9165).
6. Soporte al diagnóstico médico de precánceres de cuello uterino a través del uso del tratamiento digital de imágenes obtenidas por colposcopia. (Artículo en revisión, Revista Colombiana de Física - ISSN 0120-2650).
7. Estudio de precánceres en biopsias de mama a través de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia. (Artículo en revisión, Revista Colombiana de Física - ISSN 0120-2650).
8. Mathematical model for analyzing the fluorescence emission of biological tissue. (Artículo en revisión, Revista Computer Methods and Programs in Biomedicine – ELSEVIER - ISSN: 0169-2607).

CONTRIBUCIONES

1. Se desarrolló e se implementó la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia.
2. Se desarrollaron diferentes algoritmos, para el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y de las imágenes de los tejidos de cuello uterino.
3. Se logró simular los espectros de fluorescencia que representan la interacción de la radiación electromagnética con tejidos biológicos.
4. Se simuló ordenamiento celular y promoción de estados de normalidad a patología de conjuntos de células biológicas a través del modelo celular de Potts.
5. Se desarrolló y aplicó una metodología para el soporte al diagnóstico médico de precánceres de cuello uterino y mama, basada en la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia.
6. Se planteó una metodología para el soporte en el diagnóstico médico de precánceres de cuello uterino, basada en las técnicas de espectroscopía óptica de fluorescencia, procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia y del procesamiento digital de imágenes de cuello uterino obtenidas por colposcopia.

PROYECCIONES

1. Continuar con el estudio y mejoramiento del modelo matemático utilizado para simular, como herramienta de análisis de los espectros de fluorescencia de tejidos biológicos.
2. Usar la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en otros tipos de tejidos biológicos, como el tejido mamario.
3. Desarrollar a través de un *software* libre los algoritmos computacionales, para el procesamiento digital de la información espectral de fluorescencia, de las imágenes obtenidas por colposcopia y de las imágenes de muestras de biopsia.
4. Realizar nuevas experiencias investigativas, con el objeto de incrementar la relación costo – beneficio, del uso de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia en el soporte en el diagnóstico médico de precánceres.

GRUPOS QUE APOYARON LAS INVESTIGACIONES



Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
•Laboratorio de Magnetismo y Materiales Avanzados
•Grupo de Desarrollo de Nuevos Materiales



Universidad de Caldas, Manizales, Colombia
Facultad de Ciencias básicas
Unidad de Cáncer de Cuello Uterino y Cáncer de Mama



Universidad Autónoma de México, Querétaro, México
Centro de física aplicada y tecnología avanzada - CFATA
Laboratorio de propiedades térmicas y ópticas



Instituto Politécnico Nacional, México DF, México
Centro de investigación y estudios avanzados - CINVESTAV
Laboratorio de espectroscopia óptica



Universidad Autónoma de Manizales
•Grupo de Automática
•Grupo de Investigación Biología molecular y salud - BIMSA