

Universidad de El Salvador  
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática  
Escuela de Física



---

Trabajo de graduación:  
“Caracterización óptica de tejido pre-canceroso  
y canceroso de cuello uterino”

---

Presenta:  
Yancy Patricia Fernández Ramírez

Para optar al grado de:  
Licenciado en Física

Docente director:  
Prof. Dr. Carlos Ernesto Rudamas Flores

Ciudad Universitaria, noviembre de 2014

Aprobación del docente director:

---

Prof. Dr. Carlos Ernesto Rudamas Flores

## AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR:

Ing. Mario Roberto Nieto Lovo

SECRETARIA GENERAL:

Dra. Ana Leticia Zavaleta de Amaya

FISCAL GENERAL:

Lic. Francisco Cruz Letona

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y  
MATEMÁTICA:

M. Sc. Martín Enrique Guerra Cáceres

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE FÍSICA:

M. Sc. Victor Laureano Cortez Lara

Ciudad Universitaria, noviembre de 2014

*Dedicado a mis padres*

# Agradecimientos

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador (CIC-UES), bajo los proyectos:

- **05.31.** Espectroscopia óptica de absorción diferencial (DOAS) para la medición de la contaminación atmosférica en El Salvador.
- **09.19.** Mejora del valor nutritivo de los alimentos de procedencia vegetal mediante micorrización controlada y evaluación de la respuesta micorrícica mediante técnicas de fotoluminiscencia para corregir deficiencias nutricionales en la población salvadoreña.
- **09.20.** Preparación y caracterización de nano-estructuras semiconductoras para aplicaciones fotovoltaicas en El Salvador.

Agradezco a mi asesor Dr. Carlos Rudamas por haber confiado en mi persona y al grupo de investigación GI-RUDAMAS por la colaboración en las mediciones y discusión de resultados. Al Dr. William Hoyos por la donación de muestras de frotis de cérvix para las mediciones y discusión de resultados.

A mis amigas Beatriz Recinos y Fatima Soriano por su amistad, compañerismo, colaboración y apoyo durante todos estos años, a mis amigos Manuel Barrios y William Abarca por su colaboración para la realización de esta investigación y a Evelio Ramírez Miquet por su colaboración y apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

Por último, pero no menos importante a mis padres y hermana que siempre me han brindado su amor, apoyo y ánimos incondicionales para terminar este proceso.

# Índice general

Agradecimientos	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Resumen	1
Introducción	1
Objetivos	3
<b>1. Fundamento teórico</b>	<b>4</b>
1.1. ¿Qué es el cáncer?	4
1.2. Formación de las células cancerosas	5
1.3. ¿Qué es el cáncer de cuello uterino?	5
1.3.1. Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	6
1.4. Componentes moleculares de tejidos	8
1.4.1. Hemoglobina	9
1.5. Interacción de la luz con la materia	12
1.5.1. Absorción	14
1.5.2. Reflectividad	15
1.6. Antecedentes	16
<b>2. Metodología</b>	<b>20</b>
2.1. Tipos de muestra	20
2.2. Obtención de la muestras	21
2.2.1. Obtención de muestras de frotis de cérvix	21
2.2.2. Obtención de muestras de biopsia de cuello uterino	22

2.3.	Fijación y conservación de la muestra . . . . .	23
2.4.	Montaje experimental . . . . .	24
2.4.1.	Equipo . . . . .	24
2.5.	Técnicas experimentales . . . . .	26
2.5.1.	Espectroscopia de absorción . . . . .	27
2.5.2.	Espectroscopia de Reflectividad . . . . .	28
<b>3.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>30</b>
3.1.	Absorción en frotis de cuello uterino . . . . .	30
3.2.	Absorción en tejo de cuello uterino . . . . .	36
3.3.	Reflectividad en frotis de cuello uterino . . . . .	39
3.4.	Reflectividad en tejo de cuello uterino . . . . .	41
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>44</b>
4.1.	Conclusiones . . . . .	44
4.2.	Recomendaciones . . . . .	45
	<b>Bibliografía</b>	<b>46</b>
	<b>Anexos</b>	<b>49</b>

# Índice de figuras

1.	Número de egresos de cáncer en la población de mujeres en El Salvador . . . . .	2
1.1.	La posición del cuello uterino en el cuerpo de la mujer . . . . .	6
1.2.	Tipos de células en que está compuesto el cuello uterino . . . . .	7
1.3.	Imágenes microscópicas de un tejido cervical normal, NIC I, NIC II y NIC III . . . . .	7
1.4.	Vista del cuello uterino a través de la vagina y donde se observa la evolución de la displasia , NIC I, NIC II y NIC III . . . . .	8
1.5.	Espectros de los principales componentes moleculares . . . . .	10
1.6.	Espectro de absorción de la hemoglobina . . . . .	12
1.7.	Número de egresos de cáncer en la población de mujeres en El Salvador . . . . .	13
1.8.	Esquema que muestra el proceso de absorción . . . . .	13
1.9.	Diagrama de Perrin-Jablonski . . . . .	14
1.10.	Sistema de dos niveles de energía . . . . .	15
1.11.	Esquema que muestra el proceso de reflectividad . . . . .	16
1.12.	Resultados de estudio dirigido por Rebecca Richards-Kurtum . . . . .	18
1.13.	Resultados de estudios realizados por V. Chang y colaboradores . . . . .	19
2.1.	Representación de la forma correcta de tomar las muestras . . . . .	22
2.2.	Biopsia de cuello uterino . . . . .	23
2.3.	Fibra óptica . . . . .	25
2.4.	Imagen del espectrógrafo USB4000 . . . . .	26
2.5.	Esquema del montaje experimental para las medidas de absorción . . . . .	27
2.6.	Pasos para el procedimiento de la toma del espectro de absorción . . . . .	28



2.7.	Esquema del montaje experimental para las medidas de reflectividad . . . . .	29
2.8.	Pasos para el procedimiento de la toma del espectro de reflectividad . . . . .	29
3.1.	Espectro de absorción de frotis de cuello uterino pre-canceroso	31
3.2.	Diferencias entre espectro de absorción de frotis de cuello uterino	32
3.3.	Máximos de absorción de frotis de cuello uterino pre-canceroso y normal . . . . .	33
3.4.	Deconvolución gauseana para frotis de cuello uterino . . . . .	34
3.5.	Diferencias entre los sitios de tejido de cuello uterino . . . . .	35
3.6.	Espectro de absorción de tejido canceroso de cuello uterino . . . . .	36
3.7.	Comparación de espectros absorción entre tejido canceroso y frotis de pre-cancer de cuello uterino . . . . .	37
3.8.	Deconvolución gauseana de tejido canceroso de cuello uterino . . . . .	38
3.9.	Espectro de reflectividad de frotis de cuello uterino . . . . .	39
3.10.	Espectro de reflectividad de frotis de cuello uterino para diferentes sitios . . . . .	40
3.11.	Espectro de reflectividad de tejido de cuello uterino . . . . .	42
3.12.	Comparación de los espectros de reflectividad de tejido de cuello uterino con respecto a uno de frotis de pre-cáncer . . . . .	43
A.	Espectro de emisión de la lámpara de deuterio . . . . .	49
B.	Espectro de emisión . . . . .	50
C.	Datos de lámpara de Tungsteno . . . . .	51
D.	Datos del espectrógrafo de USB 4000 . . . . .	52

# Índice de tablas

1.1. Constantes de la hemoglobina y sus derivados. . . . .	11
1.2. Resultados obtenidos para cada muestra, se muestran los valores de correlación del ajuste matemático en el caso de espectroscopía y la desviación estándar $\sigma$ obtenida en las mediciones por microscopía. . . . .	19

## Resumen

Durante el desarrollo de esta investigación se obtuvieron espectros característicos de frotis de tejido humano extraído del cuello uterino de pacientes con diferentes niveles de neoplasia intra-epitelial (NIC I, NIC II y NIC III). Esto se llevó a cabo utilizando técnicas de espectroscopia óptica de absorción y reflectividad.

La investigación consistió en la optimización del proceso de medición de cada técnica de espectroscopia absorción y reflectividad, el estudio se realizó en la ventana espectral que comprende las longitudes de onda de 430 nm a 650 nm. La resolución espectral del montaje experimental es de aproximadamente 1.5 nm.

Los espectros obtenidos de absorción y reflectividad revelan diferencias entre muestras con diferentes niveles de neoplasia. Una mayor absorción de hemoglobina se obtuvo en los niveles NIC II. También se observó una menor reflectancia en las muestras pre-cancerosas, hecho que está en concordancia con lo reportado por otros autores [1].

En los espectros de absorción los máximos se asocian a las bandas hemoglobina, debido a que se observó que uno de los biomarcadores más importante en este estudio es la hemoglobina siendo así un indicador directo para encontrar diferencias entre los niveles pre-cancerosos de cuello uterino [2].

También se observó que las hemoglobinas que juegan un papel importante son la oxihemoglobina y deoxihemoglobina, con más presencia la oxihemoglobina debido al proceso de angiogénesis que se va desarrollando a media que aumenta la gravedad de la lesión de cáncer en el tejido [3].

# Introducción

El cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de mortalidad en las mujeres a nivel mundial. Aunque se ha demostrado que esta enfermedad es totalmente prevenible y curable, con bajos costos y riesgos, cuando se cuenta con métodos para tamizaje en mujeres asintomáticas, junto con un diagnóstico, tratamiento y seguimiento apropiados. No obstante, los programas de prevención en América Latina y el Caribe han tenido poco o ningún impacto manteniendo las tasas de incidencia y mortalidad altas en la región [4].

La tasa de mortalidad debido a cáncer de cuello uterino en el mundo es de 45.6/100.000 mujeres donde El Salvador tiene uno de los más altos de cáncer de cuello uterino con 23.5/100.000 mujeres según el (Globocan 2008, IARC 2010).

La red de establecimientos del Ministerio de Salud reportó en el sistema de morbi-mortalidad (SIMMOW), en el año 2010 un total de 6,804 egresos por cáncer, de los cuales el 10.8 % fueron defunciones. El cáncer de cuello uterino reportó para ese mismo año 808 egresos siendo el tipo más registrado[5]. En la figura 1 se presentan los tipos más frecuentes de cáncer registrados en la población de mujeres en El Salvador.

Las investigaciones en el área de física aplicada a medicina se han visto estimuladas por la posibilidad de usar métodos ópticos para caracterizar tejido canceroso. Es por esto que nuestro principal objetivo en esta investigación es obtener patrones espectrales de frotis y tejido de cuello uterino utilizando espectroscopia óptica y lograr así caracterizar las diferencias que existen entre tejido cervical sano y canceroso, para su posible utilización en la detección temprana de cáncer de cuello uterino.

## CÁNCER EN LA POBLACIÓN DE MUJERES

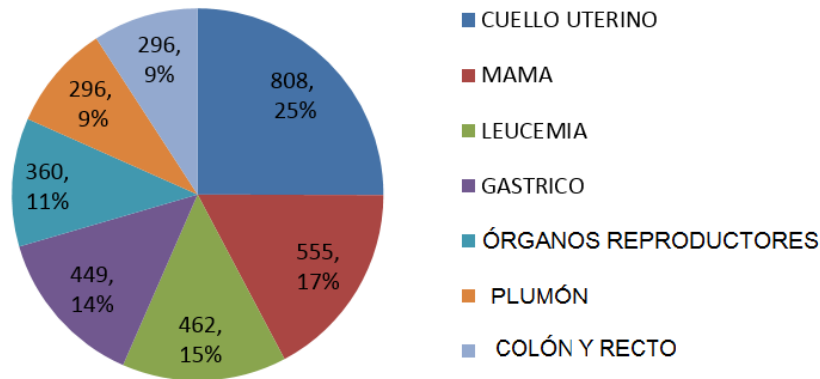


Figura 1: La gráfica representa el número de egresos de cáncer en El Salvador para el año 2011. Datos tomados de [5].

La capacidad de cuantificar los cambios fisiológicos y morfológicos en el cuello uterino no sólo es importante en el diagnóstico de lesiones cancerosas de cérvix, también es importante para crear un sistema de detección temprana y rentable. De esta forma se pretende dar el primer paso para realizar una caracterización de tejidos cancerosos de cuello uterino y así lograr obtener información y clasificación por medio de espectroscopia de óptica e implementar estrategias que estén científicamente aprobadas para la reducción y control de la enfermedad. Dichas estrategias estarán destinadas para una detección temprana y no invasiva en las pacientes con costos relativamente bajos en comparación de otras técnicas que son muy costosas y sobre todo invasoras y dolorosas para las pacientes.

Esta investigación se ha dividido en cuatro capítulos, Marco teórico, Metodología, Resultados y discusión, Conclusiones y recomendaciones siguiendo las partes que estipula el “Normativo de trabajos de graduación de la facultad de ciencias naturales y matemáticas”. Cada capítulo se ha elaborado como lo sugieren Sampieri *et al.* en su libro de “Metodología de investigación” [6].

# Objetivos

## Objetivo General

- Obtener patrones espectrales de tejido humano de cuello uterino utilizando técnicas de espectroscopia óptica para su posible utilización en la detección temprana de cáncer.

## Objetivos específicos

- Optimizar las técnicas espectroscópicas de absorción y reflectividad.
- Medir espectros de absorción y reflectividad en muestras de tejido pre-canceroso, canceroso y sano de tejido cervical.
- Analizar las diferencias que pueden existir entre tejido pre- canceroso, canceroso y sano de tejido cervical.

# Capítulo 1

## Fundamento teórico

En el presente capítulo se describen conceptos y definiciones sobre el cáncer de cuello uterino. También se describe la interacción de la radiación con la materia, donde se describe el principio físico de las técnicas experimentales que se utilizarán para esta investigación.

### 1.1. ¿Qué es el cáncer?

El cáncer no es una sola enfermedad: es el nombre de una variedad de por lo menos cien enfermedades muy distintas entre sí que surge de mal funcionamiento biológico de las células. Las células enfermas proliferan sin control y alteran la organización de tejido [7].

El cuerpo está conformado por millones de células vivas estas se pueden definir como la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. La célula es el elemento de menor tamaño que puede considerarse vivo. Las células normales del cuerpo se dividen y mueren de manera ordenada. El crecimiento de las células cancerosas es diferente al crecimiento de las células normales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. Además, las células cancerosas pueden invadir otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El crecimiento sin control y la invasión de otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa [8].

## 1.2. Formación de las células cancerosas

Las células se transforman en células cancerosas debido a una alteración en el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades. En una célula normal, cuando el ADN se afecta, la célula repara el daño o muere. Por el contrario, en las células cancerosas el ADN dañado no se repara, y la célula no muere como debería. En lugar de esto, la célula continúa produciendo nuevas células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo ADN alterado que tuvo la primera célula [9].

