



“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO”

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARÍA DE SALUD

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**“EVALUACIÓN *IN-VIVO* DE TEJIDO CERVICAL SANO A TRAVÉS
DE ESPECTROSCOPIA DE REFLEXIÓN Y FLUORESCENCIA.
ESTUDIO PILOTO”**

TESIS

Que para obtener el título de especialista en Ginecología y Obstetricia

PRESENTA

DRA. GABRIELA DE LA ROSA GUTIÉRREZ

ASESOR DE TESIS

DR. ANTONIO GUTIÉRREZ RAMÍREZ

“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO”

Mexico D. F.

29 de Julio de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
HOJA DE APROBACIÓN

Dr. Carlos Viveros Contreras
Jefe de la División de Enseñanza
Hospital Juárez de México.

Dr. Juan Jiménez Huerta
Jefe del Servicio de Ginecología
Titular del Curso de Ginecología y Obstetricia UNAM

Dr. Antonio Gutiérrez Ramírez
Director de Tesis
Hospital Juárez de México

Dra. Gabriela de la Rosa Gutiérrez
Tesisista
Hospital Juárez de México

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el apoyo brindado durante estos cuatro años y durante toda mi vida a mis padres y a mis hermanos, que como familia, hemos logrado superar todas las adversidades que en algún momento han puesto en riesgo la integridad de alguno de nosotros o de alguno de nuestros seres queridos.

Agradezco a mi madre por la paciencia y la comprensión dada en este período, el más complicado de mi vida académica, por levantarme de todas mis caídas con una sonrisa, a pesar de la distancia.

También doy las gracias a mis compañeros de generación que hicieron bastante agradable mi estancia en esta sede hospitalaria, y que lejos de competir, colaboraron con el objetivo de hacernos crecer juntos.

A mis adscritos y residentes del hospital que me alentaron a seguir adelante y que me brindaron la disciplina necesaria para ejercer esta especialidad que día con día me enseñaron a amar.

Agradezco a Diego Adrian Fabila todo el apoyo durante el desarrollo experimental de esta tesis.

Y el agradecimiento más especial y más enfocado al desarrollo de esta tesis a mi tutor principal, a mi tutor de vida, mi padre, el Dr. José Manuel de la Rosa Vázquez, por encontrar una razón más para no alejarse de mí y permitirme formar parte de sus proyectos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	4
III. OBJETIVOS	4
IV. HIPÓTESIS	5
V. MARCO TEÓRICO	
V.I CÁNCER CERVICOUTERINO	
V.I.I Epidemiología de cáncer cervicouterino	6
V.I.II Histología cervical normal	6
V.I.III Historia natural del cáncer cervicouterino y cambios histológicos	8
V.I.IV Histopatología del cáncer cervicouterino	9
V.I.V Diagnóstico y tamizaje actual de cáncer cervicouterino	12
V.II FUNDAMENTOS ÓPTICOS	
V.II.I Fenómenos de interacción luz-tejido biológico	15
V.II.II Aplicaciones de óptica en detección de cáncer	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.I Desarrollo del sistema para la medición de fluorescencia y reflectancia difusa	31
VI.II Adaptación de fuentes de luz al colposcopio para captura de imágenes	35
VI.III Selección de las pacientes y realización del estudio	37
VII. RESULTADOS	39
VIII. CONCLUSIONESA	49
IX. REFERENCIAS	50

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE TEJIDO CERVICAL SANO A TRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE REFLEXIÓN Y FLUORESCENCIA. ESTUDIO PILOTO

I.- INTRODUCCIÓN

El incremento de la incidencia de cáncer cervicouterino sigue siendo un problema importante de salud pública entre las mujeres de países en vías de desarrollo; marcando de forma importante Latinoamérica y el Caribe incluyendo nuestro país, México.

Se han llevado a cabo grandes esfuerzos para poder disminuir la incidencia del cáncer cervicouterino y evitar en gran medida muchas muertes de mujeres que pudiesen en determinado momento haber prevenido esta enfermedad.

El cáncer cervicouterino es un padecimiento de origen multifactorial, actualmente se considera una enfermedad de transmisión sexual, ya que un cofactor principal es el Virus del Papiloma Humano (VPH) [1]. La historia natural de la enfermedad, tiene un periodo de latencia prolongado en algunas ocasiones, durante el cual pudiese ser factible la detección oportuna.

Se han estudiado una gran cantidad de subtipos de virus del papiloma humano, a los cuales se les adjudica una participación importante en el desarrollo del cáncer cervicouterino, estos tipos son: 16,18, 31,33, 35, 39,45, 51, 52 y 56 [2]. Con estos antecedentes podemos decir que la utilización adecuada de la citología, la prueba de captura de híbridos, la colposcopia e histología, son afines para la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH), lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix.

La descripción de la técnica citológica para detectar el cáncer cervical que efectuó Papanicolaou en 1941 dio origen a uno de los esquemas de detección precoz más exitosos de todo el mundo, pese a que no ofrecía la posibilidad de localización de lesiones y la biopsia dirigida. Aún en la actualidad, existen problemáticas que disminuyen tanto la sensibilidad como la especificidad de esta prueba, considerando desde la toma de la muestra hasta la interpretación del patólogo. Tomando en cuenta un estricto control de calidad para la toma de muestra, la especificidad de esta prueba se estima en un 98-99% con una sensibilidad del 50 al 75% [3], poniendo en riesgo la seguridad de este estudio como prueba de tamizaje.

Por todas las desventajas de la citología cervical como tamizaje para el cáncer cervicouterino y sus lesiones precursoras, nace en Alemania en el año de 1925, la colposcopia, iniciada por Hans Hinselman. Insatisfecho con los medios de exploración entonces empleados y tratando de descubrir las formas iniciales de la enfermedad, pretendía la visualización estereoscópica del cuello del útero, mediante magnificación con iluminación directa, con lo que logró observar lesiones no visibles al ojo desnudo.

El estudio colposcópico ofrece la posibilidad de estudiar en vivo el comportamiento biológico del epitelio cervical y proporciona una valoración precisa y completa del cuello uterino en una paciente con citología anormal, donde se muestra la distinción entre las imágenes

normales y anormales que caracterizan a las lesiones de bajo y alto grado; así mismo descarta la existencia de cáncer invasor inicial y permite realizar biopsias dirigidas. En los últimos años se ha logrado demostrar su utilidad, y su utilización es ya prácticamente rutinaria como estudio complementario de la citología cervical.

La exploración colposcópica, junto con la descripción de la imagen colposcópica clásica (color, contornos, sobreelevación y angioarquitectura), aportan información tanto de la topografía de las lesiones cervicales como de su extensión. Sin embargo, la colposcopia convencional tiene el inconveniente de ser una exploración dinámica, con la dificultad ligada a la subjetividad en su interpretación. Las imágenes carecen de la objetividad necesaria para precisar la naturaleza de los hallazgos colposcópicos anormales y su extensión topográfica o para el estricto seguimiento de las lesiones cervicales. La valoración del tamaño de la lesión mediante colposcopia convencional se realiza de manera cualitativa, clasificando las lesiones en pequeñas, medianas y grandes, o de forma semicuantitativa según el número de cuadrantes cervicales afectados [4].

Por décadas los investigadores clínicos han buscado diversas formas para mejorar el contraste óptico entre un cérvix normal y una lesión precancerosa. El uso de agentes simples como el ácido acético [5], la solución de lugol [6] o un filtro de luz verde en la lámpara de iluminación, han servido para resaltar regiones bajo sospecha de ser precancerosas. El mismo H. Hinselman en 1943 [5] introduce en el colposcopio para iluminación una fuente de luz ultravioleta con lo cual desarrolla la colposcopia de fluorescencia.

Aún así, debido a la baja especificidad de los exámenes visuales a las áreas que aparecen anormales en una colposcopia se les practica una biopsia, la cual es analizada con un microscopio óptico para confirmar la presencia de la enfermedad [7-8]. Esta técnica de diagnóstico puede tomar varios días, además de que depende en gran medida de la experiencia del personal involucrado en la preparación y evaluación de la muestra. Sin embargo con estos procedimientos es complicado detectar el cáncer en etapas tempranas.

En los últimos años se han buscado técnicas que puedan superar los métodos convencionales para el diagnóstico de cáncer. Una de las áreas en las que se han realizado un gran número de investigaciones es la espectroscopia óptica (de fluorescencia y de reflexión difusa), que tiene como objetivo principal el desarrollar nuevas técnicas de detección y/o diagnóstico de cáncer que ofrezcan las ventajas de ser rápidas, no invasivas y que permitan realizar un diagnóstico en tiempo real. El análisis de tejido mediante técnicas ópticas es conocido como biopsia óptica y ha sido estudiado para diversos órganos del cuerpo humano como lo son: cérvix, hígado, piel, cerebro, seno, colon, riñón, entre otros [9-10]. El principio básico utilizado es que la emisión y el esparcimiento de la luz de tejido iluminado están fuertemente influenciados por la composición y estructura celular del tejido. La progresión de una enfermedad a cáncer causa un cambio en la composición y la estructura celular de los tejidos afectados, produciendo así un cambio en la emisión y dispersión de la luz (ver Fig. 1.1) [11-12].

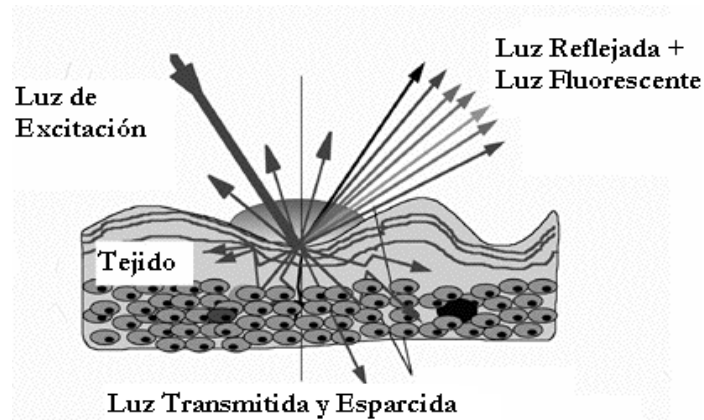


Figura 1.1 Esquema de interacciones ópticas con el tejido para representar la biopsia óptica [12].

Para realizar las mediciones de espectroscopia de fluorescencia y de reflexión óptica difusa se cuenta hoy en día con desarrollos tecnológicos que permiten la construcción de sistemas portátiles compuestos por: a) espectrómetros miniatura, que además reducen el tiempo de captura de un espectro de luz a fracciones de segundo; b) fuentes de luz miniatura basadas en LEDs y diodos láser de semiconductor; c) fibras ópticas para conducir la luz de exploración prácticamente a cualquier parte del cuerpo y c) sistemas de computo cada vez más poderosos y portátiles para el análisis y procesado de la información. Todo lo cual permite adaptar nuevos equipos a los ya utilizados convencionalmente, y realizar mediciones tanto *in vivo* como *in situ*.

Con el desarrollo de estos equipos es posible realizar estudios de fluorescencia y reflexión óptica difusa en tejido biológico de alta resolución espacial y espectral que permiten en primera instancia caracterizar el tejido biológico y desarrollar técnicas para tratar de dar solución a la problemática de detección y diagnóstico de cáncer de manera temprana.

II.-JUSTIFICACIÓN.

La alta incidencia y mortalidad que representa el cáncer cervicouterino a nivel mundial, el poco alcance que tienen las comunidades marginadas en nuestro país a estudios especializados y personal altamente capacitado, y la subjetividad del diagnóstico histopatológico que conlleva importantes cifras de falsos positivos y negativos, obliga a desarrollar equipos portátiles, económicos y confiables para la detección oportuna del cáncer cervicouterino.