## 1.3. ¿Qué es el cáncer de cuello uterino?

El cáncer cervical es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precancerosas de lenta y progresiva evolución, que pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada o severa [10].

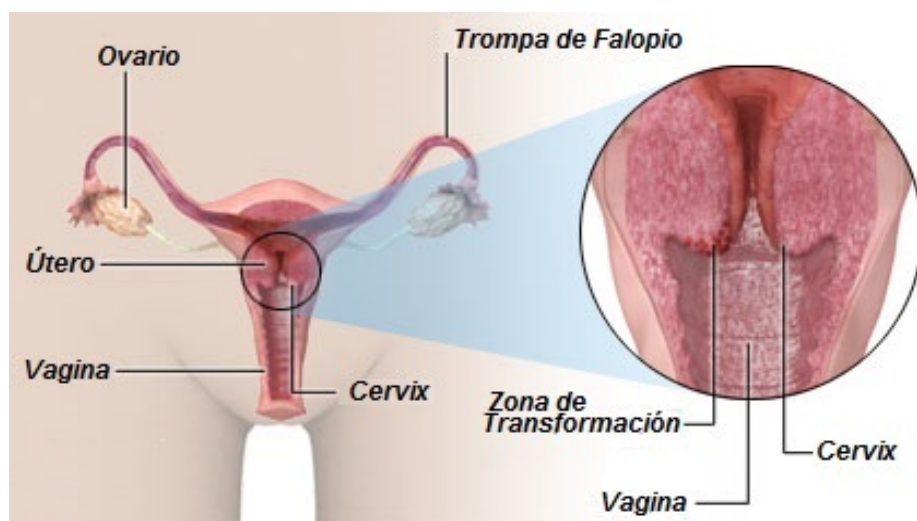
El cuello uterino, está compuesto por un cilindro de tejido fibromuscular separado del cuerpo uterino por el orificio cervical interno, el cuello uterino se proyecta en la vagina con una porción supravaginal superior y una porción vaginal inferior.

El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina, en la mujer adulta el cuello uterino mide un promedio 3.5 cm de longitud con un diámetro de aproximadamente de 2.5 mm. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérnix y la parte próxima a la vagina es el exocérnix. El endocérnix está recubierto de epitelio columnar (glandular) que consta de una sola capa de células cilíndricas mucosecretoras y el exocérnix está recubierto de epitelio estratificado no queratinizante (escamosas) en continuidad con el epitelio vaginal y se une con el epitelio de profundidad columnar en la denominada unión escamocolumnar o escamocilíndrica [11]. En la figura 1.1 se muestra la posición del cuello uterino en el cuerpo de la mujer.

El lugar donde estos dos tipos de células se unen se llama zona de transformación, donde se origina la mayoría de los cánceres de cuello uterino. En



la figura 1.2 se muestran los dos tipos de células que conforman el cuello uterino. Estas células no se tornan en cáncer de repente, sino a través de un cambio gradual en el que las células normales del cuello uterino se transforman en lesiones pre-cancerosas que si no se tratan a tiempo se convierten en cáncer. Los médicos usan varios términos para describir estos cambios pre-cancerosos, incluyendo neoplasia intraepitelial cervical (NIC).



*Figura 1.1: El esquema donde se muestra la posición del cuello uterino y la zona de transformación*

### **1.3.1. Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)**

La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) es el crecimiento de células anormales en el revestimiento del cuello uterino y aunque no es un estado canceroso es la antesala a uno si no se trata adecuadamente. Hay tres etapas según su extensión y gravedad: NIC I, NIC II y NIC III. Estas etapas se definen de acuerdo van aparecen los cambios en las células: leve, moderado y alto [12].

El NIC I: muestra alteración de las células del tercio inferior del epitelio y se correlaciona con lesiones citológicas de bajo grado; el NIC II: muestra alteración de las células de los tercios inferior y medio del epitelio y el NIC III:

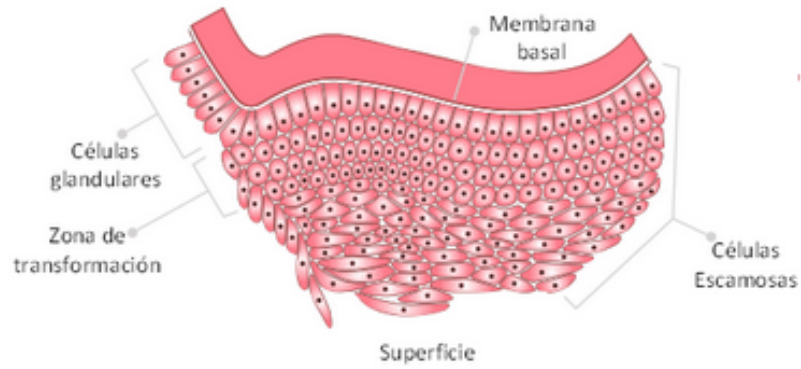
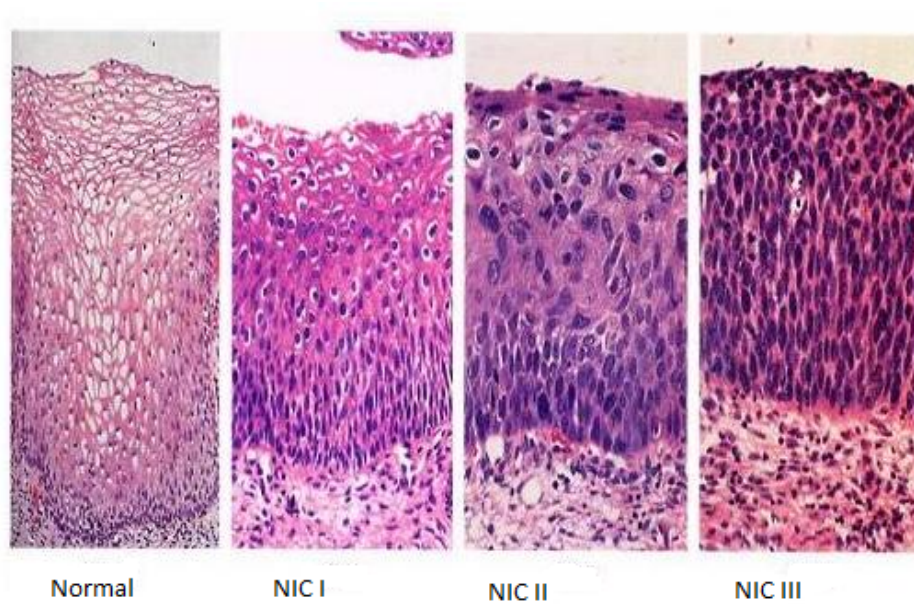


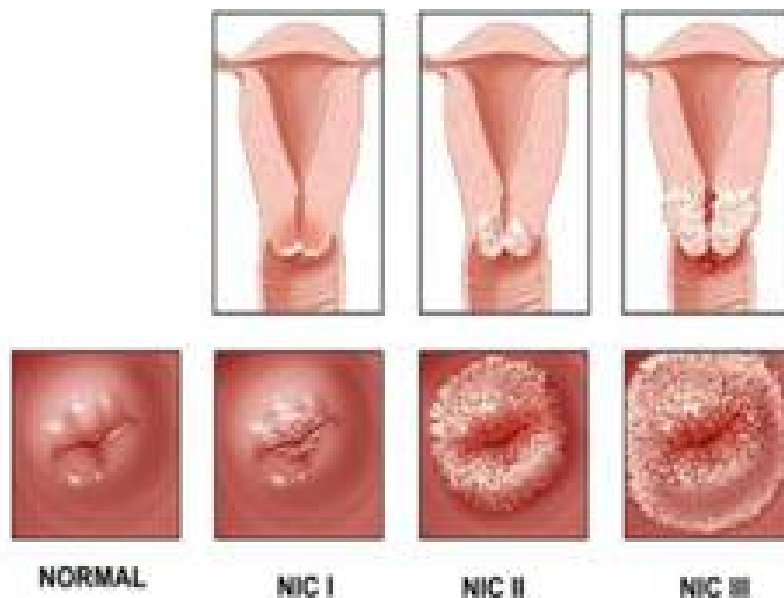
Figura 1.2: En la imagen se puede observar la forma que tiene los dos tipos de células en que está compuesto el cuello uterino. Imagen tomada y modificada de



Talaat S Tadros MD, Emory University School of

Figura 1.3: Imágenes microscópicas de un tejido cervical normal, NIC I, NIC II y NIC III respectivamente.

comprende aquellas lesiones que afectan todo el espesor del epitelio, estas dos últimas se correlacionan con lesiones citológicas de alto grado. Véase la figura 1.4



*Figura 1.4: Vista del cuello uterino a través de la vagina y donde se observa la evolución de la displasia , NIC I, NIC II y NIC III.*

## 1.4. Componentes moleculares de tejidos

Los tejidos biológicos cuando se consideran material óptico llegan a comportarse como organismos turbios y no poseen superficies planas, estructuras cristalinas o un índice de refracción simple.

Los tejidos tienen una variedad de moléculas que habitualmente son de un tamaño menor que la longitud de onda de la luz visible y tiene patrones

geométricos rígidos y repetitivos de un punto a otro de su ambiente, pero por encima de esta escala, hay otras unidades celulares, con escasos patrones de regularidad en su distribución estas unidades celulares si pueden ser de un tamaño próximo a las longitudes de onda de la luz.

Cuando irradiamos estructuras como los tejidos en estos se producen fenómenos como la absorción y dispersión, que en la siguiente sección se explicara con detalle. Estos fenómenos, dependen de las longitudes de onda de la radiación así como del tamaño de las partículas del tejido, pero todo esto también depende de factores adicionales como la presencia de determinados elementos o cromóforos que son los que actúan como una especie de receptores, como la melanina, la hemoglobina y la mioglobina [13].

En la figura 1.5 podemos observar las principales moléculas responsables de la absorción de la luz en los tejidos. Las contribuciones que las moléculas dan en la absorción son muy importantes para poder identificar señales de peligros o advertencias tempranas en los tejidos, pero el que mayor contribución ofrece es la molécula de la hemoglobina.

La hemoglobina es esencialmente constante en los rangos clínicamente relevantes de los tejidos, incluso varios grupos de investigación y fabricantes de instrumentos han desarrollado instrumentos de análisis para determinar la oxigenación del tejido y encontrar información pertinentes para cambios clínicos.

### **1.4.1. Hemoglobina**

La hemoglobina es un conjunto de proteínas globulares, que se encuentran presentes en altas concentraciones en los hematíes, que fijan oxígeno en los pulmones y luego lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de  $\text{CO}_2$  [15].

La vinculación del oxígeno y la hemoglobina no depende solo de la presión del oxígeno, también depende de factores intracelulares ligados que modifican directa e indirectamente las propiedades funcionales y las características espectrales [16].

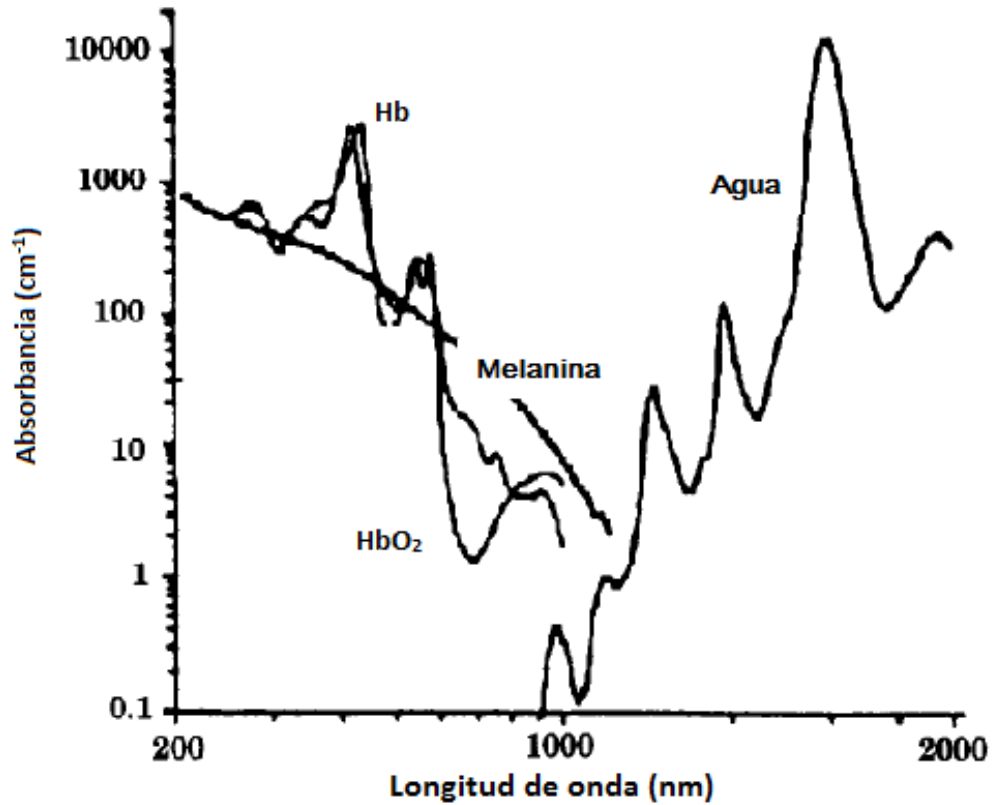


Figura 1.5: Espectros de los principales componentes moleculares responsables de la absorción, donde la absorción de tejido es pequeña en comparación con la dispersión. Tomado de [14].

En la figura 1.6 se observa los espectros de extinción de las hemoglobinas más comunes y que en nuestro estudio fueron las de mayor importancia la hemoglobina oxigena o oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) y la dioxihemoglobina que es la que no esta combinada con  $\text{O}_2$  (Hb).

En la siguiente tabla 1.1 se detalla los máximos y mínimos de la hemoglobina y sus diferentes tipos, como lo reporta W. G. Zijlstra [18].

Tipo	Longitud de onda (nm)
Hb (doxyhemoglobina)	
Min	476
Max	554
HbO2 (oxyhemoglobina)	
Min	508
Max	530
Max	542
Min	560
Max	576
Max	578
HbCO Carboxyhemoglobina	
Min	496
Max	538
Max	540
Min	554
Max	568
Max	670
Hi Metaheglobina	
Min	470
Max	500
Max	632

*Tabla 1.1: Constantes de la hemoglobina y sus derivados.*

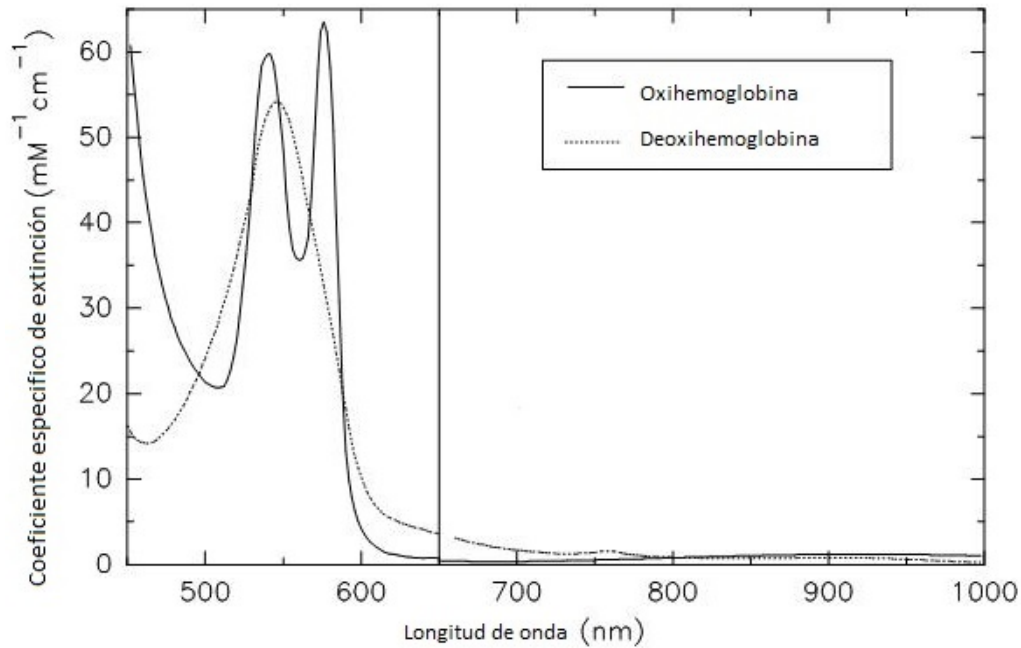


Figura 1.6: Espectros del coeficiente de extinción específico de la hemoglobina en sus formas más comunes, la Oxihemoglobina con sus máximos en 532 nm y 572 nm y la deoxyhemoglobina con un pico máximo en 547 nm. Como lo muestra M. Cope en su tesis doctoral [17].

## 1.5. Interacción de la luz con la materia

La interacción de la luz con la materia causa varios fenómenos entre ellos la absorción: que es la relación entre la intensidad de luz incidente con la intensidad de luz transmitida ver figura 1.7; la fotoluminiscencia: que es la emisión de luz cuando hay una recombinación en los estados electrónicos; y la dispersión: que puede ser de dos tipos – la dispersión Mie, que surge cuando la longitud de onda dispersada es aproximadamente igual al diámetro de las moléculas y la dispersión Rayleigh, que surge cuando la longitud de onda dispersada es mucho mayor que el diámetro de las moléculas, y por último la dispersión Raman que son las longitudes de onda dispersadas es igual que la incidente [19]. Véase la figura 1.8.

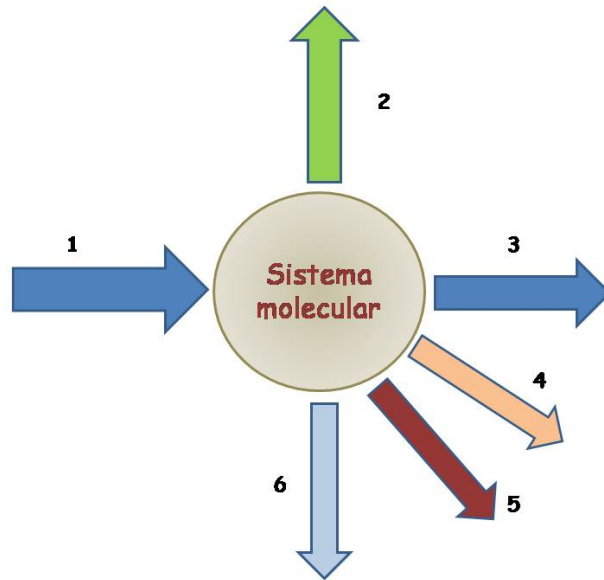


Figura 1.7: Interacción de la radiación con la materia. **1** Luz incidente  $I_0$  y  $\lambda_0$ , **2** Fotoluminiscencia  $\lambda > \lambda_0$ , **3** luz Transmitida  $I$ , **4** dispersión Mie  $\lambda' \approx D$ , **5** dispersión Rayleigh  $\lambda' \gg D$ , **6** dispersión Raman  $\lambda' = D$ .  $D$ : Molécula/diámetro de partículas. Figura tomada de [20].

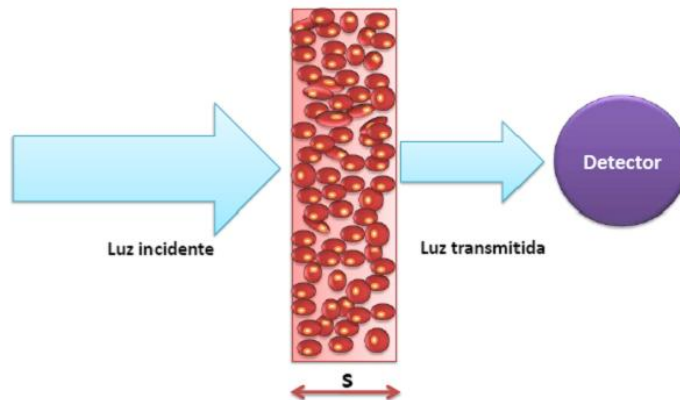


Figura 1.8: La absorción es la relación entre la intensidad de la luz incidente con la intensidad de la luz transmitida en un sistema biológico.



### 1.5.1. Absorción

Los niveles de energía de las moléculas en un modelo semiclásico son obtenidos por la solución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo, donde la radiación electromagnética es tratada clásicamente.

$$\hat{H}\psi_n = E_n\psi_n \quad (1.1)$$

Para tener una idea clara de este fenómeno, se hace incidir luz sobre un sistema molecular, éste podría absorber ciertas longitudes de onda necesarias para pasar de un estado electrónico de menor energía a uno mayor lo que conocemos como transición electrónica [21]. Véase la figura 1.9.

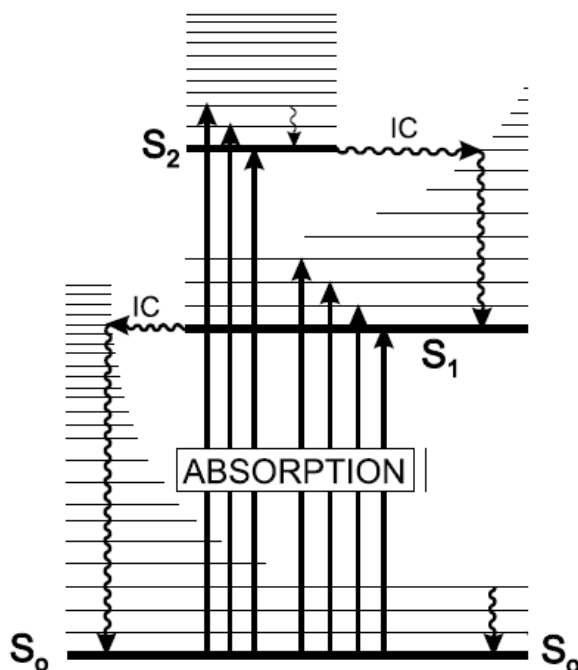


Figura 1.9: Diagrama de Perrin-Jablonski, donde se ilustra la posición relativa de la absorción.  $S_0$ ;  $S_1$ ;  $S_2$  : estados electrónicos singlet, IC: conversión interna. Las líneas menos intensas que están entre los estados electrónicos representan estados vibracionales, entre los estados vibracionales hay estados rotacionales. Figura tomada y modificada de [21].

Para que el fenómeno de la absorción se de en un sistema, la radiación electromagnética tiene que cumplir con la condición de Bohr  $E_1 - E_0 = h\nu_{10}$  [22] donde una transición electrónica es el "salto" que da un electrón de una molécula que se encuentra en un estado electrónico  $E_0$  a otro estado electrónico  $E_1$  ( $E_0 < E_1$ ). y se da mediante la absorción de fotones. Véase la figura 1.10.

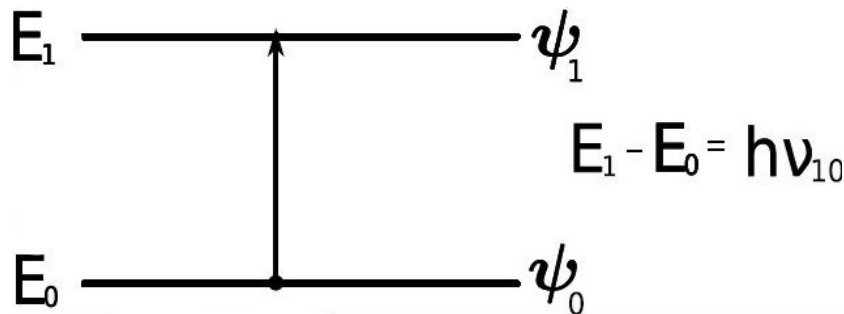


Figura 1.10: Esquema representa un sistema de dos niveles de energía. Imagen tomada de [20].

### 1.5.2. Reflectividad

Reflectancia es el estudio de la luz como una función de longitud de onda que se reflejada o dispersada por un sistema. En general la radiación se reenvía en todas direcciones, es decir, de forma difusa. A la parte que sale remitida con un ángulo igual al incidente, se la denomina radiación especular o regular. Cuando se habla de la reflexión difusa, se debe especificar si se incluye la parte especular. Véase la figura 1.11.

Hay que recordar que el flujo radiante se refiere a la totalidad de la energía incidente, que la irradiancia se refiere al flujo incidente sobre un punto de una superficie y que la radiancia se refiere al flujo reenviado desde un punto en una dirección.

La radiancia de una superficie opaca depende obviamente de la irradiancia de la luz incidente, como ésta pocas veces es uniforme al iluminar la superficie, la radiancia varía según la posición es decir, muchas superficies no emiten la

luz de manera uniforme en todas las direcciones como ocurre con las superficies con texturas, cuya radiancia varía según el ángulo desde el que se observa.

La reflexión es difusa cuando la radiancia espectral reenviada es igual en todos los ángulos de reflexión y es independiente de la dirección de la que provenga la radiación incidente. Es una circunstancia ideal no realizable en la práctica [23].

La espectroscopia óptica de reflectividad es una técnica cuantitativa y no invasiva que podrá ser utilizada rutinariamente para determinar *in vivo* los parámetros morfológicos y ser así una posible alternativa para la detección temprana y efectiva de cáncer. La aplicación de la espectroscopia nos muestra las delimitaciones de las fronteras entre tejido normales y malignos [3].

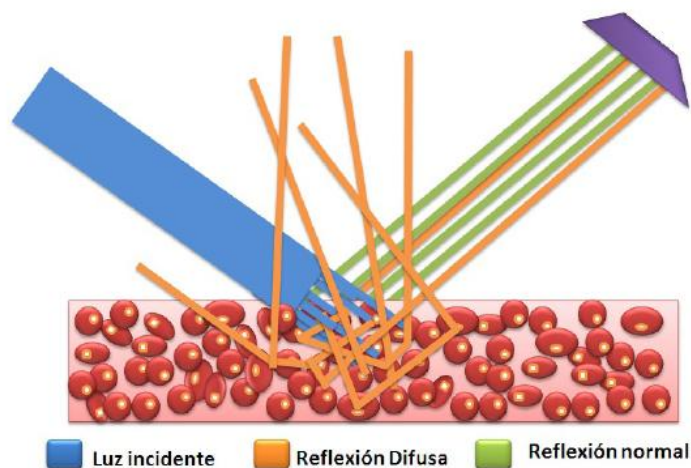


Figura 1.11: Interacción de la radiación con el tejido se observa el proceso de reflexión normal y difusa

## 1.6. Antecedentes

La aplicación de la espectroscopia para la detección temprana de cáncer es desarrollada en varias partes del mundo.

En la actualidad existen muchas investigaciones que utilizan técnicas de espectroscopia óptica para la caracterización de tejido canceroso de una manera no invasiva. Una de las técnicas más utilizadas es la reflectancia difusa para la determinación de propiedades de tejido que estén relacionados con la absorción y la dispersión de luz del tejido. Estas propiedades de la luz a través del tejido pueden determinar potencialmente cambios morfológicos.

Investigaciones dirigidas por Rebecca Richards-Kortum en la universidad de Texas en Austin, realizan estudios de reflectancia difusa en muestras de tejido cervical.

A partir del procesamiento de los espectros de emisión de la reflectancia difusa se obtuvieron resultados que indicaban la existencia de valles en las longitudes de onda de 410-430 nm y 530-590 nm. Estos resultados se atribuyeron a la absorción de hemoglobina. Al realizar una comparación de estos valles entre las muestras, se observó que el de tejido NIC II mostraban una distintiva separación con lo cual se puede distinguir entre al menos dos grados de neoplasia (entre NIC II y NIC III). Además se encontró que existe una dependencia de la inclinación de los espectros con respecto a la longitud de onda siendo estas características las principales a tomar en cuenta para la clasificación de tejidos cervical [3]. Véase sus resultados en la figura 1.12.

En otro estudio realizado por Sung K. Chang y su grupo de investigación del Hospital General de Massachusetts, utilizaron espectroscopia óptica de reflexión y de fluorescencia como métodos de detección de neoplasia cervical de una manera no invasiva. Ellos estudiaron espectros de fluorescencia y de reflexión, para discriminar tejido canceroso y tejido histológicamente normal, además de poder identificar que características de los espectros poseen información significativa para el diagnóstico. Para la toma de medidas de espectros tanto de fluorescencia y de reflexión utilizaron una lámpara de espectro continuo de xenón. Los resultados de la investigación fueron la obtención de valles, atribuidos a la absorción de la hemoglobina, en las longitudes de onda de 420 nm, 542 nm y 577 nm. Además observaron que la intensidad de la reflexión disminuía en los espectros de muestras de tejido anormal con respecto a la intensidad de los espectros de tejido normal. También para espectros de fluorescencia se identificaron diversos máximos como por ejemplo 350 nm al NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide), otro máximo a 525 nm

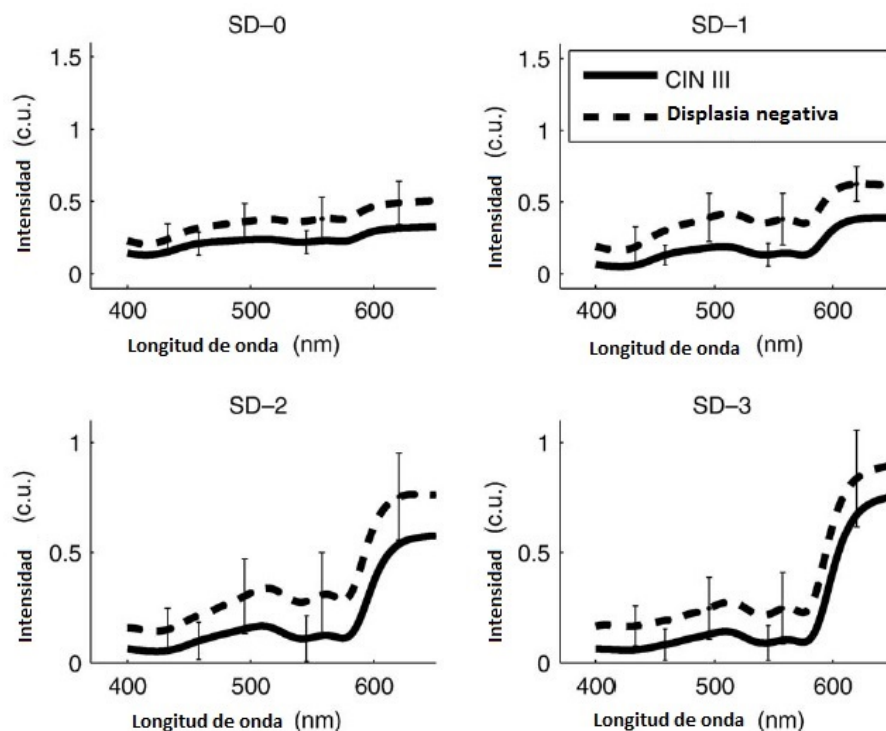


Figura 1.12: Resultados de reflectancia de estudio dirigido por Rebecca Richards-Kurtum.

se le atribuía al cofactor FAD (flavin adenine dinucleotide).