Actualmente la aplicación de la óptica, en particular en los dominios del espectro electromagnético que va del ultravioleta (UV) al infrarrojo (IR) intenta explotar las interacciones de la luz con tejidos biológicos con fines terapéuticos (cirugía láser, terapia fotodinámica, fototerapia), de análisis biológicos (microscopia óptica, micro manipulación láser, etc.) y de diagnóstico (caracterización de tejido sano y patológico).

Los métodos de diagnóstico ópticos presentan ventajas con respecto a los métodos de diagnóstico clásicos (Rayos X, IRM, colposcopia, etc.), ligadas a su gran sensibilidad, a la naturaleza menos ionizante de la luz y su carácter no invasivo. Las propiedades ópticas del tejido biológico son función de su composición bioquímica y de su estructura celular y tisular. Los métodos ópticos presentan entonces gran potencial de desarrollo de instrumentos no invasivos de diagnóstico médico *in vivo* e *in situ*.

El presente trabajo utilizó recursos tecnológicos existentes como mini-espectrómetros, fuentes de luz basadas en la tecnología LED, así como arreglos de fibras ópticas que en conjunto puedan generar una herramienta de apoyo para el médico en el diagnóstico de cáncer cervicouterino.

III.-OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Capturar imágenes de tejido cervical sano, después de ser irradiado con diferentes tipos de luz (UV, violeta, azul y blanca), a través de un dispositivo adaptado al equipo de colposcopia; así como obtener una curva de normalidad de una población pequeña del espectro de reflexión difusa y fluorescencia de tejido cervical sano, a través de un analizador de espectros basado en un mini espectrómetro y una fibra óptica bifurcada para irradiar y captar la luz reflejada y fluorescente en forma puntual (zona de medición de 1mm de diámetro).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Adaptar fuente de iluminación previamente diseñada al equipo de colposcopia, para iluminar tejido cervical a diferentes longitudes de onda. Las imágenes visibles producidas con luz blanca, luz azul, luz violeta y luz UV serán analizadas para determinar EL tipo de luz más apropiada para la detección de anormalidades.
- Adaptar un analizador de espectros basado en un mini espectrómetro y una fibra óptica bifurcada para irradiar y captar la luz reflejada y fluorescente en forma puntual (zona de medición de 1mm de diámetro), para posteriormente analizar la información de la luz obtenida a través de un programa computacional.
- Captar la información suficiente de pacientes con tejido cervical sano, para estandarizar una curva de normalidad adecuada ajustada a una pequeña muestra de pacientes en la población del Hospital Juárez de México como estudio piloto.

IV.-HIPÓTESIS

La toma de imágenes de fluorescencia con los cuatro tipos de luz, nos demostrará un patrón imagenológico constante de las pacientes con tejido cervical sano, de tal manera que a la visualización este patrón será fácilmente identificable.

Se obtendrán espectros de los fenómenos ópticos de reflexión difusa y fluorescencia de los tejidos irradiados en cada una de las pacientes, los cuales no presentarán diferencias significativas de una paciente a otra. Se obtendrán curvas de normalidad para ambos fenómenos en la población piloto seleccionada.

Al no observar diferencias significativas de paciente a paciente, este estudio nos permitirá dar seguimiento al análisis del tejido cervical sano, con aumento del tamaño de la muestra para posteriormente obtener espectros específicos que caractericen a todas las pacientes sanas.

El apoyo de la espectroscopia óptica aumenta la sensibilidad de los métodos de diagnóstico convencionales para cáncer cervicouterino y sus lesiones precursoras debido a su capacidad de diferenciar zonas sanas, malignas y premalignas del tejido cervical uterino sano. Ésta será una detección objetiva y cuantitativa, capaz de descartar errores de interpretación subjetiva. Se obtendrá el beneficio de la intervención terapéutica oportuna, así como la prevención del sobrediagnóstico y tratamientos perjudiciales innecesarios.

V.- MARCO TEÓRICO

V.I CÁNCER CERVICOUTERINO

V.I.I EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

EL cáncer cervicouterino (Ca Cu) ocupa el tercer lugar en frecuencia a nivel mundial en la población femenina, con una tasa de incidencia de 15.3 por 100,000 mujeres y una tasa de mortalidad de 7.8 por 100,000 mujeres. Se estimaba que para 2012 se diagnosticarían 12,170 nuevos casos, de los cuales el 35% terminarían con la muerte [13]. El 83% de todos estos casos ocurren en países en desarrollo, en donde el cáncer cervical es la primera o segunda causa de muerte en mujeres[14], particularmente entre pacientes relativamente jóvenes [15]. El cáncer cervical es una de las neoplasias mejor entendidas, es bien conocido que en la mayoría de los casos, su causa es la persistente infección con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Su progresión es lenta, y como regla toma al menos una década desde la introducción del VPH (vía relaciones sexuales) a la capa basal del epitelio cervical hasta el desarrollo de cáncer invasivo. El largo periodo latente de esta enfermedad da muchas oportunidades para buscar las anomalías citológicas e intervenir y prevenir su progresión.

V.I.II HISTOLOGÍA CERVICAL NORMAL

Los epitelios que recubren la vagina, el cérvix, el endocérvix y el endometrio, normalmente descaman o exfolian y son las células desprendidas de ellos, las que estudiamos. El epitelio que recubre toda la **vagina y el exocérvix** hasta la zona de unión escamocolumnar (límite con endocérvix), es un epitelio plano estratificado y tiene función de protección. Desde el punto de vista histológico, distinguimos en él cuatro capas, que de la profundidad a la superficie son:

Estrato germinativo o basal: es la fuente de regeneración del epitelio, posee de una a dos células de espesor. Cada célula tiene unos 12 micrómetros de diámetro, con poco citoplasma basófilo, núcleos de posición central que ocupan una tercera parte del tamaño celular total y signos de actividad como nucleólos evidentes y figuras de mitosis. Las células basales son las más pequeñas. En condiciones normales no se observan en los descamados, pues su exfoliación ocurre solo cuando existe algún proceso patológico que ha dañado las capas superficiales del epitelio; tienen apariencia redonda u ovoide y aspecto vesicular.

Estrato espinoso profundo o parabasal: está constituido por varias capas de células poliédricas con núcleos centrales y aspecto vesicular, es decir, núcleos con la membrana nuclear clara, rodeando un nucleoplasma homogéneo en el que se pueden observar los pequeños gránulos de heterocromatina o cromocentros, así como la cromatina sexual; ocupan una quinta parte del tamaño celular total y los caracteres del citoplasma son semejantes a los de las capas basales. Estas células son de tamaño ligeramente mayor a las basales, con más variación en su forma; miden entre 12 y 30 micrómetros de diámetro; su número en los extendidos es bajo, por lo

regular entre 5 a 10% de la población celular, el cual se incrementa en casos de alguna lesión cervical. Conforme estas células maduran, sus dimensiones aumentan y tienden a aplanarse, por lo que se les denomina entonces células intermedias.

Estrato espinoso superficial: ocupa la mitad superior de la zona media del espesor del epitelio, está constituido con células con mayor cantidad de citoplasma, rico en glucógeno, que les da apariencia clara, de núcleos centrales, aspecto vesicular y dimensiones ligeramente menores que las anteriores. Las células de este tipo surgen de las parabasales; mediante el proceso de maduración aumentan progresivamente sus dimensiones, que varían entre 30 a 45 micrómetros; tienen citoplasma transparente por lo general basófilo, con núcleo central de aspecto vesicular, de unos 8 micrómetros de diámetro, lo cual las diferencia de las células superficiales, que son de núcleo picnótico y de dimensiones menores. En estas células de tipo intermedio, la progesterona que inhibe la maduración del epitelio cervicovaginal, produce los cambios celulares que caracterizan a la llamada célula navicular del embarazo.

Estrato superficial: conformado por varias capas de células unidas laxamente entre sí, con abundante citoplasma claro, mayor contenido de glucógeno que las anteriores y núcleos pequeños y picnóticos. Este estrato es el que se descama más fácilmente. Las células superficiales son las células de mayor tamaño en un descamado cervicovaginal, miden de 30 a 60 micrómetros; tienen forma poliédrica, plana, de bordes precisos, con citoplasma fino y transparente que puede contener gránulos pequeños y oscuros de queratohialina. Estas células se caracterizan, como ya se mencionó, por poseer un núcleo picnótico, es decir, se tiñe de color muy oscuro en el que no se identifica estructura alguna, y sus dimensiones son menores a 6 micrómetros.

Estas células superficiales, así como las intermedias de mayor tamaño, son las que predominan en los extendidos de mujeres en la época de la madurez sexual. Ambos tipos de células tienen ciertos cambios en cuanto a número, forma y dimensiones en el curso del ciclo sexual, que son la base en el diagnóstico cito-hormonal.

El epitelio que recubre el **endocérvix**, es un epitelio cilíndrico columnar, cuyas células se encuentran dispuestas perpendicularmente a la superficie de inserción. Este epitelio está constituido por una sola capa de células. Este revestimiento epitelial se invagina hacia el estroma subyacente para constituir las glándulas endocervicales, que no son sino grietas de dicho epitelio celular en el estroma subyacente.

En cortes de tejido de la porción alta del conducto endocervical, además de las células columnares, en ocasiones se pueden observar algunas con cilios. El hallazgo de este tipo de células, aún cuando es raro en los cortes del tejido, no lo es en los extendidos cervicales y se ha sugerido como un marcador útil que indica un proceso benigno cuando existen alteraciones celulares de este epitelio, sugerentes de malignidad.

Existe un tercer tipo de células, encargadas de la regeneración del epitelio endocervical, que se encuentran comprimidas entre las de tipo columnar en la base del epitelio, en el ámbito de la membrana basal. Estas células subcolumnares o de reserva tienen la capacidad de diferenciarse

en células columnares mucosas o ciliadas. En condiciones normales son visibles únicamente mediante microscopía electrónica. En el microscopio de luz solo se identifican cuando ocurre hiperplasia de ellas como reacción a estímulos externos sobre el aparato genital, como el caso de mujeres portadoras de dispositivo intrauterino, identificándose en esas circunstancias en los extendidos celulares como cúmulos con aspecto sincicial de células pequeñas de forma oval o poligonal, con muy poco citoplasma cianófilo y finas vacuolas.

Cuando la obtención de especímenes del cuello del útero se efectúa por abrasión o raspado, las células endocervicales muestran un tipo columnar alto con núcleos ovoides, cromatina granular fina y nucleolo prominente, así como citoplasma tenuemente basófilo y finamente vacuolado. Es común observar a dichas células en forma de franjas o agrupaciones glandulares, las cuales vistas de arriba abajo, son poligonales con forma de panal de abejas, mientras que de perfil muestran la forma cilíndrica característica. En los extendidos del fondo de saco vaginal posterior, donde las células pueden verse descamadas de forma espontánea, tienden a adquirir un aspecto redondeado y, con frecuencia, por lo frágil de su citoplasma, con apariencia de núcleos desnudos.

El cambio del epitelio escamoso del ectocérvix al epitelio columnar del endocérvix generalmente ocurre de manera súbita en el orificio cervical externo. Dicho cambio se llama unión escamocolumnar, aunque su localización anatómica puede variar considerablemente y ocurrir hacia el ectocérvix o hacia la parte alta del endocérvix.

Esta zona de transición epitelial, cuya posición suele variar, ha sido designada por los colposcopistas como zona de transformación, ya que es frecuente que en este nivel el epitelio cilíndrico endocervical se transforme en epitelio escamoso, fenómeno biológico designado como metaplasia escamosa. Esta zona de transformación del epitelio cervical, la más proliferativa durante la pubertad, la adolescencia y el embarazo, es en especial sensible a estímulos neoplásicos provenientes del exterior y sitio de inicio de las lesiones precursoras del carcinoma cervicouterino (CaCu)

V.I.III HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER CERVICOUTERINO Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS

Las lesiones displásicas o neoplásicas del cuello uterino en casi todos los casos son secundarias a la infección persistente de tipos de VPH de alto riesgo. De los más de 100 tipos de VPH que se han identificado hasta la actualidad, se considera que los potencialmente carcinógenos, es decir, los denominados de alto riesgo, son los tipos 16, 18, 31,33,35,36,39,45, 51,52,56,58,59, 68, 73 y 82. Si bien es evidente que la mayoría de los casos corresponde a los tipos 16 y 18, la prevalencia de varios de los tipos de VPH depende de la ubicación geográfica.