Los algoritmos basados exclusivamente en espectros de fluorescencia rindieron mejor desempeño de diagnóstico que los que se basaron únicamente en espectros de reflectancia. La combinación de fluorescencia y reflectancia no mejoró significativamente el desempeño de la fluorescencia, excepto en el caso de diferenciar pre-cánceres de alto grado de tejido columnar normal. En general, los espectros de emisión de fluorescencia a excitaciones de 330 - 360 nm y 460- 470 nm proveyeron el mejor rendimiento durante el diagnóstico para categorizar los tejidos [1].

Estudios del Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de Duke desarrollaron técnicas de espectroscopía de reflectancia difusa para identificar contrastes en biomarcadores ópticos que varían con los diferentes grados

de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) respecto a los tejidos normales [2]. Véase sus principales resultados en figura 1.13.

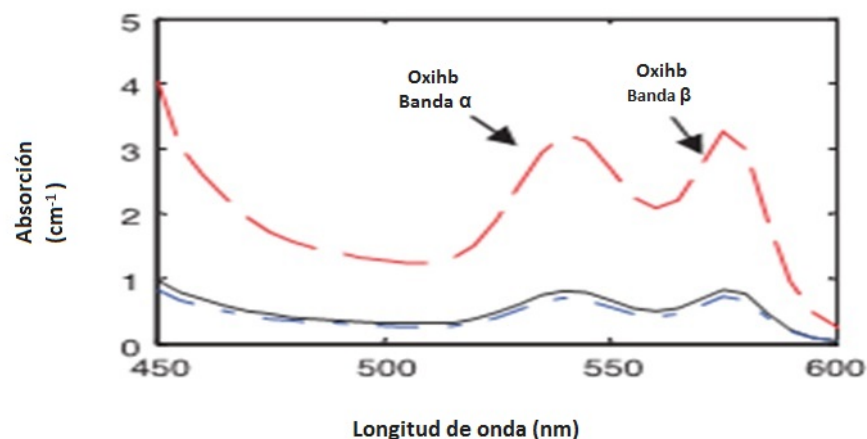


Figura 1.13: La figura muestra el espectro de un sitio normal (línea azul), un sitio de NIC I (línea negra) y un CIN II (línea roja) del mismo paciente. La absorción es significativamente mayor en CIN II en comparación con tejidos normales del cérvix y la NIC I.

En nuestro país el Miguel Pleitez determinó los tamaños de núcleos celulares en cortes de tejido canceroso de cuello uterino utilizando espectroscopía óptica de reflectividad [24], sus resultados son presentados en la siguiente tabla 1.1.

	Espectroscopía dp ( $\mu\text{m}$ ), $R^2$	Microscopía (284 núcleos) dp ( $\mu\text{m}$ ), $\sigma$
M1	7.39, 0.8	
M2	7.34, 0.9	7.40.4 $\mu\text{m}$ , 2.0
M3	7.33, 0.8	

Tabla 1.2: Resultados obtenidos para cada muestra, se muestran los valores de correlación del ajuste matemático en el caso de espectroscopía y la desviación estándar  $\sigma$  obtenida en las mediciones por microscopía.

# Capítulo 2

## Metodología

En esta investigación se usarán muestras de frotis de cuello uterino y tumores extirpados de pacientes con lesiones pre-cancerosas y cancerosas. En este capítulo se describe el tipo de muestras y como son preparadas. Se detallara el equipo a utilizar y las características que estos tiene, y por último se describirá el montaje experimental de cada una de las técnicas que se utilizaron.

### 2.1. Tipos de muestra

Para nuestra investigación se utilizaron dos tipos de muestras, frotis de cuello uterino y tumores extirpados por medio de biopsias a pacientes con sospechas de cáncer.

Los frotis de cuello uterino son obtenidos por citologías o raspados vaginales, los pasos para la obtención se detallan en el siguiente apartado. Cabe mencionar que las muestras de son proporcionadas por el Dr. William Hoyos de la Universidad "Dr. José Matías Delgado".

Las muestras de tumores son cortes aproximados a 10  $\mu\text{m}$  de espesor y 7 mm de diámetro, provenientes de un tumor canceroso extirpado de de cuello uterino de una paciente a la cual se le practicó biopsia. Estos cortes fueron proporcionados por el Dr. P. Espinoza del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

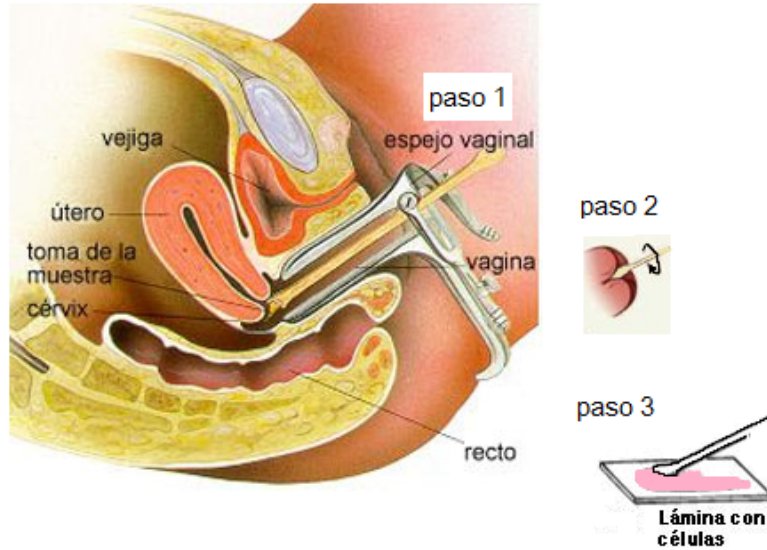
## 2.2. Obtención de la muestras

### 2.2.1. Obtención de muestras de frotis de cérvix

Las muestras se obtienen de exámenes ginecólogos al realizar citologías convencionales y biopsias que son los métodos que existen en la actualidad para un diagnóstico de lesiones o cáncer de cuello uterino y los pasos para la obtención de las muestras son las siguientes:

1. No realizar tacto vaginal antes de la obtención de muestra
2. Introducir el espéculo vaginal, el cual puede facilitarse con agua de ser necesario.
3. Si se detecta presencia de sangrado o flujo antes de la toma de muestra, se procederá a limpiar cuidadosamente los fondos de saco con una torunda de algodón sin tocar el cuello uterino.
4. Para la muestra del exocérvix y de la zona de transformación endocervical introducir la espátula de Ayre dirigiendo su extremo más largo a través del orificio exocervical y recoger las células girando  $360^\circ$ , teniendo siempre el cuidado de no producir sangrado.
5. Inmediatamente obtenida la muestra extenderla sobre la lámina porta objetos debidamente rotulada. Realizar el extendido en forma uniforme, formando una capa delgada sin grumos (Véase la figura 2.1).
6. Para los casos que se evidencie la zona de transformación endocervical por fuera del orificio externo, el procedimiento de toma de muestra o raspado se realiza directamente de esta zona, no siendo necesaria la introducción de la espátula por el orificio.
7. Para aquellos casos de pacientes post menopáusica de pacientes con conización quirúrgica previa, las muestras se pueden obtener del endocérvix introduciendo 1.5 cm el cito-cepillo en el canal endocervical y girar suavemente tan sólo 180 para evitar el sangrado [25].





*Figura 2.1: Representación de la forma correcta de tomar la muestra, el giro de la espátula y la ubicación de la muestra en el porta objetos.*

### 2.2.2. Obtención de muestras de biopsia de cuello uterino

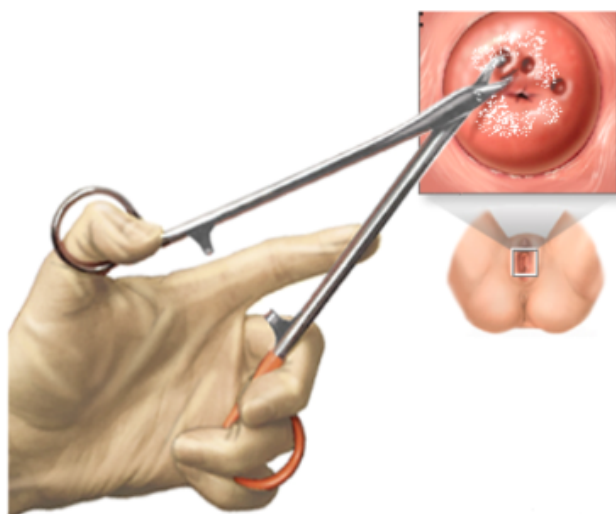
La biopsia cervical son dirigidas colposcópicamente y consiste en la obtención de una muestra de tejido de cuello uterino, donde la colposcopia es un método que se utiliza para observar los cambios que está sufriendo el tejido cervical mediante la visualización del cuello uterino.

La colposcopia se realiza mediante la colocación de un espéculo luego se procede a una limpieza del mismo con solución salina normal, el cual permite un mejor estudio de los vasos sanguíneos, inmediatamente se coloca ácido acético al 4 o al 5% que 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 [13].

La biopsia debe necesariamente ser selectiva, y se debe emplear fundamen-

talmente para la confirmación histopatológica de una citología y/o una colposcopia anormal.

Para realizar la biopsia se localiza tejido dañado mediante la colposcopia y con una pinza thisler o similares y se procede a la toma la muestra. Véase la figura 2.2.



*Figura 2.2: Biopsia de cuello uterino, tomado con una pinza thisler para obtener pequeñas muestras de tejido.*

### **2.3. Fijación y conservación de la muestra**

Las muestras tanto de frotis adquiridas por medio de citologías como los cortes de tejido mediante de biopsia, luego de ser extraídas por cualquiera de los métodos convencionales son colocadas en portaobjetos con su respectivo protector y colocadas como se hace rutinariamente, para lograr un mejor conservación primero se fija de inmediatamente el material de una forma extendida y luego se sumerge totalmente la lámina en el frasco de vidrio conteniendo alcohol corriente al 96 % durante un tiempo de contacto mínimo de 30 min.

Evitar el contacto entre extendidos. El alcohol debe ser preparado para cada día. Ordenar las láminas consecutivamente. Dejar secar las muestras al ambiente. Las láminas con las muestras de frotis de cuello uterino ya fijadas, no requieren condiciones de conservación controladas, solo protegerlas del polvo.

## 2.4. Montaje experimental

Como ya se desarrollo en el capítulo I, para poder estudiar un sistema molecular (en nuestro caso tejido de cuello uterino), necesitamos hacer incidir luz a una superficie del tejido en estudio y dependiendo de que técnica espectroscópica se realice este nos puede dar cierta información. Anteriormente se indicó que en nuestro estudio utilizamos dos técnicas la de absorción y reflectividad.

### 2.4.1. Equipo

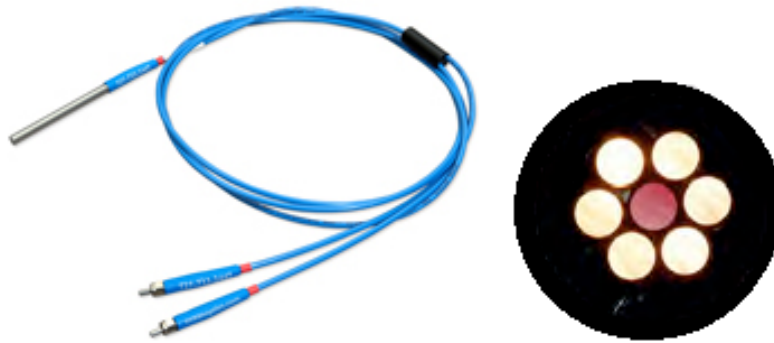
**Fuente de Luz:** La fuente de luz que se utilizó en nuestro experimento dependió de que técnica se desarrollo, para nuestras nuestras medidas utilizamos lámparas con emisión en el ultravioleta/visible y con espectros continuos, se utilizó lampara de deuterio y tungsteno.

**Lámpara de Deuterio:** Se utilizo para las medidas de absorción, esta lampara consta de una emisión continua se encuentra entre los 185 y 900 nm, y sus líneas de Balmer son para  $D\alpha$  656 nm y  $D\beta$  486 nm. Véase la figura en el anexo A para ver su espectro de emisión.

**Lámpara de tungsteno:** su emisión continua se encuentra entre 350 a 900nm. Véase el espectro de emisión de la lámpara de tungteno en el anexo B.

**Fibra Óptica:** Las fibras óptica transporta los fotones que fueron dispersados por el tejido después de hacerle incidir luz, hacia el espectrógrafo, el rango de transmisión de las fibras ópticas está entre 200 nm y 950 nm.

Para las mediciones de reflectividad se utilizó una fibra modelo R400-7-UV/VIS OceanOptics. Esta sonda cuenta con siete fibras ópticas de cuarzo (bundle) una para iluminar el sistema molecular (tejido de cuello uterino) y seis para capturar los fotones dispersados el mismo. El diámetro de cada fibra óptica es de  $200\ \mu\text{m}$ . [26]. Véase la figura 2.3.



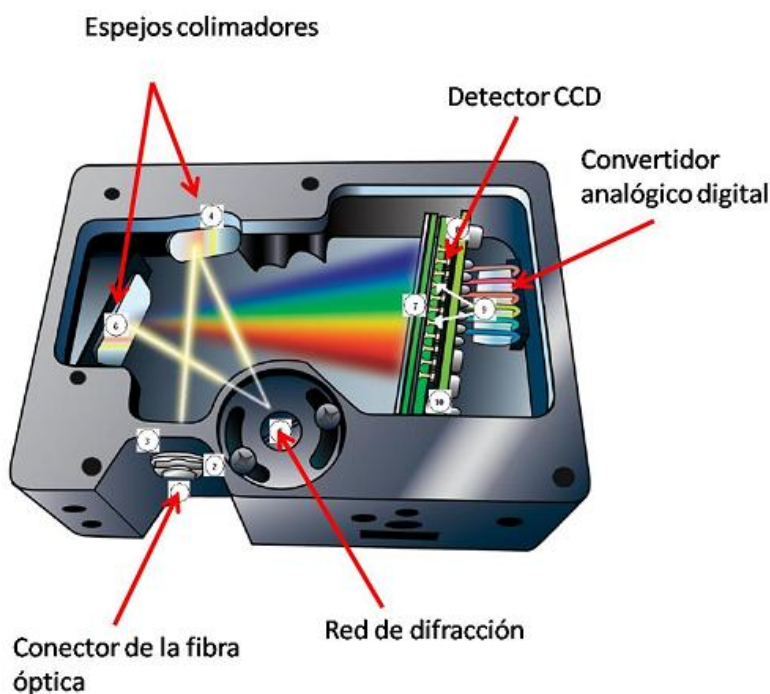
*Figura 2.3: Fibra óptica modelo R400-7-UV/VIS de la empresa Ocean Optics y vista frontal de la punta de está. Imagen tomada de [26]*

**Computadora:** Este elemento del sistema es utilizado para la configuración del funcionamiento del espectrógrafo, registro, procesamiento y análisis de los espectros enviados por el espectrógrafo. Para la configuración del espectrógrafo y registro de los espectros se utilizó el software SpectraSuite.

**Espectrógrafo:** Este separa un haz de luz por medio de la dispersión en diferentes longitudes de onda que lo componen, para luego realizar un conteo de la cantidad de fotones capturados por cada longitud de onda, dicha medición se realiza con un dispositivo fotosensible, como por ejemplo un arreglo de CCD. Después de realizada la medición, el espectro obtenido es enviado a la computadora para su análisis.

El espectrógrafo utilizado en esta investigación para las medidas de absorción y reflectividad es de la firma Ocean Optics modelo USB400. Éste tiene una configuración Czerny-Turner con una distancia focal de 42 mm de entrada (input) y 68 mm de salida (output). Con una red de difracción plana de mayor eficiencia en los 300 y 400 nm, una apertura de  $50\ \mu\text{m}$  y con una

resolución espectral aproximadamente de 1.5 nm en el rango de 200 a 859 nm. También consta de una lente cilíndrica plana convexa que se utiliza para reducir la imagen al tamaño de la apertura del detector. El detector opera a temperatura ambiente y tiene una CCD lineal marca Toshiba modelo TCD130AP de silicio con 3648 fotodiodos [27]. Véase la figura 2.4



*Figura 2.4: Esquema del montaje experimental utilizado para las medidas de reflectividad; L1 y L2: Lentes; M: Porta-muestra y muestra, FO: fibra óptica. Imagen tomada de [27]*

## 2.5. Técnicas experimentales

Para nuestro estudio utilizamos espectroscopia de absorción y reflectividad. Dichas técnicas experimentales son descritas a continuación.

### 2.5.1. Espectroscopia de absorción

Para poder medir espectros de absorción, es necesario utilizar un montaje experimental como se muestra en la figura 2.5

Para elaborar el montaje experimental se siguen los siguientes pasos:

1. Ubicación de una lámpara de espectro continuo (lámpara de deuterio).
2. Hacer una arreglo de lentes convergentes de cuarzo, para llevar la mayor cantidad de luz a un punto donde este la muestra.
3. La luz es transmitida por el porta objetos y pasa por una fibra óptica.
4. Después de la fibra óptica, la luz pasa por un espectrógrafo que tiene una configuración de Czerny-Turner [27] y tiene un detector CCD (charge-coupled device) de 3648 pixel que pasa a un convertidor analógico-digital, luego pasa la señal a una computadora por medio de un conector USB.

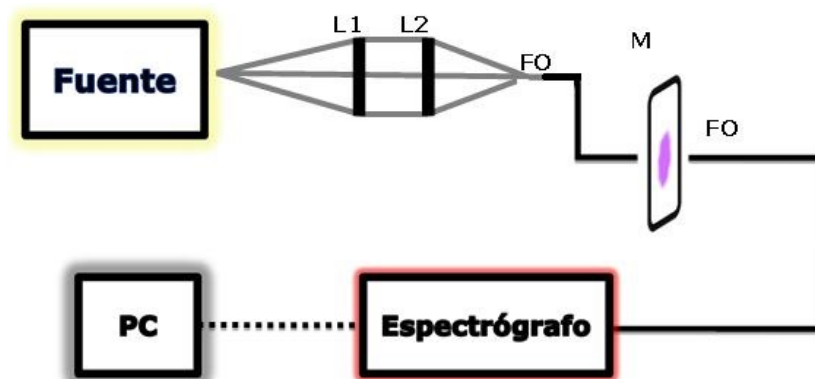


Figura 2.5: Esquema del montaje experimental para las medidas de absorción. L1 y L2: Lentes; M: Porta- muestra y muestra, FO: fibra óptica.

#### Procedimiento de la toma del espectro de absorción:

Se realizaron los siguientes pasos para tomar las medidas de reflectividad utilizando el programa SpectraSuite [28].

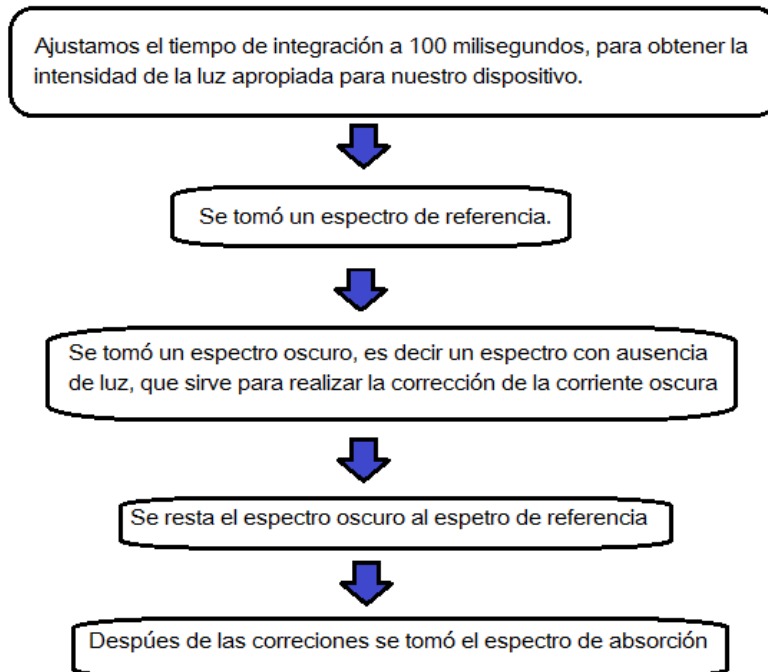


Figura 2.6: Pasos para el procedimiento de la toma del espectro de absorción.

### 2.5.2. Espectroscopia de Reflectividad

Para medir reflectividad es necesario excitar la muestra con una lámpara de espectro continuo. En este caso se utilizó una lámpara de tungsteno para hacer incidir luz al sistema molecular (tejido de cuello uterino). El montaje experimental sigue siendo similar al montaje experimental de absorción, con la diferencia que la colección de luz se hará usando backscattering (Véase figura 2.7) siempre utilizando una fibra óptica 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno.

**Procedimiento de la toma del espectro de reflectividad** Se realizaron los siguientes pasos para tomar las medidas de absorción utilizando el programa SpectraSuite [28].

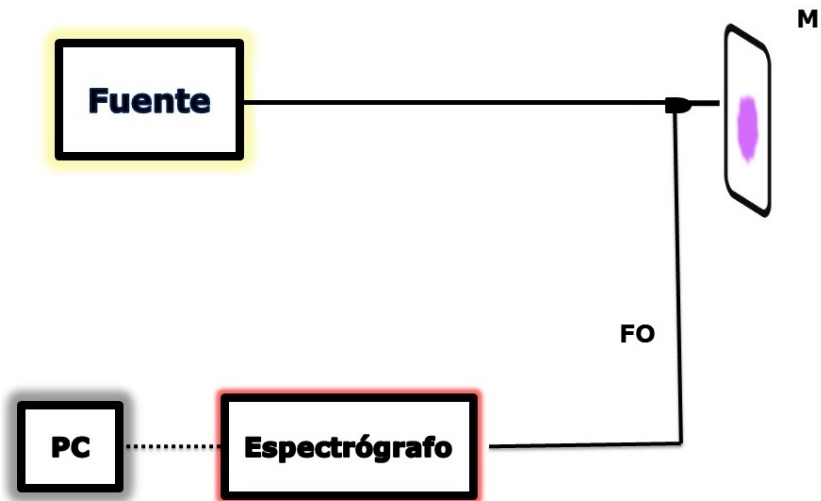


Figura 2.7: Esquema del montaje experimental utilizado para las medidas de reflectividad; M: Porta-muestra y muestra, FO: fibra óptica. La luz no está enfocada

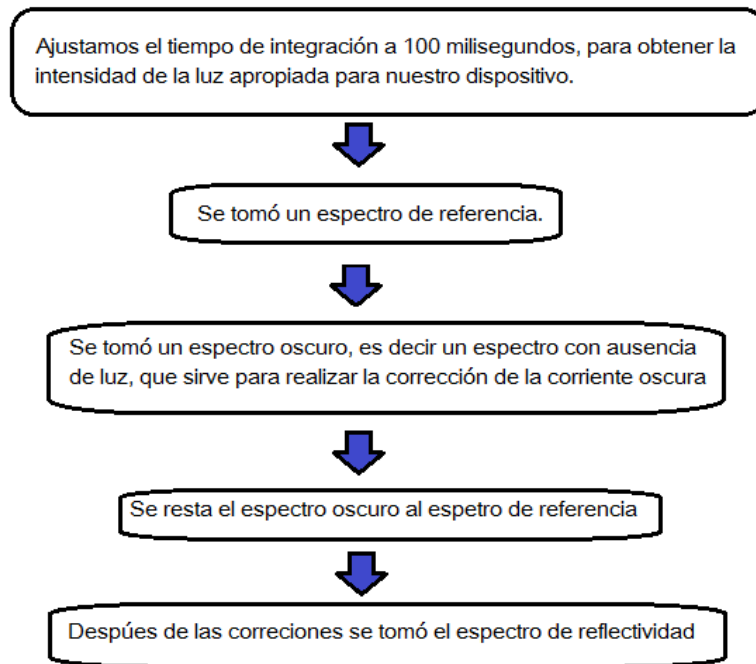


Figura 2.8: Pasos para el procedimiento de la toma del espectro de reflectividad.



# Capítulo 3

## Resultados y discusión

En este trabajo se presentan resultados obtenidos de muestras de frotis de pre-cáncer de cuello uterino con diferentes niveles de neoplasia y cortes de un tumor extirpado de biopsia de cuello uterino. También se mostraran resultados de tejidos sanos de cuello uterino y las diferencias que existen en sus espectros de absorción y reflectividad.

### 3.1. Absorción en frotis de cuello uterino

En la figura 3.1 se muestra un espectro obtenido de frotis de cuello uterino por medio de la técnica de absorción, en una ventana espectral de 350 a 800 nm de longitud de onda.

El espectro de absorción de frotis de cuello uterino tiene como característica dos máximos muy bien formados en 532 nm y 600 nm, máximos que se pueden asociar a las bandas de absorción de la hemoglobina como se observan en la figura 1.6.

Las longitudes de onda en las que nos enfocaremos en nuestro análisis será de 400 nm a 650 nm y debido a que la molécula de la hemoglobina tiene mayor absorción en las longitudes menores a 600 nm está será un indicador importante en nuestro estudio. La hemoglobina se utiliza a menudo como un indicador del suministro de oxígeno suficiente para evaluar la susceptibilidad de lesiones y daño en los tejidos [29].

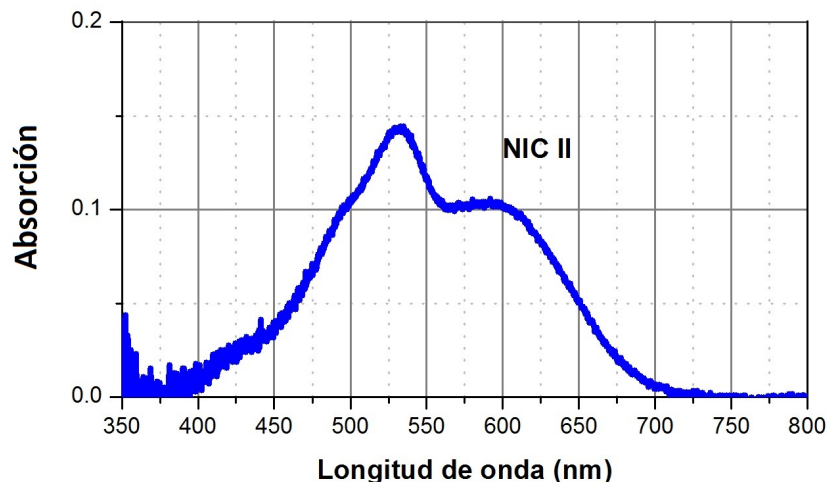
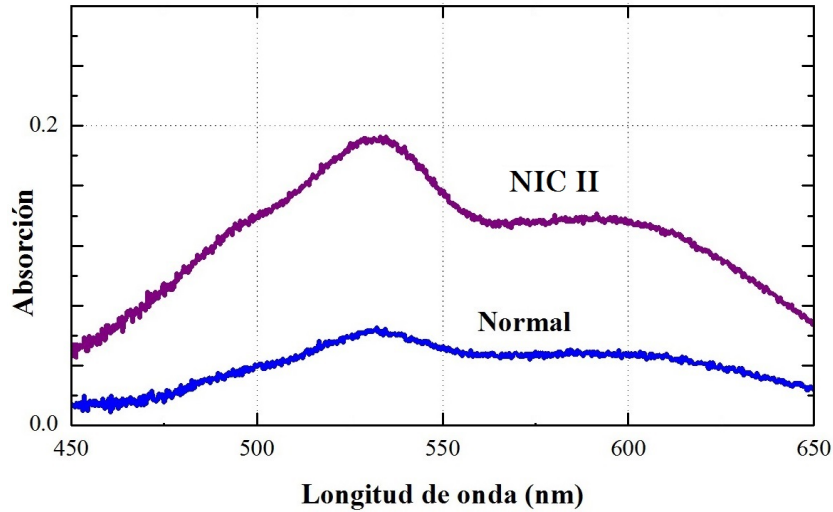


Figura 3.1: Espectro de absorción de frotis de cuello uterino pre-canceroso

En la figura 3.2 se muestran dos espectros de frotis de cuello uterino, en el se observa la diferencia que hay entre un tejido con displasia y uno normal, en una ventana espectral de 450 nm a 650 nm. Ambos espectros presentan la misma forma y siempre prevalecen sus máximos en las longitudes de onda 532 nm y 600 nm, estos máximos se asocian a los picos  $\alpha$  y  $\beta$  de la oxihemoglobina, así como lo reportan V. Chang *et al* [2]. Otra diferencia que se presenta es el nivel de absorción, se puede observar que el frotis con un nivel de displasia en este caso NIC II presenta mayor absorción con respecto al frotis normal, el frotis tipo NIC II absorbe 0.14 más que el frotis normal en la longitud de onda de 532 nm.