Se considera que la carcinogénesis cervical es un proceso compuesto por varios pasos, del cual el VPH es un carcinógeno necesario, aunque no suficiente. Se desprende de diversos estudios que la multiparidad, el tabaquismo, la inmunodeficiencia y, aunque con menor contundencia, el uso prolongado de métodos anticonceptivos hormonales orales son cofactores que quizá influyan

en el riesgo de que la infección por VPH progrese y se convierta a cáncer cervical. Los factores inmunológicos pueden cumplir un papel importante en el control natural de la infección inicial por VPH, ya que entre las mujeres inmunodeficientes es significativamente más alto el índice de infección persistente por los tipos de VPH de alto riesgo.

Östör, consigna que las neoplasias intracervicales tipo 1 (NIC 1) progresan a tipo 3 (NIC 3) en 10% de los casos y que la probabilidad de que las lesiones NIC 3 se transformen en carcinoma invasor es superior al 12%. No obstante es casi imposible predecir el porcentaje de regresión definitiva, ya que las lesiones NIC 3 confirmadas en el estudio histológico generalmente se resecan por completo y son eliminadas como consecuencia del tratamiento químico o quirúrgico. Estas observaciones se condicen con el concepto de que la gran mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo son procesos transitorios, durante los cuales se observa un periodo de multiplicación vírica intensa, la que luego es destruida por la respuesta inmunitaria natural del huésped.

REPLICACIÓN DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y DIFERENCIACIÓN DE LOS EPITELIOS

Los VPH son específicos tanto para especie como para tejido; esto es, inducen exclusivamente proliferaciones epiteliales benignas o malignas de la piel y las mucosas de los seres humanos. Al parecer estos virus tienen un tropismo absoluto por células epiteliales, ya que su ciclo productivo solo se realiza de manera completa en ellas. La infección productiva ocurre en varias etapas sucesivas, que depende del estado de diferenciación de las células epiteliales infectadas.

En las células infectadas del epitelio genital, los VPH se replican de manera vegetativa en los estratos basales; posteriormente, durante la diferenciación de estas células, lo hacen de manera amplificativa, es decir, con el uso de un mecanismo de círculo rodante.

El ciclo completo, que incluye la síntesis del ADN viral, la producción de las proteínas de la cápside viral y el ensamblado de los viriones, ocurre selectivamente en los queratinocitos terminalmente diferenciados. Las células de la capa basal que proliferan, a pesar de que contienen ADN de VPH, parecen ser poco activas en la expresión de algunas proteínas virales y en la replicación del genoma viral, lo cual ocurre solo de manera vegetativa.

A pesar de que aparentemente existen factores celulares que regulan de manera negativa la transcripción viral, la situación cambia cuando las células infectadas migran hacia arriba del epitelio durante su diferenciación, pues es entonces cuando empieza la transcripción activa de las secuencias virales, la síntesis de las proteínas virales y el ensamblado de las partículas virales en algunas células superficiales.

V.I.IV HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

Displasia y carcinoma in situ (NIC 1-3)

Estas entidades forman parte de un proceso continuo que incluye atipia citológica leve a severa con pérdida gradual de la maduración epitelial y aumento de los cambios nucleares y del número de mitosis atípicas. Puesto que los cambios se superponen, en algunos casos puede ser difícil diferenciar la displasia leve de la moderada, la moderada de la severa y la severa del carcinoma in situ.

En la displasia leve y la displasia moderada (NIC 1 y NIC 2) originada a partir de células escamosas, solo se observa una disminución parcial de la maduración epitelial, pero aumenta la hiperplasia de células basales y el espesor del epitelio, o se hallan cambios papilomatosos leves de la capa epitelial. Poco a poco desaparecen la polaridad basal y la orientación celular. Los núcleos se tornan irregulares e hiper cromáticos y presentan una configuración cromatínica anómala que se observa en grumos gruesos. Se observa un mayor número de mitosis, principalmente en las capas epiteliales basal y media. Las capas epiteliales superiores pueden presentar coilocitosis como consecuencia de la multiplicación vírica secundaria a la infección por VPH, o carecer de ella. En la displasia leve o moderada la coilocitosis puede ser signo indicativo de la multiplicación de tipos de bajo riesgo de VPH, que se mantienen episómicos; este tipo de displasia casi siempre es reversible. No obstante, si la infección corresponde a tipos de alto riesgo de VPH, el ADN vírico puede quedar integrado en el genoma celular. Este factor, además de la mera expresión desregulada de los oncogenes víricos E6 y E7 en las células basales y parabasales, puede propiciar aún más la progresión maligna de las lesiones cervicales precancerosas e iniciar cambios malignos. Los cambios displásicos se inician en la unión escamocolumnar y generalmente están ubicados en ese sitio; se originan a partir de la capa basal del epitelio regenerado del exocérvix.

Diagnóstico diferencial

Es probable que sea posible distinguir entre la displasia con coilocitos reversible y la irreversible en este estadio inicial identificando el tipo de riesgo que supone el virus. Si se detecta un tipo de bajo grado se considera lesión reversible, pero si es de alto grado no es posible definir la reversibilidad determinando únicamente el tipo de VPH. Cuanto más alto es el grado de displasia, más alta es la proporción de infecciones por VPH de alto riesgo.

En la displasia severa con diferenciación escamosa (NIC 3), desaparece casi por completo la maduración epitelial y aumentan considerablemente los cambios nucleares (agrandamiento, cromatina en grumos, polimorfismo, hiper cromasia) y el número de mitosis. Puesto que los coilocitos solo pueden formarse en células maduras son menos numerosos que en la displasia leve o moderada. Por lo general, el epitelio displásico es bastante alto, puede estar cubierto por una gruesa capa de paraqueratosis y puede formar gruesas papilas que se adentren en el estroma subyacente o en la desembocadura de las glándulas endocervicales.

En el carcinoma in situ con diferenciación escamosa (NIC 3) la maduración está ausente. La totalidad del epitelio presenta células neoplásicas poco diferenciadas, que contienen grandes núcleos atípicos e hiper cromáticos desorganizados rodeados de escaso citoplasma. Es frecuente observar mitosis atípicas en todas las capas, pero no coilocitos. Este epitelio neoplásico se origina

de la unión escamocolumnar y, desde allí, reemplaza grandes zonas de epitelio superficial del exocérnix y del endocérnix. Por lo general está cubierto por una capa de paraqueratosis atípica. La extensión hacia las glándulas es mucho menos diferenciada que la del carcinoma in situ con diferenciación de células de reserva.

Diferenciación a partir de células de reserva.

La displasia leve, moderada o severa con diferenciación de células de reserva del epitelio endocervical, es el proceso que sigue a la hiperplasia de células de reserva. El aumento gradual de la atipia citológica y nuclear se corresponde íntimamente con los diversos grados de displasia escamosa. Puesto que las células de reserva son bipotenciales, a veces se observa maduración irregular y formación de mucina, a menudo en células individuales, presencia de células claras o maduración y queratinización. Es frecuente hallar coilocitosis, la que casi siempre es secundaria a la infección por virus del VPH de alto riesgo. En cuanto a su ubicación, la displasia de células de reserva no siempre está concentrada en la unión escamocolumnar sino sobre ésta, y también puede originarse en cualquier lugar de la mucosa endocervical (epitelio superficial y glándulas).

Si bien es infrecuente, la displasia de células de reserva puede formar estructuras papilares que se asemejen al papiloma pedunculado del exocérnix. Puesto que el carcinoma invasor puede formarse en la base de estas estructuras, es preciso resecarlas por completo y estudiarlas minuciosamente. Debido a que esta proliferación epitelial tiene características histológicas similares a las de la metaplasia transicional, esta lesión recibe el nombre de “papiloma de células transicionales”. Sin embargo, no expresa la citoqueratina 20 lo que siembra algunas dudas acerca de esta interpretación y parece favorecer la hipótesis del origen de células de reserva (Mulleriana).

El carcinoma in situ con diferenciación de células de reserva también presenta ausencia completa de la maduración y núcleos atípicos en grupos muy compactos, los que, por lo general, son alargados y más pequeños que los del tipo escamoso. Es frecuente observar figuras mitóticas atípicas, tales como metafases con triadas de cromosomas. No se observan coilocitos debido a la ausencia de células maduras en las capas superiores. El escasísimo citoplasma de las células tumorales puede presentar diferenciación completa en algunas zonas, por lo que se observa queratina o mucina, o vacuolización citoplasmática. A diferencia del carcinoma in situ con diferenciación escamosa, el carcinoma in situ de células de reserva a menudo compromete las glándulas y, en el estado no invasor, puede diseminarse por zonas extensas de la mucosa endocervical.

Diagnóstico diferencial

En la mayor parte de los casos, es posible diferenciar los dos tipos de displasia y carcinoma in situ con diferenciación de células escamosas o de reserva por su ubicación y diseminación (patrón de crecimiento), además de la variación de la estructura nuclear. En algunos casos los dos tipos aparecen en simultáneo en zonas vecinas. También hay lesiones intermedias que dificultan la distinción entre un tipo y otro, en cuyo caso puede ser de gran ayuda recurrir a métodos inmunohistoquímicos[16, 17].

V.I.V. DIAGNÓSTICO Y TAMIZAJE ACTUAL DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

Puesto que una detección temprana de una anomalía en la cérvix permite un mejor pronóstico de curación, la forma más efectiva de prevenir y controlar el cáncer cervical es a través de diferentes pruebas directas en tejido cervical, in-situ o en laboratorio, que permiten un diagnóstico temprano. Las técnicas que normalmente se usan o se investigan con tal fin son [15,18]:

1. Examen pélvico
2. Citología cervicovaginal exfoliativa tradicional.
3. Citología líquida (Liquid-based cytology, LBC).
4. Prueba cervical automatizada (AutoPapsmears).
5. Prueba del VPH-ADN.
6. Prueba polar (impedancia eléctrica del tejido).
7. Fluorescencia y reflexión óptica inducidas con luz.
8. Colposcopia. Inspección visual del cérvix después de aplicar yoduro Lugol (VILI) o ácido acético (VIA).

Las pruebas convencionales y los protocolos de diagnóstico poseen un número de limitaciones, (ver Tabla 1.1), entre las cuales se encuentran moderada sensibilidad de la prueba de la citología o moderada especificidad de la colposcopia, lo cual frecuentemente conduce a biopsias innecesarias. Según las pautas y recomendaciones imperantes, existen diversos métodos diagnósticos y procedimientos terapéuticos mediante los cuales se puede obtener tejido que permita definir el diagnóstico histológico.

La biopsia excisional guiada mediante colposcopia es un procedimiento puramente diagnóstico, cuyo valor depende casi con exclusividad de la calidad de la colposcopia. Si el exocérnix contiene una lesión sospechosa que no extiende hacia el canal endocervical, es posible realizar una biopsia excisional. Este estudio tiene un valor de predicción limitado si la lesión se extiende hasta el borde del fragmento de tejido resecado, estos bordes pueden llegar a ser mejor definidos con apoyo de otro tipo de iluminación adaptada al estudio colposcópico y con la medición espectroscópica de las lesiones encontradas, método ya utilizado en otros estudios para delimitar tumores cerebrales [16].