En la figura 3.3 observamos tres espectros dos con nivel de displasia y uno de frotis normal los tres espectros se encuentran en una ventana espectral de 450 nm a 650 nm. El frotis con NIC III absorbe a 0.33 en al longitud de onda de 532 nm donde se encuentra el máximo absoluto, el frotis con NIC II absorbe en esa misma longitud 0,19 y el frotis normal 0.04. Estas diferencias de absorción entre los tipos de niveles de displasia y los frotis normales se mantuvo, indicando que una de las principales característica es que entre mayor es el nivel de pre-cáncer mayor es su absorción. Esto nos puede sugerir el nivel de hemoglobina que se encuentra en los diferentes tipos de frotis pues como an-



*Figura 3.2: Espectros de absorción de frotis de cuello uterino pre-canceroso y normal, en una ventana espectral de 450-625nm*

tes mencionamos la hemoglobina es un indicador de la oxigenación del tejido.

Para saber que otros tipos de hemoglobina participan o no en nuestros resultados, analizamos nuestros espectros de absorción realizando deconvoluciones gaussianas a cada uno de los espectros, para ello utilizamos los máximos de la hemoglobina y sus diferentes tipos, detallados en la tabla 1.1.

En figura 3.4 observamos la deconvolución de espectros de frotis de cuello uterino de una muestra normal y una con displasia intracervical NIC II. En ambos se ha desarrollado la deconvolución y se pueden observar las contribuciones de los tipos de hemoglobina, los máximos obtenidos de cada espectro en la deconvolución son 430 nm, 532 nm, 574 nm, 596 nm asociado a la oxihemoglobina y 495 nm, 596 nm 645 nm, 700 nm asociados a la deoxihemoglobina.

En la figura 3.5 se muestran espectros de frotis de cuello uterino de varios tipos: normales y con niveles de displasia cervical, podemos observar que siempre existen diferencias entre ellos, donde los espectros de frotis con displasia absorben mucho más a medida aumenta su grado de displasia y así notándose diferencias con los frotis de tejido cervical normal, sin embargo en entre el espectro del sitio normal (color anaranjado) y el espectro de NIC

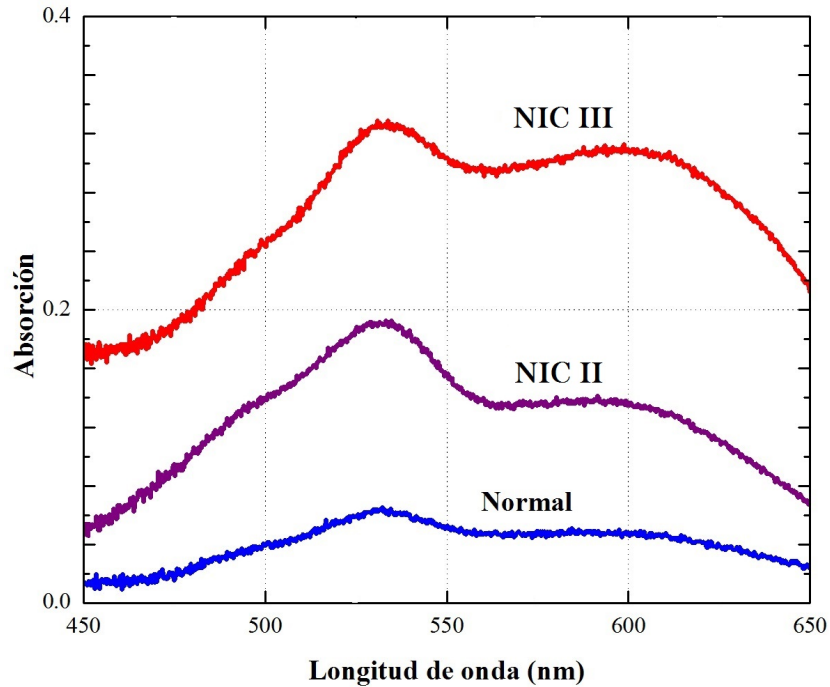


Figura 3.3: Espectros de absorción de frotis de cuello uterino pre-canceroso y normal. Se observan máximos en 530nm y 600nm

II (color azul) vemos que no existen diferencias significativas, esto puede suceder debido a que la deoxihemolobina no presenta diferencias entre las NIC II y otros tipos de tejido, debido a que la mayor parte de los aumentos de la hemoglobina total solo se atribuyen al aumento de la oxihemoglobina [2].

En tejido normal, la oxigenación es un flujo equilibrado espacial y temporalmente homeostático determinado por una entrega y consumo regional de oxígeno. En tumores experimentales de rápido crecimiento, es evidente un incremento más rápido en la población de las células tumorales que consumen el oxígeno sobre la expansión de suministro de oxígeno micro vascular. Como consecuencia se tiene la hipoxia de tejido que es resultado de la insuficiencia de difusión del oxígeno, o de insuficiente perfusión [30].

Por lo que las muestras de frotis con NIC II y NIC III absorban muy mucho más que las normales.

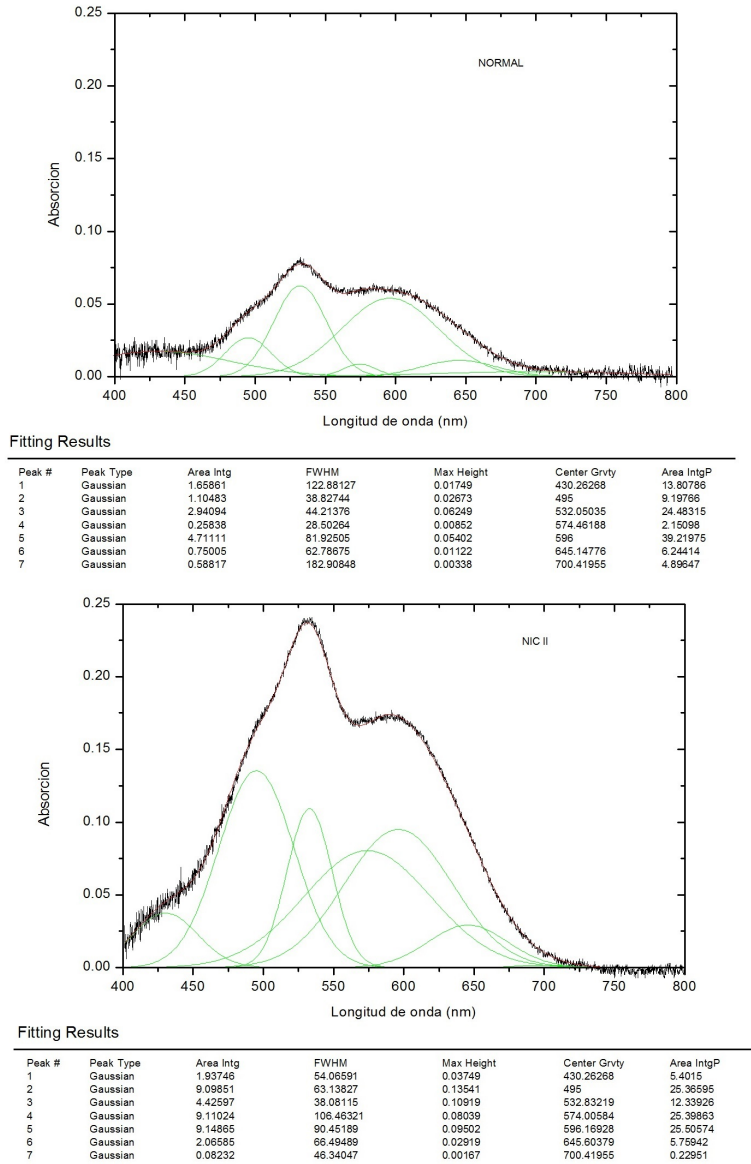
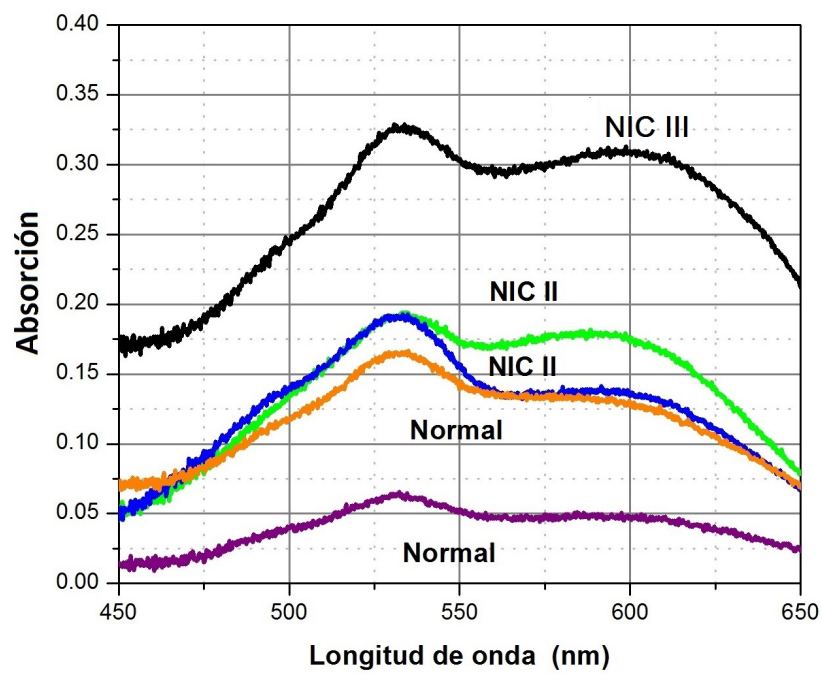


Figura 3.4: Gráficas donde se muestran los espectros de absorción de frotis de cuello uterino a) sitio normal, b) sitio con NIC II, en ambos espectros se muestran los máximos obtenidos de la deconvolución gaussiana, máximo en 532 nm asociado a la Oxihemoglobina. La línea roja representa el resultado de hacer deconvolución gaussiana

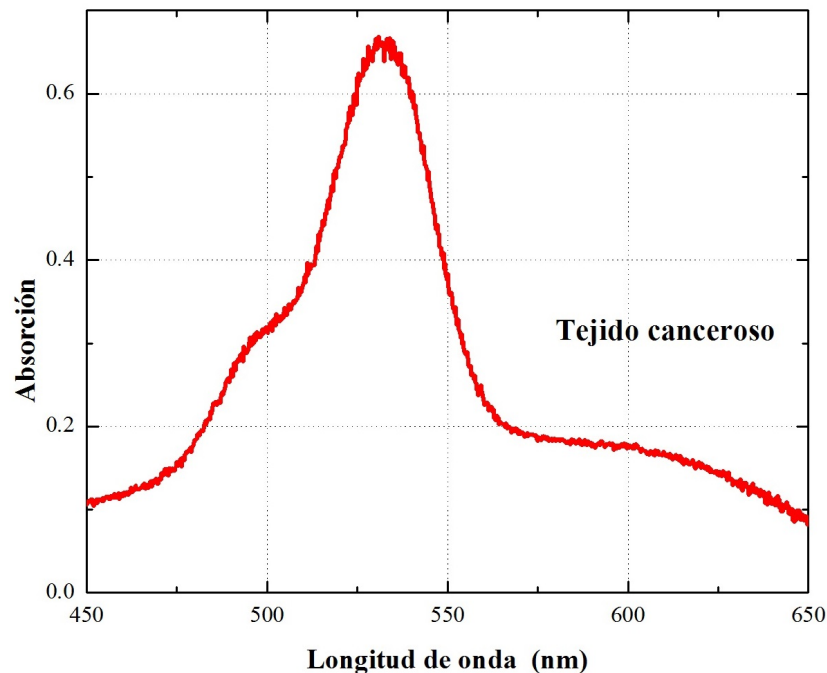


*Figura 3.5: Espectros de absorción de frotis de cuello uterino donde se observan diferencias significativas entre un tejido normal y NIC III*

## 3.2. Absorción en tejido de cuello uterino

Los tumores sólidos son asociados con la disminución de tensión de oxígeno debido al incremento de demanda de oxígeno debido a células cancerígenas metabólicamente activas en combinación con deficiencias en la perfusión causada por un micro vascular desordenado e ineficiente creado durante la angiogénesis [31].

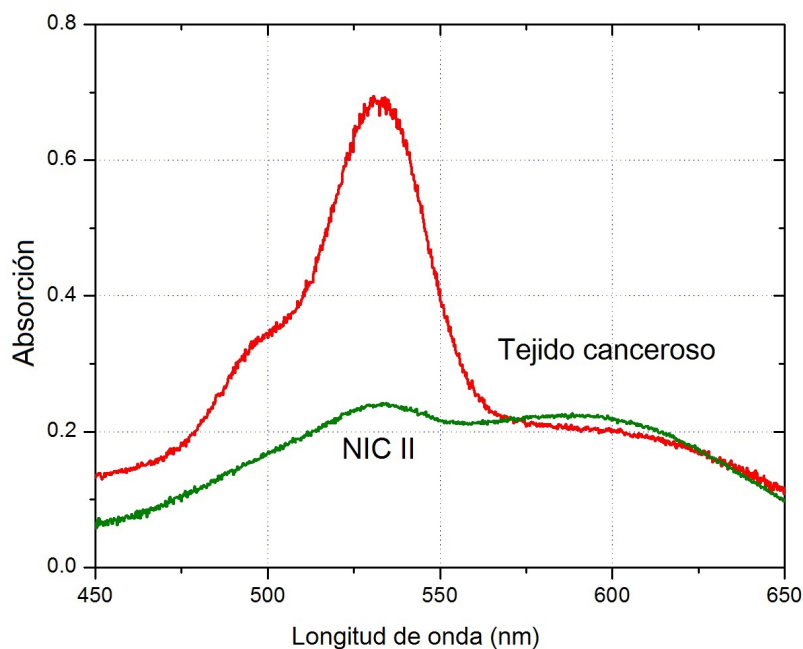
En la figura 3.6 se observa la absorción de tejido canceroso de cuello uterino proveniente de un tumor canceroso extirpado a una paciente a la cual se le practicó biopsia.



*Figura 3.6: Espectro de absorción de tejido canceroso de cuello uterino en una ventana espectral desde 450 nm a 650 nm. Podemos observar una leve diferencia de la forma del espectro con respecto a los espectros de frotis pre-cancerosos. El máximo en esta gráfica se encuentra en 532 nm*

En la figura 3.7 se observa el espectro de absorción de un tejido canceroso de cuello uterino comparado con un espectro de absorción de frotis de cuello

uterino con displasia de grado dos (NIC II). El espectro de absorción del tejido canceroso tiene un máximo en 532 nm muy predominante que es asociado a la oxihemoglobina y teniendo una absorción de 0.70 mientras que la absorción de espectro de frotis con NIC II es de 0.22 en la misma longitud de onda, otra característica a tomar en cuenta es que el máximo en 600 nm no se observa una diferencia significativa y en ambos espectros rondan 0.20, pero es evidente que en tejido canceroso esta absorción no es significativa como lo es en los espectros de frotis, esto se puede asociar a la participación de la oxihemoglobina y el proceso de angiogénesis que se está desarrollando en el tejido canceroso.



*Figura 3.7: Comparación de espectros absorción entre tejido canceroso y frotis de pre-cancer de cuello uterino. El máximo en ambos espectros se encuentra en 532 nm*

Para saber a que se debe esta leve diferencia entre los espectros de absorción de frotis pre-canceroso y tejido canceroso de cuello uterino, realizamos la deconvolución en el espectro de absorción de tejido canceroso de cuello uterino y verificar a que se le atribuye el máximo en 532 nm, en la figura



3.8 se muestra la deconvolución gauseana. Los máximos obtenidos de cada espectro en la deconvolución son 430 nm, 532 nm, 573 nm, 596 nm asociado a la oxihemoglobina y 494 nm, 596 nm 640 nm, asociados a la deoxihemoglobina.

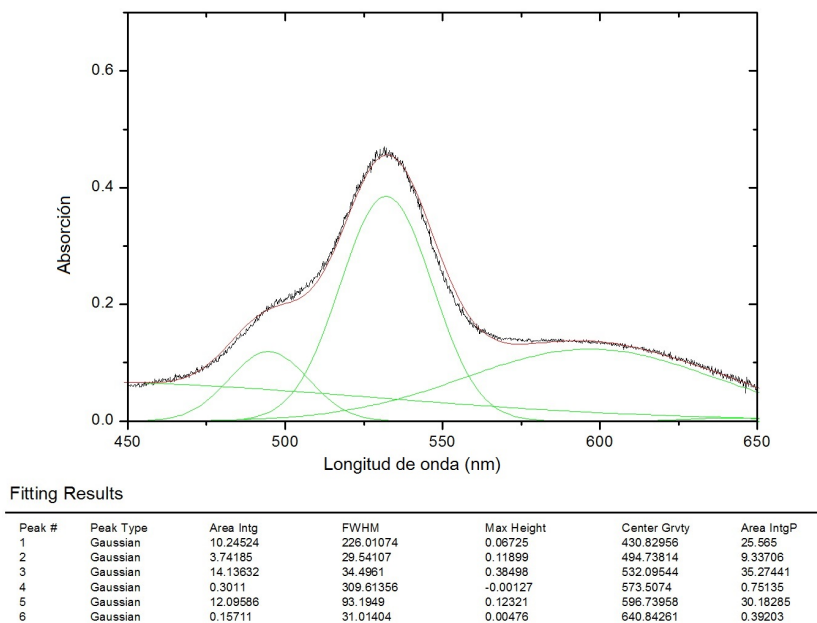


Figura 3.8: La gráfica muestra la deconvolución del espectro de absorción de un tejido canceroso de cuello uterino donde línea roja representa el resultado de hacer deconvolución gauseana y su el máximo en 532 nm de la asocia a oxihemoglobina.

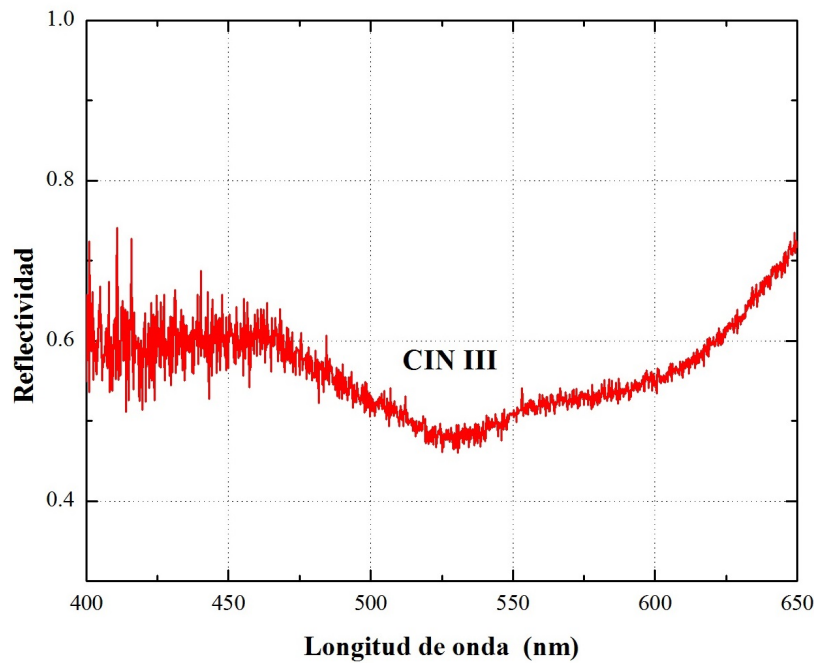
En todos los espectros de absorción tanto de frotis y tejido de cuello uterino se encontraron que la mayor contribución es la hemoglobina y la diferencia que se observó entre los espectros de pre-cáncer y cáncer se debe que a medida se va desarrollando el cáncer surgen otros procesos como lo es la angiogénesis que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio de la vasculatura existente, es fundamental en el crecimiento tumoral, la progresión y la metástasis [32].

La angiogénesis es el resultado de señales químicas de las células tumorales en rápido crecimiento por lo tanto la angiogénesis es un factor importante

en la progresión del cáncer. La angiogénesis es estimulada cuando los tejidos tumorales necesitan nutrientes y oxígeno [33].

### 3.3. Reflectividad en frotis de cuello uterino

A continuación presentamos los resultados obtenidos con el método de reflectividad. En la figura 3.9 se muestra un espectro de frotis de cuello uterino con un nivel de displasia (NIC III), en una ventana espectral de 400 nm a 650 nm.



*Figura 3.9: La gráfica muestra el espectro de reflectividad de frotis de cuello uterino con un nivel de pre-cáncer NIC III, podemos observar valles en 532 nm y 600nm.*

En la figura 3.10 donde podemos observar las diferencias entre los diferentes espectros de reflectividad de frotis de pre-cáncer de cuello uterino. También se puede observar como la muestra NIC III tiene una menor reflectividad con respecto al frotis normal de cuello uterino lo cual al comparar con otros autores [2], confirmamos que el factor de mayor importancia es la presencia

de de hemoglobina durante el desarrollo de los pre-cánceres, dando como resultado una mayor dispersión en los frotis con un nivel de pre-cáncer

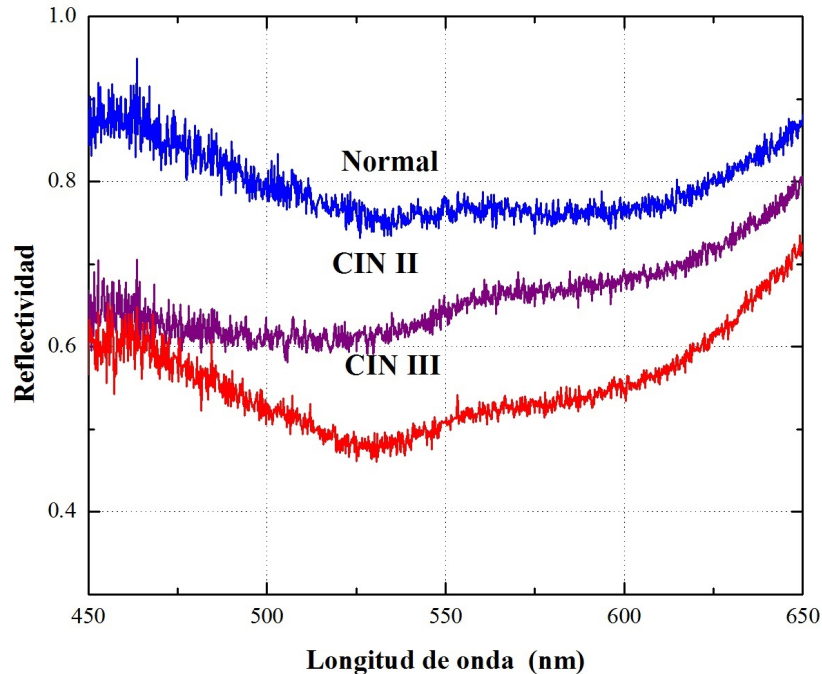


Figura 3.10: En la gráfica podemos observar espectros de reflectividad entre 450 nm y 650 nm de muestras normales y pre-cancerosas de frotis de cuello uterino.

Autores detallan que la reflectancia difusa es una técnica que permite una cuantificación directa de la absorción y dispersión de las propiedades de los tejidos [3]. Es por eso que observamos esas diferencias en la reflectividad entre los frotis de pre-cáncer con respecto a los normales, debido a que las células displásicas sufren cambios morfológicos que hacen que cambien su tamaño núcleos celulares. Estos cambios hacen que se alteran las propiedades de absorción y dispersión de los tejidos. El método de la reflectancia difusa de los tejidos identifica estos cambios morfológicos por lo tanto a distinguir entre tejido pre-canceroso y normal.

Otro factor que hace que la reflectancia sea menor en tejido pre-canceroso

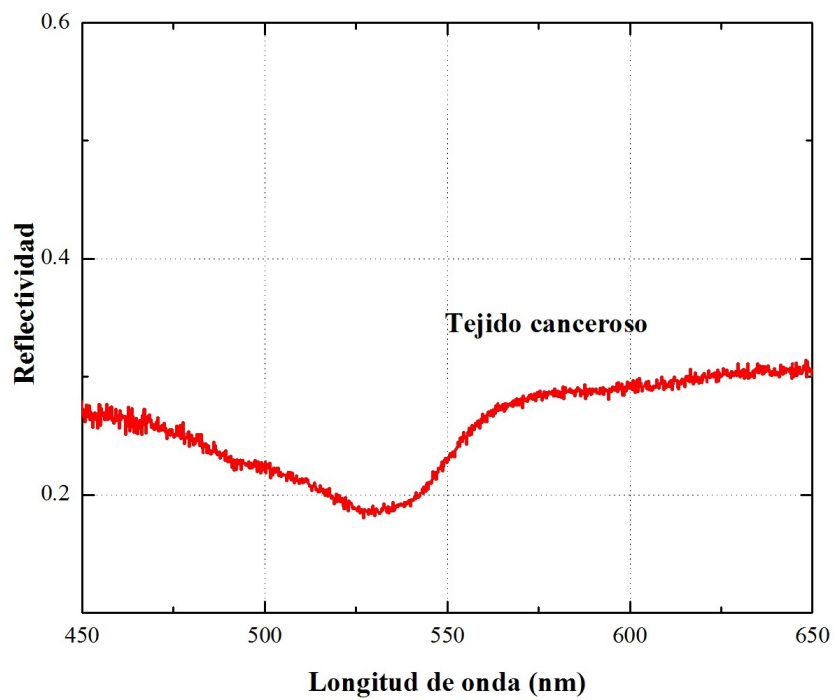
es la diferencia en la dispersión entre el epitelio normal y pre-cancerosas se atribuye al aumento del tamaño en sus núcleos celulares, aumento de la densidad óptica del núcleo y los cambios en la textura de la cromatina que han sido documentados en las células cancerosas.

Por último, las lesiones pre-cancerosas del cuello uterino se asocian con disminución de la dispersión del estroma, que se atribuye a una degradación de las fibras de colágeno, posiblemente debido a las proteasas secretadas por las pre-neoplásicas las células epiteliales [34].

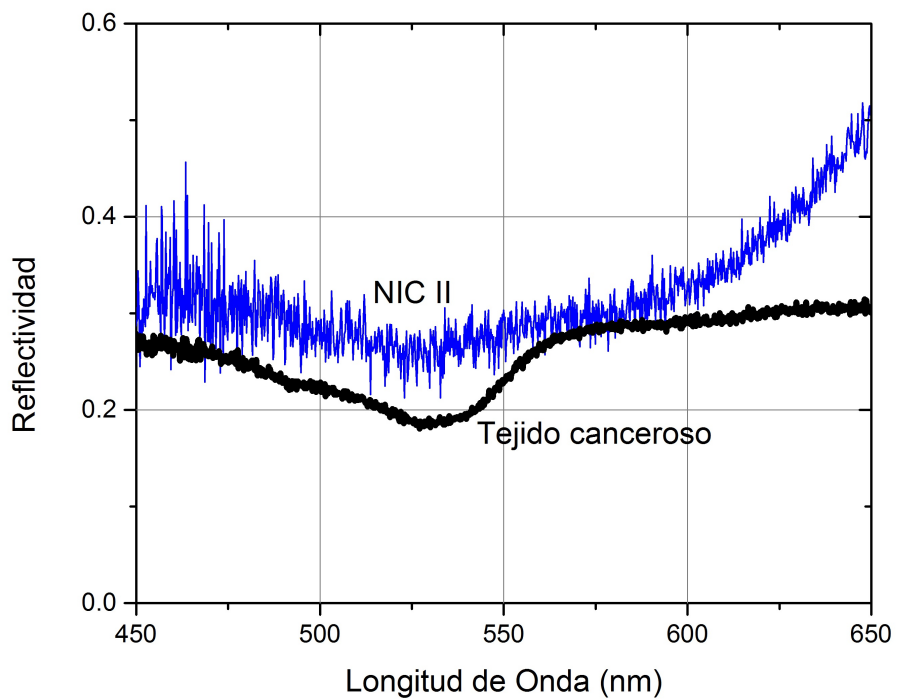
### **3.4. Reflectividad en tejido de cuello uterino**

En la figura 3.11 se observa la reflectividad de tejido canceroso de cuello uterino proveniente de un tumor canceroso extirpado a una paciente a la cual se le practicó biopsia.