Si el estudio citológico es positivo, pero no se visualiza ninguna lesión en el estudio macroscópico ni en la colposcopia, es preciso tomar una biopsia en cono para analizar la totalidad de la unión escamocolumnar. Este procedimiento también está indicado si una biopsia excisional previa de una lesión que presentaba características macroscópicas sospechosas demuestra que no se reseca por completo el epitelio precanceroso no invasor. La biopsia excisional de los tumores malignos nunca brinda información completa acerca de la profundidad de la invasión. Si los signos clínicos no permiten definir la profundidad de la invasión, este procedimiento es imprescindible. El

hecho de que se introduzcan nuevos métodos que permitan la visualización de cambios histológicos no observables con los métodos ya establecidos, pudiera disminuir los procedimientos invasivos como lo es el cono diagnóstico, que en pacientes jóvenes compromete la continencia istmito-cervical. Con el fin de disminuir esta complicación, se introdujo la escisión electroquirúrgica con asa (LEEP), sin embargo, la desventaja de este procedimiento es que no permite estudiar los bordes porque se electrocoagulan: si el epitelio neoplásico llega a la zona electrocoagulada, no es posible garantizar que la resección haya sido completa [16].

Ni la prueba de Papanicolau, ni la biopsia dirigida por colposcopia proporcionan información diagnóstica en tiempo real. Con el fin de diagnosticar lesiones normalmente no detectadas y reducir el número de biopsias innecesarias, es que se investigan actualmente métodos sustitutos o de apoyo que produzcan una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

Hacia fines del siglo XX se inicio una intensiva investigación sobre el uso de la espectroscopia óptica como apoyo a la colposcopia rutinaria para reducir los costos en las pruebas y observación y para mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG). Para esto se han usado las espectroscopias de fluorescencia y de reflexión difusa y la mezcla de ambas, tanto en forma puntual a través de fibras ópticas, o a través de la imagen completa del cérvix (denominada imagen multispectral)[13].

Tabla 1.1. Exactitud y características de diferentes pruebas en la detección de lesiones NIC 2-3 y cáncer invasivo en países en vías de desarrollo [19,20].

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Características
Citología cervical	Moderada(44-78%)	Alta(91-96%)	Requiere de una infraestructura de salud adecuada: Laboratorio y entrenamiento y control de calidad riguroso.
HPV-DNA	Alta (66-100%)	Moderada(61-96%)	Requiere de laboratorio: alto rendimiento; objetividad, reproducibilidad y robustez; costoso.
VIA	Moderada(67-79%)	Baja(49-86%)	Baja tecnología: bajo costo; ligada a la posibilidad de un tratamiento inmediato; apropiada para lugares con bajos recursos.
VIAM	Moderada(62-73%)	Baja(86-87%)	Baja tecnología: bajo costo; ligada a la posibilidad de un tratamiento inmediato; apropiada para lugares con bajos recursos.
VILI	Moderada(78-98%)	Baja(73-93%)	Baja tecnología: bajo costo; ligada a la posibilidad de un tratamiento inmediato; apropiada para lugares con bajos recursos.
Colposcopia	Baja(44-77%)	Baja(85-90%)	Costosa: no apropiada para lugares con bajos recursos.
Polar	Moderada(67-74%)	Baja(65-72%)	Alta tecnología: proporciona resultados inmediatos y puede ligarse a un tratamiento inmediato.

V.IIFUNDAMENTOS ÓPTICOS.

V.II.I-FENÓMENOS DE INTERACCIÓN LUZ-TEJIDO BIOLÓGICO

El tejido biológico es un medio complejo y heterogéneo especialmente a escala microscópica, por lo cual es considerado como un medio turbio. En la figura 2.1 se representan la variedad de procesos que ocurren cuando la luz incide sobre la superficie del tejido. Cuando este se irradia con luz se producen diversos fenómenos como la reflexión especular, la refracción, el esparcimiento, la transmisión, la absorción y la fluorescencia. Todos estos fenómenos dependen de las propiedades de la luz incidente, así como de las propiedades ópticas del tejido biológico [21, 5]. Específicamente la reflexión, absorción, el esparcimiento y la fluorescencia juegan un papel fundamental en la espectroscopia óptica en tejidos.

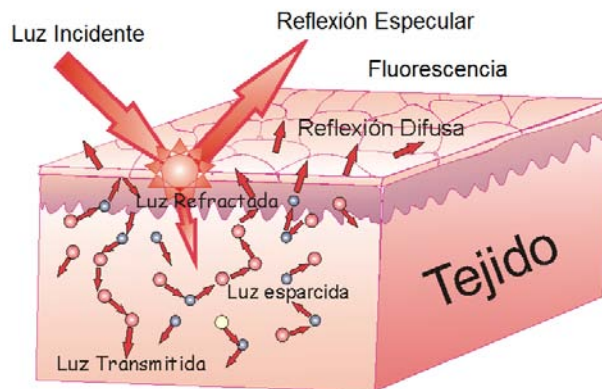


Figura 2.1 Esquema representativo de los diversos fenómenos presentes en la interacción de la luz con el tejido biológico.

REFLEXIÓN

La reflexión ocurre cuando los rayos de luz (fotones) que inciden en la superficie de un material chocan en ella. En la superficie parte de la luz es regresada al medio incidente, fenómeno que es denominado reflexión especular, y parte de esta penetra en el material. Cuando se trata de un material no homogéneo como lo es el tejido biológico, la luz que penetra sufre múltiples eventos de esparcimiento elástico (desviación de fotones debido a las zonas de no homogeneidad del tejido), así como algún evento de absorción como consecuencia de la presencia de diferentes cromóforos en el tejido. Los fotones esparcidos eventualmente abandonan el tejido por el medio incidente, aunque en diferentes coordenadas a las de su incidencia, fenómeno que es denominado reflexión difusa. La reflexión especular es gobernada por las ecuaciones de Fresnel y por lo tanto

contiene únicamente información acerca del índice de refracción del tejido [8]. La reflectancia difusa es una técnica que consiste en la detección y el análisis de la fracción de los fotones que son capaces de retornar a la superficie del tejido después de los eventos de esparcimiento (ver figura 2.1) [9,22,23].

ABSORCIÓN

Si la energía de un fotón que incide sobre un átomo es igual a la energía necesaria para llevar un electrón de dicho átomo a un estado energético superior, es decir, un estado energético superior al estado base, habrá absorción [5,8 ,18]. Cuando el electrón excitado se relaja de un nivel energético superior a uno inferior, por ley de conservación de energía, la energía que pierde el electrón al relajarse, se transfiere en forma de calor o luminiscencia. En el tejido biológico existen diversas sustancias absorbentes (también llamados cromóforos), entre ellos podemos encontrar la hemoglobina (Hb), la desoxihemoglobina (HbO₂), el agua (H₂O), carotenos, lípidos, melanina, proteínas entre otros. Un ejemplo de la aplicación de la medición de la absorción es la determinación de la cantidad de hemoglobina y desoxihemoglobina con lo cual es posible estimar el grado de vascularización del tejido así como la saturación de oxígeno del mismo. En la tabla 2.1 se listan los principales cromóforos en tejido biológico [5,8 ,6]. En la figura 2.2 se muestran los espectros de absorción de los principales cromóforos en tejido biológico.

Tabla 2.1 Resumen de los principales cromóforos presentes en tejido biológico en la región UV-NIR (del ultravioleta hasta el infrarrojo cercano) del espectro electromagnético, su descripción y puntos de absorción máxima.

Cromóforo	Descripción	Absorción Máxima (nm)
Agua		760, 900, 1250, 1400
Hemoglobina Oxigenada	Proteína	280, 420, 540, 580
Desoxihemoglobina	Proteína	430, 550, 750
Bilirrubina	Pigmento	460
Carotenos	Pigmento	780
Melanina	Pigmento	400-700
DNA, RNA	Ácidos Nucleicos	258

Cuando se irradia la superficie de un tejido, la intensidad de la luz se va atenuando conforme penetra los tejidos debido al efecto de absorción en los mismos. La profundidad de

penetración de la luz, definida como la distancia desde la superficie de incidencia a la profundidad del tejido a la cual la luz incidente se ha reducido a un 33%, es inversamente proporcional al coeficiente de absorción. Es decir, entre mayor capacidad tenga el tejido de absorber la luz que se le incide, menor será la profundidad a la cual esta luz pueda penetrar. En las tablas 2.2 y 2.3 y gráfica 2.1 se muestran los parámetros ópticos más relevantes para tejido cervical escamoso normal in-vivo y **LIEAG** (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado).