En la figura 3.12 se muestra el espectro de reflectividad de un tejido canceroso obtenido mediante una biopsia, y un espectro de reflectividad de un frotis con displasia (NIC II) en la gráfica podemos observar que el espectro de frotis con displasia refleja más con respecto al espectro de tejido canceroso esto se debe que hay mucha más dispersión en los tejidos canceroso, debido a que los núcleos celulares han sufrido cambios por el desarrollo del cáncer estos núcleos son mucho mas grande y los cambios morfológicos son mucho más notorios así como también su textura esto hace que haya una mayor dispersión logrando así diferencias en la reflectividad. Otra característica es que ambos espectros tienen valles en la longitud de onda de 532 nm que se le asocia a la hemoglobina, que en esa misma longitud de onda tiene una mayor absorción.



*Figura 3.11: Espectro de reflectividad de tejido de cuello uterino en una ventana espectral de 450 nm a 650 nm, El espectro muestra un valle en 530 nm que si comparamos con su espectro de absorción figura 3.6 podemos observar que su máximo en absorción es de 530 nm.*



*Figura 3.12: Comparación de los espectros de reflectividad de tejido de cuello uterino con respecto a uno de frotis de pre-cáncer en una ventana espectral de 450 nm a 650 nm, Ambos espectros muestra un valle en 530 nm, esto debido a que la hemoglobina tiene sus bandas de absorción en la misma longitud de onda.*

# Capítulo 4

## Conclusiones y recomendaciones

### 4.1. Conclusiones

En nuestro estudio podemos decir que ambas técnicas ópticas, absorción y reflectividad ofrecen la posibilidad de detectar alteraciones no invasiva espectral asociado con cambios morfológicos y que se producen en los tejidos durante la transformación neoplásica y progresión.

Observamos diferencias entre los diferentes frotis y tejidos de cuello uterino. Donde las muestras con un nivel de neoplasia absorben mucho más que el tejido normal y en reflectividad las muestras con un nivel de neoplasia reflejan mucho menos que el tejido normal de cuello uterino.

Los patrones espectrales demostraron la contribución de la absorción de la hemoglobina con una intensidad máxima de 532 nm, son una de las características relevantes para la clasificación de los tejidos.

El aumento en el contenido de oxihemoglobina en los tejidos con un nivel de neoplasia debido a la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos, que acompaña a la neoplasia intraepitelial, provocan una mayor absorbancia en los espectros de frotis con pre-cáncer y tejido canceroso.

Los patrones espectrales en la reflectancia difusa pueden ser utilizados para

diferenciar tejido normal de cuello uterino con respecto a lesiones intraepiteliales de diferentes grados.

La espectroscopia de forma no invasiva puede evaluar los cambios morfológicos y bioquímicos asociados con el desarrollo de lesiones pre-cancerosas en el punto de atención.

## **4.2. Recomendaciones**

Durante la realización de esta investigación se presentaron limitaciones que en futuras investigaciones deberán considerarse para lograr obtener mejores resultados

Establecer los puntos críticos de corte para el diagnóstico y su correlación con el análisis histopatológico para proponer esta técnica como prueba de diagnóstico y crear así sistemas de detección temprana y rentable.

También se recomienda desarrollar cálculos y modelos computacionales para comprar los resultados teóricos con una comparación experimental y lograr un mejor análisis.

Tener en cuenta otras variables como los efectos de la edad y el estado menstrual para el análisis y el desarrollo de un algoritmo de clasificación de zonas de tejido.



# Bibliografía

- [1] S. K. Chang, Y. N. Mirabal, E. N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, *J. Biomed. Opt.* **10**, 024031 (2005).
- [2] V. T.-C. Chang, P. S. Cartwright, S. M. Bean, G. M. Palmer, R. C. Bentley, and N. Ramanujam, *Neoplasia* **11**, 325 (2009).
- [3] N. M. Marín, A. Milbourne, H. Rhodes, T. Ehlen, D. Miller, L. Benedet, R. Richards-Kortum, and M. Follen, *Gynecol. Oncol.* **99**, S116 (2005).
- [4] M. Almonte, R. Murillo, G. I. Sánchez, J. Jerónimo, and J. Salmerón, *Salud Publica Mex.* **52** (2010).
- [5] M. de salud, *Boletín Epidemiológico Mensual*, Tech. Rep. (Misnisterio de salud, El Salvador, 2011).
- [6] R. Hernández Sampieri, C. Fernández-Collado, and P. Baptista Lucio, *Metodología de la Investigación*, 5th ed., Vol. 18 (McGraw-Hill Interamericana, México, 2010) p. 613.
- [7] S. Suresh, *Acta Biomater.* **3**, 413 (2007).
- [8] S. F. Anthony, *Harrison Principios de Medicina Interna*, 17th ed. (McGraw-Hill, Mexico, 1998) p. 452.
- [9] American Cancer Society, *Cáncer de cuello uterino*, Tech. Rep. (American Cancer Society, 2012).
- [10] G. L. Cruz and O. B. Diego, *Rev. Cuba. Obstet. y Ginecol.* **31** (2005).
- [11] G. de Palo, S. Dexeus, and W. Chanen, *Patología y tratamiento del tracto genital inferior*, 2nd ed. (Elsevier, España, 2007) p. 3.

- [12] M. S. Nápoles, *Rev. Cuba. Obstet. y Ginecol.* (2008).
- [13] B. S. Giraldo, *Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino*, Ph.D. thesis, Universidad nacional de Colombia sede Manizales (2009).
- [14] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **47**, 555 (1996).
- [15] O. A. Peñuela, *Colomb. Med.* **36**, 215 (2005).
- [16] A. Vasil'ev, *J. Evol. Biochem. Physiol.* **41**, 34 (2005).
- [17] M. Cope, *The application of near infrared spectroscopy to non invasive monitoring of cerebral oxygenation in the newborn infant*, Ph.D. thesis, University College London (1991).
- [18] W. G. Zijlstra and A. Buursma, *Comp. Biochem. Physiol.* **118**, 743 (1997).
- [19] J. R. Lakowicz, *Plenum Press. York, 1983) Chapter*, 3rd ed. (Springer US, Meryland, 2006) p. 28.
- [20] E. A. Pérez, *Caracterización ópticas de micorrizas arbusculares*, Ph.D. thesis, Universidad de El Salvador (2013).
- [21] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (Wiley-VCH, Toronto, 2003) p. 36.
- [22] P. F. Bernath, *Spectra of Atoms and Molecules*, 1st ed. (Oxford, University Press, New York, 1995) p. 82.
- [23] A. d. l. C. Pérez, *Estudio de la Reflexión Óptica Difusa en Tejido Biológico*, Ph.D. thesis, Instituto Politécnico Nacional (2012).
- [24] M. Pleitez, W. Abarca, P. Espinoza, and B. Dreyer, in *Simp. Centroam. y del Caribe Física*, edited by Luz María Moya Rodríguez (San José , Costa Rica, 2009) p. 16.
- [25] M. de salud pública y bienestar social, *Manual nacional de normas y procedimientos para la prevencion y el control del cancer de cuello uterino*, Tech. Rep. (Organización Panamericana de la salud, Paraguay, 2010).

- [26] Ocean Optics, *Fibers and Probes*, Tech. Rep. (Halma Group company, USA, 2010).
- [27] Ocean Optics, *USB4000 Fiber Optic Spectrometer Installation and Operation Manual*, Tech. Rep. 211 (Halma Group Company, USA, 2013).
- [28] Ocean Optics, *SpectraSuite. Installation Installation and Operation Manual*, Tech. Rep. 000 (Halma Group Company, USA, 2009).
- [29] D. A. Boas and M. A. Franceschini, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **369**, 4407 (2011).
- [30] M. Höckel, K. Schlenger, B. Aral, M. Hã, M. Milze, U. Schã, and P. Vaupele, *Cancer Res.* **56**, 4509 (1996).
- [31] J. Q. Brown, L. G. Wilke, J. Geradts, S. a. Kennedy, G. M. Palmer, and N. Ramanujam, *Cancer Res.* **69**, 2919 (2009).
- [32] M. E. Eichhorn, A. Kleespies, M. K. Angele, K.-W. Jauch, and C. J. Bruns, *Langenbecks. Arch. Surg.* **392**, 371 (2007).
- [33] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, and M. Kojiro, *Vasc. Health Risk Manag.* **2**, 213 (2006).
- [34] N. Thekkek and R. Richards-Kortum, *Nat. Rev. Cancer* **8**, 725 (2008).

# Anexos

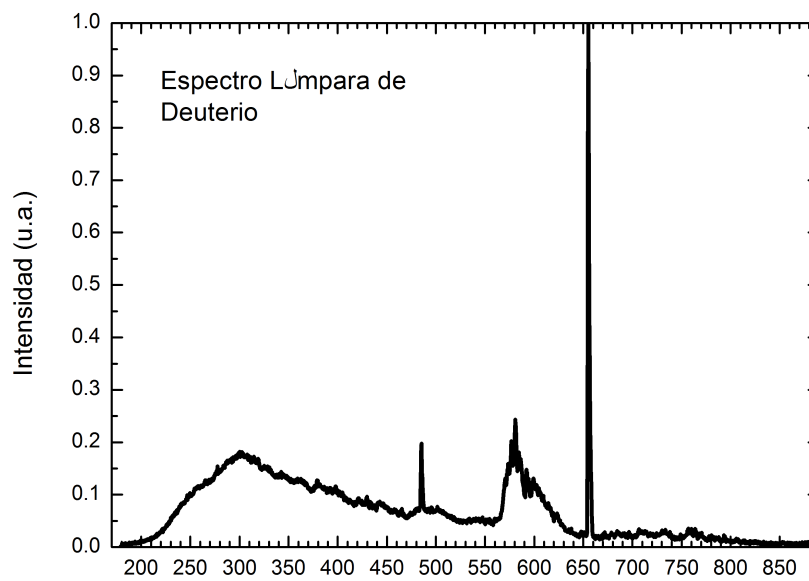
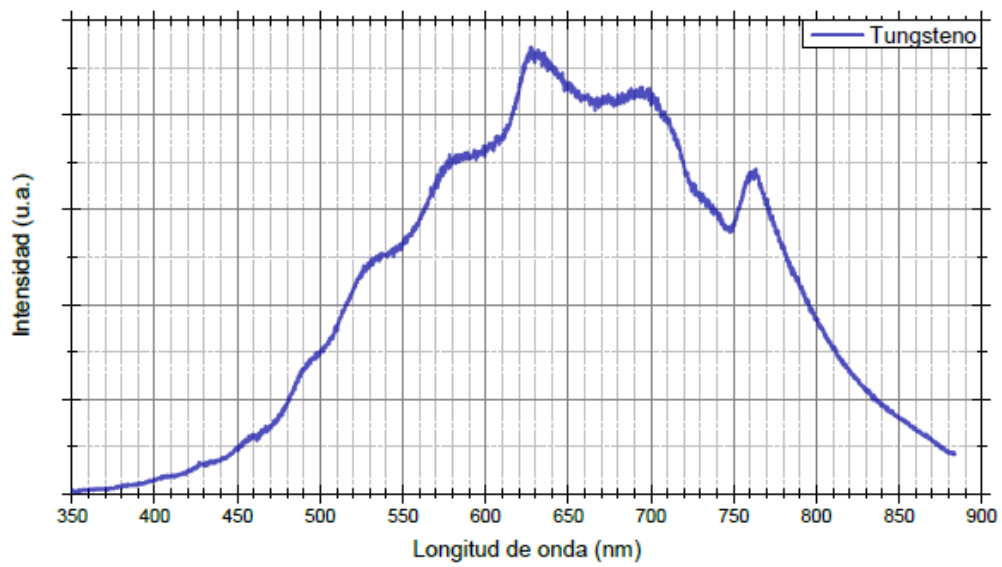


Figura A: Espectro de emisión de la lámpara de deuterio.



*Figura B: Espectro de emisión de la lámpara de tungsteno.*

SPECIFICATIONS		
Engineering Specifications	HL-2000 Series	HL-2000-LL Series
Source:	Tungsten Halogen	Long Lifetime Tungsten Halogen
Wavelength range:	360-2400 nm	360-2400 nm
Color temperature:	2,960 K	2,800 K
Nominal bulb power:	5 W	4.75 W
Typical output power:	See chart below	See chart below
Warm-up time:*	10 minutes	10 minutes
Source lifetime:	1,500 hours (typical)	10,000 hours (typical)
Stability of optical output:	0.15% peak-to-peak	0.15% peak-to-peak
Drift of optical output:	<0.3% per hour	<0.3% per hour
Trigger/shutter:	HL-2000-FHSA only	HL-2000-FHSA-LL only
Integrated filter holder & attenuator:	HL-2000-FHSA only	HL-2000-FHSA-LL only
Operating temperature:	5 °C - 35 °C	5 °C - 35 °C
Operating humidity:	5-95% without condensation at 40 °C	5-95% without condensation at 40 °C
Power requirements:	12 VDC	12 VDC
Power consumption:	up to 15 W	up to 15 W
Dimensions:	6.2 cm x 6 cm x 15 cm	6.2 cm x 6 cm x 15 cm
Weight:	0.5 kg	0.5 kg
Safety & regulatory:	CE; ROHS, WEEE	CE; ROHS, WEEE
Replacement bulb:	HL-2000-B	HL-2000-B-LL

*Figura C: Datos de lámpara de Tungsteno*

## Specifications

Physical	
Dimensions:	89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm
Weight:	190 grams
Detector Specifications	
Detector:	Toshiba TCD1304AP Linear CCD array
Detector range:	200-1100 nm
Pixels:	3648 pixels
Pixel size:	8 $\mu\text{m}$ x 200 $\mu\text{m}$
Pixel well depth:	100,000 electrons
Signal-to-noise ratio:	300:1 (at full signal)
A/D resolution:	16 bit
Dark noise:	50 RMS counts
Corrected linearity:	>99%
Optical Bench	
Design:	f/4, Asymmetrical crossed Czerny-Turner
Focal length:	42 mm input; 68 mm output
Entrance aperture:	5, 10, 25, 50, 100 or 200 $\mu\text{m}$ wide slits or fiber (no slit)
Grating options:	14 different grating options, UV through Shortwave NIR
HC-1 grating option:	No
Detector collection lens option:	Yes, L4
DET4 filter options:	DET4-200-850; DET4-350-1000
Other bench filter options:	Longpass OF-1 filters
Collimating and focusing mirrors:	Standard or SAG+UPG
UV enhanced window:	Yes, UV4
Fiber optic connector:	SMA 905 to 0.22 numerical aperture single-strand optical fiber
Spectroscopic	
Wavelength range:	Grating dependent
Optical resolution:	$\sim$ 0.1-10.0 nm FWHM (grating dependent)
Signal-to-noise ratio:	300:1 (at full signal)
A/D resolution:	16 bit
Dark noise:	50 RMS counts
Integration time:	3.8 ms - 10 seconds
Dynamic range:	$3.4 \times 10^6$ (system), 1300:1 for a single acquisition
Stray light:	<0.05% at 600 nm; 0.10% at 435 nm

Figura D: Datos del espectrógrafo de USB 4000