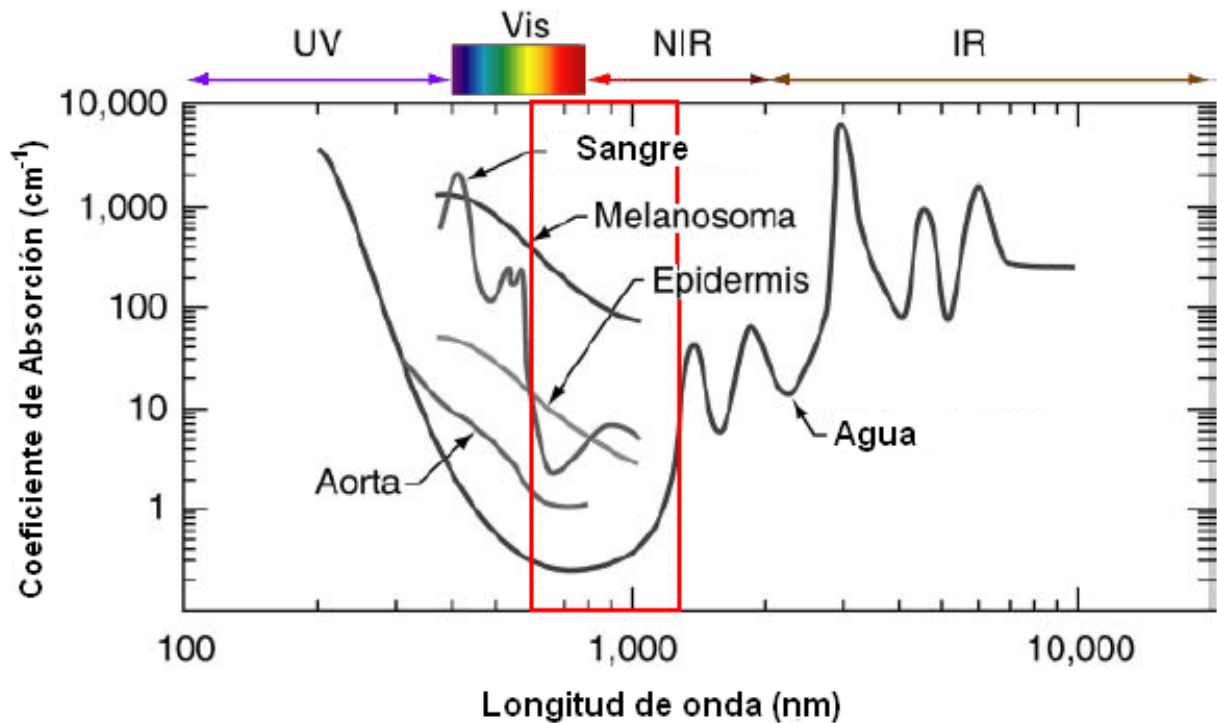


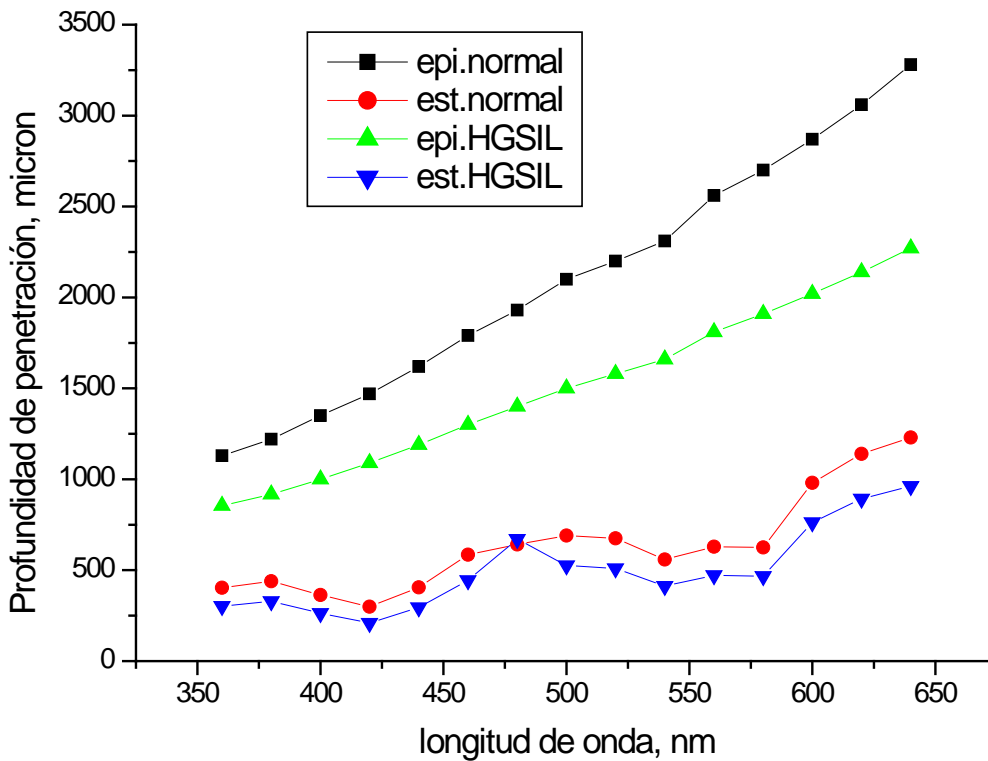
Fig. 2.2 Espectros de absorción de los principales cromóforos en tejido biológico. Se observa que al irradiar luz amarilla en epidermis, esta tiene un coeficiente de absorción (capacidad de absorción) aproximado de 10 cm^{-1} , y un melanosoma tiene coeficiente de absorción de 900 cm^{-1} , lo cual quiere decir, que la luz amarilla penetra en mayor distancia a la epidermis que al melanosoma. (TuaVo-Dinh, Biomedical Photonics Handbook, 2nd Edition.)

Tabla 2.2 Coeficientes de absorción, esparcimiento, esparcimiento reducido y profundidad de penetración para tejido cervical escamoso normal in-vivo. Se consideran factores de anisotropía de 0.95 para el epitelio y 0.88 para el estroma.(N. M. Marin, “Autofluorescence and diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy”, Dissertation, University of Texas at Austin, 2005, 105-106.)

Longitud de onda λ [nm]	Coeficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$ del epitelio [mm ⁻¹]	Coeficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Coeficiente de esparcimiento $\mu_s(\lambda)$ del epitelio [mm ⁻¹]	Coeficiente de esparcimiento $\mu_s(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Coeficiente de esparcimiento reducido $\mu_{s,r}(\lambda)$ del epitelio [mm ⁻¹]	Coeficiente de esparcimiento reducido $\mu_{s,r}(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Profundidad de penetración efectiva $1/\mu_{ef}$ en el epitelio [mm]	Profundidad de penetración efectiva $1/\mu_{ef}$ en el estroma [mm]
360	0.4	0.485	4.95	31.06	0.2475	3.7272	1.13	0.403
380	0.37	0.438	4.69	29.43	0.2345	3.5316	1.22	0.439
400	0.33	0.635	4.46	27.96	0.223	3.3552	1.35	0.364
420	0.3	0.909	4.24	26.63	0.212	3.1956	1.47	0.299
440	0.27	0.562	4.05	25.42	0.2025	3.0504	1.62	0.405
460	0.24	0.303	3.87	24.31	0.1935	2.9172	1.79	0.585
480	0.22	0.265	3.71	23.3	0.1855	2.796	1.93	0.641
500	0.2	0.241	3.56	22.37	0.178	2.6844	2.1	0.690
520	0.19	0.260	3.43	21.51	0.1715	2.5812	2.2	0.675
540	0.18	0.373	3.3	20.71	0.165	2.4852	2.31	0.559
560	0.16	0.311	3.18	19.97	0.159	2.3964	2.56	0.629
580	0.15	0.322	3.07	19.28	0.1535	2.3136	2.7	0.625
600	0.14	0.146	2.97	18.64	0.1485	2.2368	2.87	0.980
620	0.13	0.113	2.87	18.04	0.1435	2.1648	3.06	1.14
640	0.12	0.101	2.78	17.47	0.139	2.0964	3.28	1.23

Tabla 2.3 Coeficientes de absorción, esparcimiento, esparcimiento reducido y profundidad de penetración para tejido cervical LIEAG. Se consideran factores de anisotropía de 0.95 para el epitelio y 0.88 para el estroma.(N. M. Marin, “Autofluorescence and diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy”, Dissertation, University of Texas at Austin, 2005, 105-106).

Longitud onda λ [nm]	Coefficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$ de epitelio [mm ⁻¹]	Coefficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Coefficiente de esparcimiento $\mu_s(\lambda)$ del epitelio [mm ⁻¹]	Coefficiente de esparcimiento $\mu_s(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Coefficiente de esparcimiento reducido $\mu_{sr}(\lambda)$ del epitelio [mm ⁻¹]	Coefficiente de esparcimiento reducido $\mu_{sr}(\lambda)$ del estroma [mm ⁻¹]	Profundidad de penetración efectiva $1/\mu_{ef}$ en el epitelio [mm]	Profundidad de penetración efectiva $1/\mu_{ef}$ en el estroma [μm]
360	0.4	0.97	14.85	23.3	0.7425	2.796	0.855	302
380	0.37	0.876	14.07	22.07	0.7035	2.6484	0.917	329
400	0.33	1.27	13.38	20.97	0.669	2.5164	1.0	263
420	0.3	1.818	12.72	19.97	0.636	2.3964	1.09	209
440	0.27	1.124	12.15	19.07	0.6075	2.2884	1.19	295
460	0.24	0.606	11.61	18.23	0.5805	2.1876	1.3	444
480	0.22	0.53	11.13	17.48	0.5565	2.0976	1.4	671
500	0.2	0.482	10.68	16.78	0.534	2.0136	1.5	526
520	0.19	0.52	10.29	16.13	0.5145	1.9356	1.58	510
540	0.18	0.746	9.9	15.53	0.495	1.8636	1.66	413
560	0.16	0.622	9.54	14.98	0.477	1.7976	1.81	472
580	0.15	0.644	9.21	14.46	0.4605	1.7352	1.91	467
600	0.14	0.292	8.91	13.98	0.4455	1.6776	2.02	763
620	0.13	0.226	8.61	13.53	0.4305	1.6236	2.14	893
640	0.12	0.202	8.34	13.1	0.417	1.572	2.27	962



GRÁFICA 2.1. Se observan las distintas profundidades a las cuales diferentes longitudes de onda del espectro de luz logran penetrar el tejido. Esto nos da una idea del nivel tisular al cual la biopsia óptica analiza los tejidos irradiados. Se grafica una mayor profundidad de penetración de la luz en tejido sano cervical, tanto en el epitelio como en el estroma del mismo. En una lesión de alto grado, la profundidad de penetración es menor.

ESPARCIMIENTO

El esparcimiento se refiere al fenómeno en el cual un fotón es desviado de su dirección incidente después de interactuar con una molécula en el tejido. Existen principalmente dos tipos de esparcimiento: elástico e inelástico. Si la frecuencia (color) de los fotones esparcidos es igual a la frecuencia de los fotones incidentes, el esparcimiento es llamado elástico, pero si la frecuencia (color) de los fotones incidentes y los esparcidos es diferente, se le conoce como esparcimiento inelástico. Es decir, si incido luz roja sobre un material y como resultado obtengo esparcimiento visible del mismo color (rojo), estamos hablando de un esparcimiento elástico; si incido luz ultravioleta sobre un material (no visible al ojo humano) y como resultado obtengo esparcimiento visible (morado, verde, rojo, etc), estamos ante un fenómeno de esparcimiento inelástico (por ejemplo el fenómeno de fluorescencia). Los principales esparcidos de tipo elástico en tejido biológico incluyen núcleos celulares, mitocondrias, keratina y fibras de colágeno [6, 7]. El esparcimiento elástico en el tejido biológico depende del tamaño, la forma y la densidad de

esparcidos en el medio. Por lo tanto la reflectancia difusa proporciona información acerca de la morfología del tejido, el tamaño, forma y densidad de las células.

FLUORESCENCIA

Existen sustancias que absorben la energía de la luz incidente de cierta longitud de onda (color) y luego re-emiten parte de ésta energía a una mayor longitud de onda (color diferente al de la luz absorbida). A este fenómeno se le llama luminiscencia y se produce por la excitación de los átomos constituyentes de la sustancia a niveles altos de energía. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado la luminiscencia se puede dividir en dos categorías: fluorescencia, ocurre cuando inmediatamente después de que se deja iluminar el cuerpo este deja de remitir luz (la reemisión solo dura unas cuantas milésimas de microsegundos después de que el material se ha dejado de irradiar) y; fosforescencia, ocurre cuando después de dejar de iluminar el cuerpo este sigue irradiando por varios microsegundos o incluso segundos[9, 22].

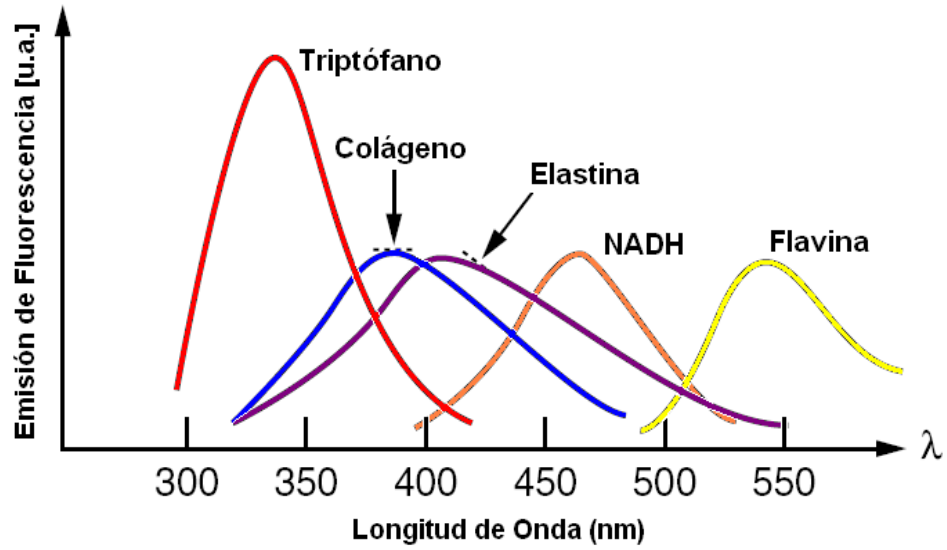
Fluorescencia en tejido biológico

En el tejido biológico hay una gran variedad de material fluorescente, denominados fluoróforos. Entre estos se encuentran diversas coenzimas y enzimas tales como el NADH, NADPH, FAD, proteínas como el colágeno y la elastina, aminoácidos como el triptófano y la tirosina, así como diversas vitaminas y porfirinas. En la tabla 2.4y gráficas 2.2 y 2.3 se presenta un resumen de los principales fluoróforos en tejido biológico, así como las principales longitudes de onda de absorción y emisión de fluorescencia de cada uno de ellos [23, 6]. La fluorescencia emitida por estos fluoróforos es conocida como fluorescencia endógena o autofluorescencia.

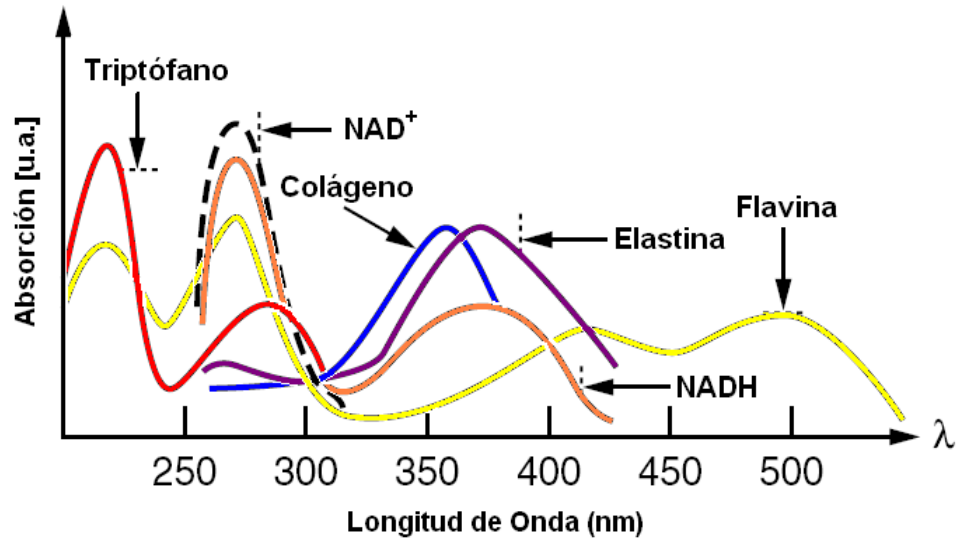
Además del gran número de fluoróforos endógenos, se han creado diversos fluoróforos exógenos. Algunos de ellos son utilizados principalmente en la terapia fotodinámica (PDT) y en la demarcación de algunos tumores. Así mismo, algunos otros son empleados para etiquetar proteínas, tales como la fluoresceína, rodamina isocianatos e isotiocianatos, entre otros. La fluorescencia producida por estos colorantes es conocida como fluorescencia exógena.

Tabla 2.4 Longitud de onda de excitación y emisión máxima de los diversos fluoróforos en tejido biológico [23].

Fluoróforo	Descripción	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)
Triptofano	Aminoácido	280	350
Tirosina	Aminoácido	275	300
Fenilalanina	Aminoácido	260	280
Colageno	Proteína Estructural	325	400, 405
Elastina	Proteína Estructural	290, 325	340j, 400
FAD, Flavinas	Enzimas/Coenzimas	450	535
NADH	Enzimas/Coenzimas	290, 351	440, 460
NADPH	Enzimas/Coenzimas	336	464
Vitamina A	Vitaminas	327	510
Vitamina K	Vitaminas	335	480
Vitamina D	Vitaminas	390	480
Piridoxina	Vitamina B6	332, 340	400
Priidoxamina	Vitamina B6	335	400
Vitamina B12	Vitamina B6	275	305
Fosfolípidos	Lípidos	436	540, 560
Ceroides	Lípidos	340-395	430-460, 540
Porfirinas	Porfirinas	400-450	630, 690



Gráfica 2.2 Espectros de absorción de fluoróforos presentes en tejido [24].



Gráfica 2.3 Espectros de fluorescencia de fluoróforos presentes en tejido [24].

ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DIFUSA

Como se ha mencionado, cuando se ilumina un material no homogéneo como lo es el tejido biológico, parte de la luz que incide penetra en la muestra y parte es reflejada en la superficie en forma especular. Los fotones que llegan a penetrar el tejido pueden sufrir múltiples eventos de esparcimiento elástico (desviación en la dirección en que viajan), así como algún evento de absorción como consecuencia de la presencia de diferentes cromóforos (materia que absorbe luz) en el tejido, ver figura 2.2. La reflectancia difusa es una técnica que consiste en la detección y el análisis de la fracción de los fotones que son capaces de retornar a la superficie del tejido después de estos múltiples eventos de esparcimiento, ver figura 2.1.

V.II.II APLICACIONES DE ÓPTICA EN DETECCIÓN DE CÁNCER

En el laboratorio de láseres de ESIME-Zacatenco del Instituto Politécnico Nacional se ha desarrollado equipo totalmente portátil que permite realizar mediciones de fluorescencia y reflexión óptica difusa en tejido biológico (Fig. 2.3). La flexibilidad del equipo ha permitido que médicos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía utilizaran el equipo para realizar mediciones de fluorescencia y reflexión en tejido biológico en biopsias con cáncer de piel y cáncer cerebral, y posteriormente en pacientes con estos padecimientos. Esto con la finalidad de observarse existen diferencias en los espectros de los tejidos sanos y enfermos.

A diferencia de un sistema convencional, el equipo desarrollado cuenta con dos fuentes de luz. Una de tipo ultravioleta para medir fluorescencia y otra blanca para medir reflexión difusa, ambas fuentes de luz son de tipo LED. El analizador de la luz a medir es un mini-espectrómetro de CCD, con el cual se puede obtener un espectro en una sola exhibición sin necesidad de realizar un barrido a través del intervalo de longitudes de onda que se desee medir. El sistema al ser un equipo portátil y de un tamaño relativamente pequeño, facilitó el proceso de medición principalmente en instalaciones en donde se cuenta con espacios reducidos, como el departamento de dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González. Igualmente en quirófanos de neurocirugía como los del Instituto Nacional de Neurología y del Hospital Civil de Guadalajara, el equipo se instala fácilmente y es de fácil uso para el neurocirujano [25].

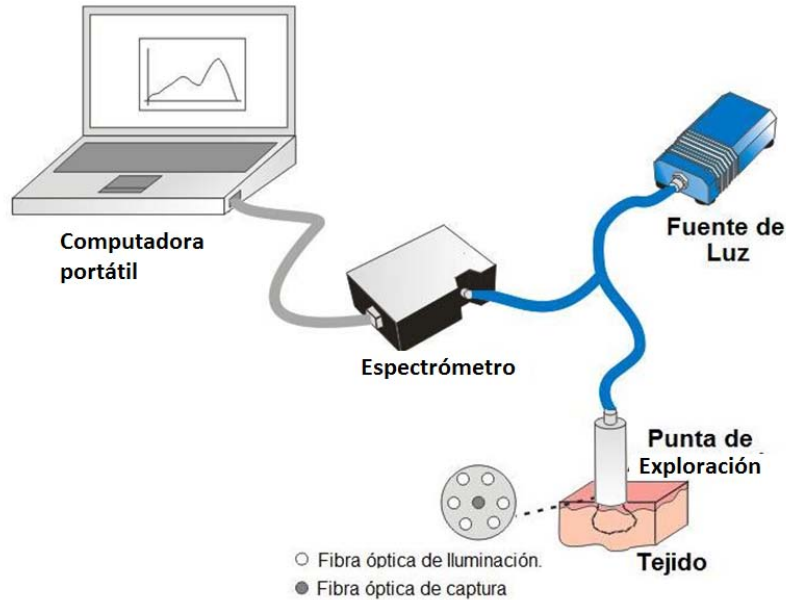
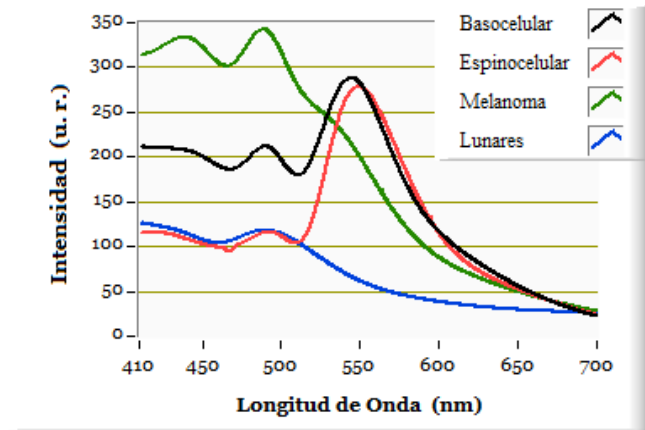


Figura 2.3 Esquema general del sistema para cuantificar la fluorescencia y la reflectancia difusa.

Fluorescencia de Biopsias con Cáncer de Piel.

Se capturaron espectros de fluorescencia de 30 biopsias con cáncer de piel y 10 biopsias de lunares considerados como sanos. Las biopsias fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en un cubo de parafina. Previamente fueron diagnosticadas por histólogos y patólogos del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Los resultados obtenidos mostraron que en los espectros de fluorescencia de las biopsias con diferente tipo de cáncer de piel y lunares sanos (Gráfica 2.4) existieron diferencias en su patrón de fluorescencia. Los espectros de carcinoma basocelular y espinocelular presentaron un patrón semejante con dos picos de emisión cerca de 490 y 547 nm, aunque en el carcinoma basocelular es más intensa la fluorescencia entre 410 y 510 nm en comparación con el carcinoma espinocelular. En contraste, el espectro de melanoma así como el de lunar no presentaron picos de emisión alrededor de 547 nm. Sin embargo, se observaron emisiones máximas en 438 y 488 nm para el caso del melanoma y solamente en 488 nm para el lunar. Estos dos últimos espectros tienen forma semejante aunque sus intensidades son diferentes. Los cuatro espectros presentaron un pico de emisión alrededor de 490 nm, aunque existió diferencia en sus amplitudes. En general se observó que los espectros de las biopsias obtenidas fueron diferentes tanto en el patrón, como en la intensidad de la fluorescencia.

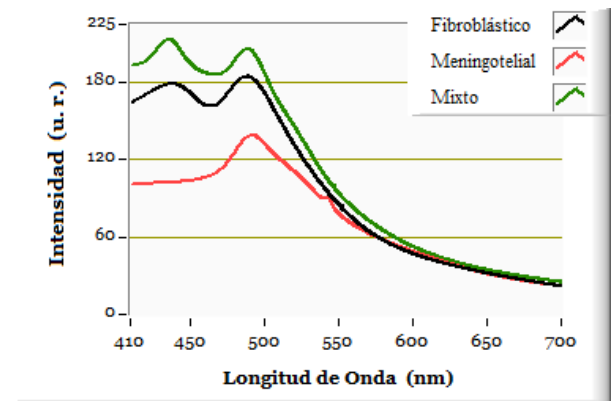


Gráfica 2.4. Espectros de fluorescencia en biopsias con cáncer de piel[25].

Fluorescencia de Biopsias de Meningiomas Cerebrales.

Se capturaron espectros de fluorescencia de 32 biopsias de meningiomas cerebrales fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en un cubo de parafina, previamente fueron diagnosticadas por histólogos y patólogos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

En las mediciones realizadas en biopsias de meningiomas cerebrales (Grafica2.5) no se observó una diferencia notable entre los espectros de meningiomas fibroblásticos y mixtos, pero si se observó la presencia de fibra colágena, la cual es característica de este tipo de tumores y fluoresce entre 365 y 475 nm al ser excitada en 365 nm. Para el caso de los espectros de meningiomas meningoteliales, sólo existió una disminución en la intensidad del espectro y no se percibió la presencia de fibra colágena. Sólo se observó un máximo de emisión en 489 nm, mientras que en los meningiomas fibroblásticos y mixtos se observaron emisiones máximas en 436 y 489 nm.

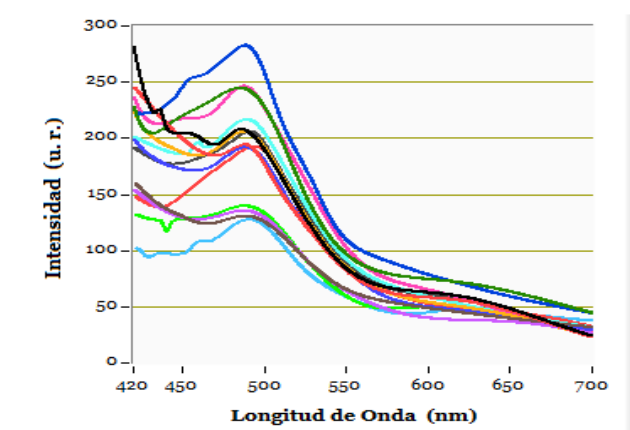


Gráfica 2.5. Espectros de fluorescencia de biopsias de meningiomas cerebrales[25].

Fluorescencia en Tejido Cutáneo (Piel).

Se realizaron mediciones *in vivo* en lesiones valorados por los especialistas como cáncer de piel. La captura de los espectros se llevó a cabo en el departamento de dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González y participaron 8 pacientes: 4 pacientes con carcinoma basocelular, 3 pacientes con nevomelanocítico y 1 carcinoma espinocelular

En estas mediciones, en contraste a las biopsias, sólo se observó fluorescencia en las zonas perilesionales (tejido considerado sano por los especialistas) con emisión máxima alrededor de 487 nm (Gráfica 2.6). En las zonas de lesión no se observó fluorescencia.



Gráfica 2.6 Espectros de fluorescencia de pacientes con cáncer de piel. (Cada color corresponde a un paciente)[25].

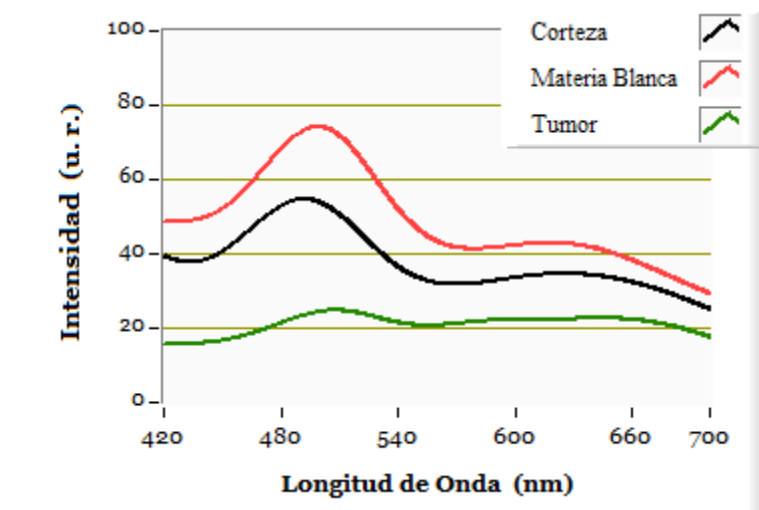
Fluorescencia en Tejido Cerebral.

Durante intervenciones quirúrgicas llevadas a cabo tanto en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de México, como en el Hospital Civil de Guadalajara, cuya finalidad fue el de extraer la mayor cantidad de tejido tumoral tipo Glioblastoma Multiforme (GBM), el cual es el cáncer de cerebro más agresivo. Se capturaron espectros de fluorescencia con el objetivo de observar las diferencias entre tejido cerebral afectado por Glioblastoma en comparación al tejido cerebral sano. Durante la captura de los espectros la luz de fondo del cuarto de cirugía fue temporalmente apagada, y durante este tiempo la sonda (fibra óptica) fue colocada directamente sobre el tejido sin que el neurocirujano ejerciera presión alguna sobre la punta (Fig. 2.4) [26].



Figura 2.4. Captura de espectros realizada por el neurocirujano[26].

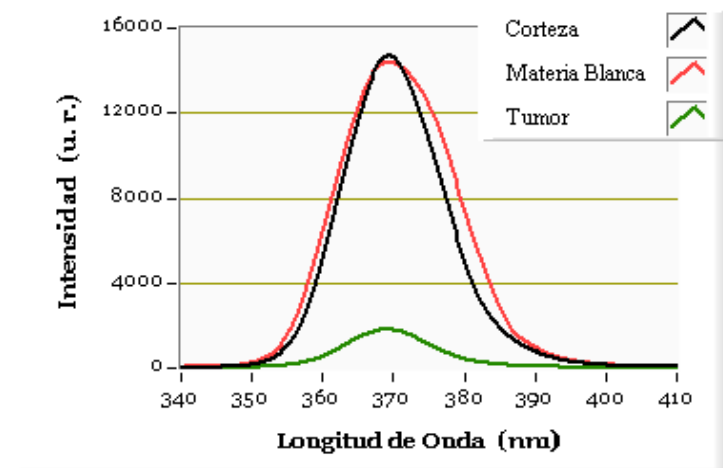
Las mediciones realizadas *in vivo* en tejido cerebral con Glioblastoma Multiforme, mostraron que el tejido sano (corteza cerebral y materia blanca), presentó fluorescencia en el intervalo de 400 a 750nm con una emisión máxima alrededor de 490nm, en comparación al tejido tumoral en el cual la fluorescencia es débil. (Gráfica 2.7).



Gráfica 2.7 Espectros de fluorescencia obtenidos de tejido cerebral[26].

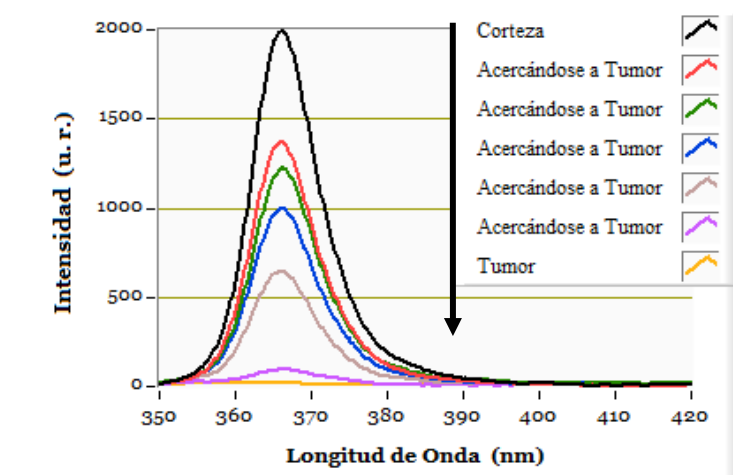
No en todas las mediciones realizadas se logró observar un espectro de fluorescencia, sin embargo, la luz de excitación reflejada (alrededor de 365nm) tuvo un comportamiento

característico. Se observó una mayor reflexión en corteza y en materia blanca comparado con el tejido tumoral, como se puede observar en la gráfica 2.8.



Gráfica 2.8 Reflexión de la luz de excitación por el tejido cerebral[26].

Observando este comportamiento de la reflexión, se realizaron mediciones en un paciente con GBM perfectamente localizado, colocando la punta de prueba desde una distancia alrededor de 1cm de la zona tumoral, y se fue acercando la punta poco a poco hasta llegar a la zona del tumor. Los resultados obtenidos fueron semejantes en comparación a lo presentado en la gráfica 2.9. Se observó que al acercar la punta hacia el tumor, la reflexión de luz disminuye gradualmente hasta que al estar en el tumor prácticamente no se observa ni fluorescencia ni reflexión. Los espectros obtenidos se presentan en la gráfica 2.9.



Gráfica 2.9 Espectros de reflexión obtenidos al acercar la fibra desde la corteza cerebral hacia el tumor[26].

Las mediciones de fluorescencia demostraron que existen claras diferencias entre los espectros del tejido sano y el tejido tumoral, por tanto se debe continuar la captura de espectros para posteriormente, ya con información suficiente, plantear criterios de clasificación que permitan distinguir entre el tejido sano y aquel con algún tipo de lesión. De esta manera sería posible desarrollar una herramienta auxiliar para los médicos en el diagnóstico temprano de cáncer y la delimitación quirúrgica tumoral.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 DESARROLLO DEL SISTEMA PARA LA MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA Y REFLECTANCIA DIFUSA.

En la fig. 2.3 se muestra un esquema general del sistema para la medición de fluorescencia y reflectancia difusa. Su operación consiste en alimentar luz a la entrada de una fibra óptica bifurcada para iluminar con la punta de exploración el tejido a estudiar. Dicha punta cuenta con una fibra para capturar parte de la luz fluorescente y reflejada en el tejido para ser llevada al espectrómetro en donde se obtiene el espectro correspondiente y se almacena en la computadora.

Las características de los componentes del sistema son:

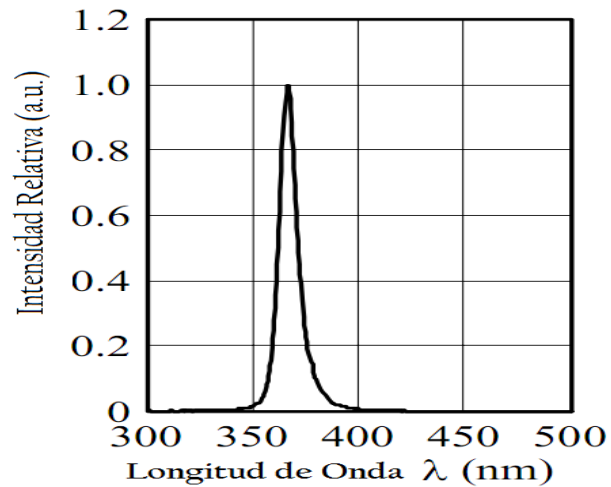
a) Fuente de Luz

Como fuente de luz se utilizaron los diodos LED's indicados en la tabla 3.1.

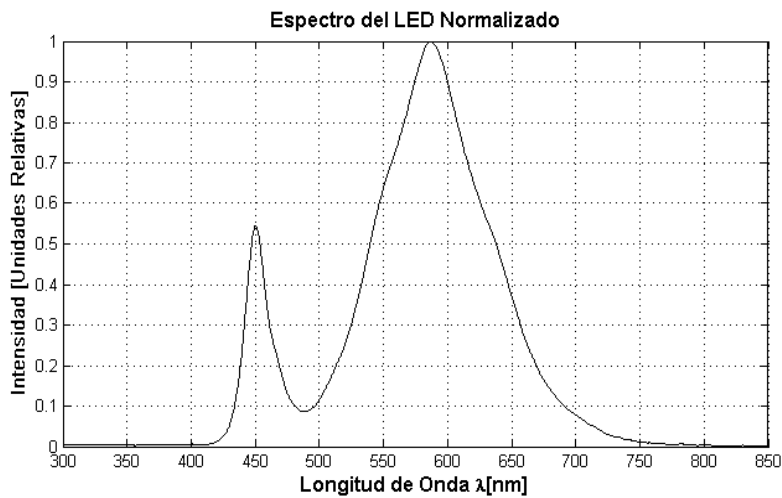
Tabla 3.1 Características principales de los diferentes LEDs empleados como fuentes de iluminación para el sistema de fluorescencia y reflectancia difusa. (FWHM -Full Width at Half Maximum)

LED	Longitud de Onda (nm)	Color	FWHM (nm)	Potencia Óptica (W)
NCSU033A(T) (Nichia, Corp.)	365	Ultra Violeta	9	0.2
405-1WUE (VioletInt)	405	Violeta	15	0.4
440-1WUE (VioletInt)	445	Azul		0.4
LED-P3W200-120/41 (SiLedInt.)	450-750	Blanco cálido	----	3.0

En la gráfica 3.1 se observa el espectro de emisión del LED NCSU033A centrado alrededor de 365 nm. La emisión de los LED's 405-1WUE y 440-1WUE poseen patrones similares, aunque centrados a 405 y 445 nm, respectivamente. El espectro de emisión del LED LED-P3W200-120/41 se muestra en la gráfica 3.2.



Gráfica 3.1. Espectro de emisión del LED NCSU033A centrado alrededor de 365 nm.



Gráfica 3.2. El espectro de emisión del LED LED-P3W200-120/41 (Luz blanca cálida)

b) Espectrómetro

El espectrómetro empleado es el USB4000-VIS-NIR de OceanOptics Corp. El equipo se caracteriza por tener una resolución óptica de 1nm FWHM. (**Full Width at Half Maximum**), así como una amplia respuesta espectral (350-1000nm). Sus dimensiones son de 87 mm x 62 mm x 31 mm. El espectrómetro puede ser conectado a una PC o una computadora portátil por medio del puerto USB, de esta manera el equipo se energiza y controlado directamente desde un puerto USB de la computadora, esto es una gran ventaja porque elimina el uso de una fuente de alimentación externa.

c) Fibra Óptica Bifurcada.

Se utilizó la fibra bifurcada QR400-UV-VIS de la firma OceanOptics, la cual se muestra en la figura 2.19 a). Esta fibra consiste de un arreglo en "Y" de 7 fibras individuales: un conjunto de 6 fibras para iluminación en un extremo y una sola fibra de lectura en el otro extremo. En el extremo común del arreglo "Y" las seis fibras de iluminación se encuentran alrededor de la fibra de lectura, tal y como se muestra en la figura 3.5b. Todas las fibras tienen un diámetro de 400 μm , una apertura numérica de 0.22 y pueden trabajar en un intervalo de longitud de onda desde la región ultravioleta hasta el visible (250-800 nm).

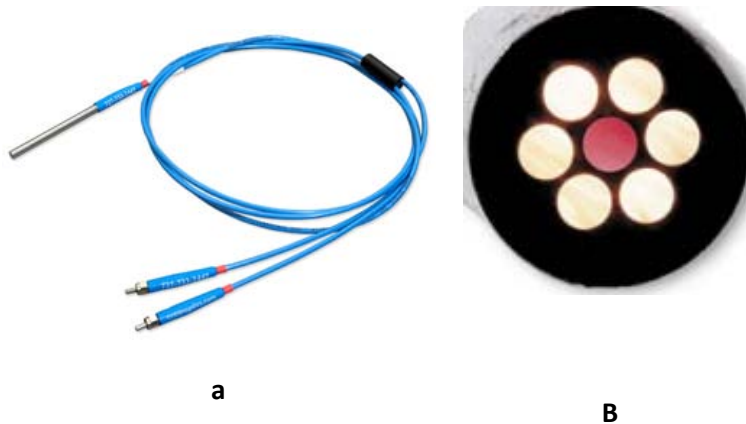


Fig.3.1 Fibra Óptica Bifurcada: a) QR400-UV-VIS, b) Configuración de las fibras.

d) Computadora.

La computadora usada es una Mac. Book Pro, con esta se controla tanto el espectrómetro como a la fuente de corriente de cada LED. En la figura 3.2 se muestra la interfaz gráfica con la cual esta es operada. Del lado izquierdo se encuentran diferentes controles, los parámetros de tales controles deben ser establecidos antes de operar el espectrómetro.

1. *Tiempo de Integración*. Es el tiempo elegido por el usuario para que el detector del espectrómetro realice la captura de un espectro.
2. *Tipo de Medición*. Con este control se configura el programa para realizar mediciones de absorbancia, transmitancia, reflectancia y scope.
3. *Boxcar*. Es una técnica que se emplea para suavizar el espectro medido.
4. *Potencia y LED*. Estos controles son empleados para elegir la fuente de excitación LED con la que se desea irradiar la muestra y establecer la potencia de irradiación.
5. *Botón Oscuro*. Es utilizado para capturar el espectro de fondo (offset o espectro oscuro) que es generado por los detectores del espectrómetro en ausencia de luz.
6. *Botón Restar Oscuro*. Este control es utilizado para restar el espectro oscuro y establecer el espectro a medir a un nivel de referencia cero.
7. *Botón Referencia*. Este control almacena el espectro de la fuente de luz con la cual próximos espectros capturados serán comparados. Se utiliza principalmente en el modo de medición de absorbancia, transmitancia y reflectancia.
8. *Botón Iniciar*. Inicia la operación del espectrómetro y la fuente de excitación luminosa luz seleccionada.
9. *Botón Guardar*. Almacena el espectro en cuestión deseado por el usuario.
10. *Botón Salir*. Termina la operación del software.
11. *VISA Espectrómetro y VISA Fuente de Luz*. Estos controles son de carácter esencial pues el software de control se comunica con los dispositivos por medio de la arquitectura NI-VISA. En estos controles se indica la dirección asociada con el VID (Vendor ID) y PID (Product ID) de cada dispositivo para poder establecer la comunicación.

La fotografía 3.1 muestra el sistema desarrollado para la medición de fluorescencia y reflectancia difusa.



Fotografía 3.1 Fotografía del sistema de medición de fluorescencia y reflectancia difusa.

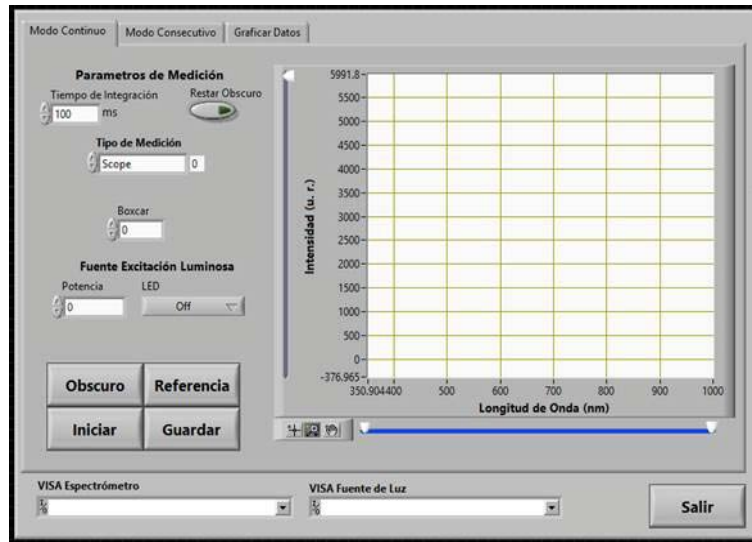


Figura 3.2 Panel frontal del software de control desarrollado. Modo de operación continuo

VI.II.ADAPTACIÓN DEL COLPOSCOPIO PARA CAPTURA DE IMÁGENES

El colposcopio usado en el laboratorio de Colposcopia del Hospital Juárez es el OCS 500 de la marca Olympus el cual cuenta con una con una fuente de luz halógena CLH-SC, una fibra óptica OCS5-LG para introducir la luz al cuerpo del microscopio Zoom OCS5-ZB, y un sistema de video OTV-SC para poder observar las imágenes en un monitor de TV. Para esta investigación se realizaron las siguientes modificaciones en este sistema:

- 1.- Se sustituyó la fuente de luz halógena CLH-SC y la fibra óptica OCS5-LG por los diodos de luz mostrados en la Tabla 3.1. Estos se acoplaron directamente al cuerpo del microscopio Zoom OCS5-ZB.



Fotografía 3.2 Fuente de luz basada en LED para iluminación y captura de imágenes del colposcopio. Esta se acopla al colposcopio a través de una platina circular de aluminio.

2.-Se instalo una tarjeta ENUTV-4 para conectar el sistema de video OTV-SC a una laptop en donde se capturan las imágenes deseadas.

El equipo de medición de fluorescencia y reflexión es capaz de iluminar el tejido cervical a diferente longitud de onda en el rango de luz ultravioleta y de captar la luz emitida por el tejido después de ser iluminado, transportándola posteriormente a través de fibra óptica a un espectrofluorómetro, el cual procesa la información de los fotones emitidos y los transforma en señales eléctricas. Estas señales son transferidas a un equipo de cómputo y procesadas por un programa que las traduce en intensidad de luz. De acuerdo a la intensidad de luz emitida (medida en wats por cm²), esta es expresada en función de las longitudes de onda del espectro de luz (medida en nm). El programa se encarga de graficar estas dos variables y guardar la información de cada tejido medido. Con dicha información se alimentara una red neuronal para encontrar criterios de pre-diagnóstico.



Fotografía 3.3. Sistema de iluminación acoplado al colposcopio y fibra óptica para medición de reflectancia y fluorescencia

VI.III.SELECCIÓN DE LAS PACIENTES Y REALIZACIÓN DE ESTUDIO

1. Se tomo una muestra de 40 pacientes del servicio de colposcopia del Hospital Juárez de México (HMJ) con las siguientes características:

Criterios de inclusión

Pacientes que hayan iniciado vida sexual.

Pacientes mayores de 18 años.

Pacientes con citología reciente del HJM (menos de un año de antigüedad) negativa.

Pacientes con colposcopia realizada en el HJM negativa.

Pacientes con diagnóstico de infección por virus de papiloma humano con PCR negativo.

Criterios de exclusión

Pacientes con tratamiento colposcópico previo (electrocirugía, criocirugía y láser).

Pacientes embarazadas.

Pacientes previamente tratadas por Cáncer cervicouterino.

Criterios de eliminación

Pacientes que no deseen continuar en el protocolo de estudio

2. Se cito nuevamente a las pacientes para estudio colposcópico en el HJM, y previa explicación del procedimiento y objetivos del estudio, así como firma de consentimiento informado por la paciente y su familiar, se realizó el siguiente procedimiento:

1) Se adapta el equipo de medición de reflectancia difusa y fluorescencia, así como el de captura de imágenes, al colposcopio.

2) Se coloca a las pacientes en posición ginecológica

3) Se introduce espejo vaginal de acero inoxidable (material que no interviene con los fenómenos ópticos) sin lubricante, para ubicar cérvix.

4) Se ilumina cuello uterino con el LED de luz blanca acoplado al colposcopio.

5) Se retira exceso de secreciones o sangrado de cuello uterino con gasa seca.

6) Se capturan imágenes con la iluminación de LED de luz blanca.

7) Se coloca la sonda de fibra óptica bifurcada, alimentada también con luz blanca, en contacto directo con tejido cervical visiblemente sano por aproximadamente 2 segundos, hasta que se

registra el espectro de reflexión de la luz blanca en la computadora. Se retira la sonda y el LED de luz blanca del colposcopio.

8) Se adapta el LED de luz ultravioleta al colposcopio y se toma la imagen correspondiente.

9) Se coloca la sonda de fibra óptica bifurcada, alimentada también con luz ultravioleta, en contacto directo con tejido cervical, hasta que se registra el espectro de reflexión de la luz ultravioleta y fluorescencia visible en la computadora. Se retira la sonda y el LED de luz ultravioleta del colposcopio.

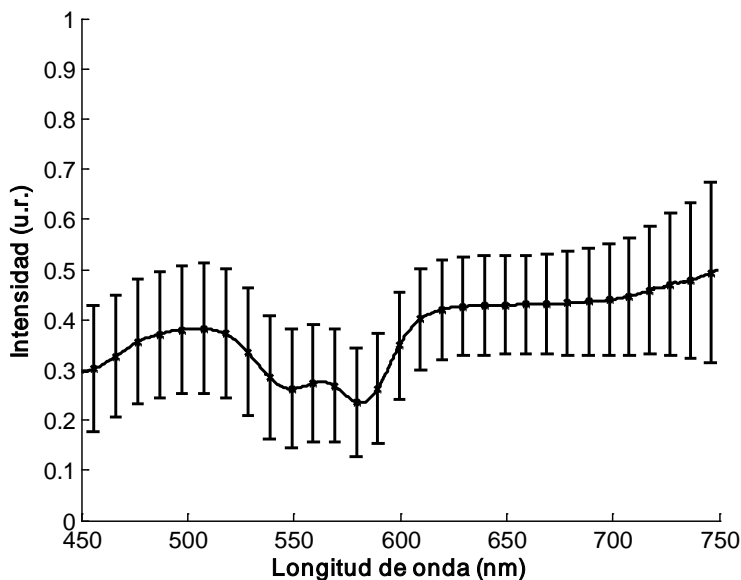
10) Se realiza el mismo procedimiento con luz violeta y luz azul.

11) Se retira espejo vaginal, se muestran las imágenes a las pacientes y se da por terminado el procedimiento.

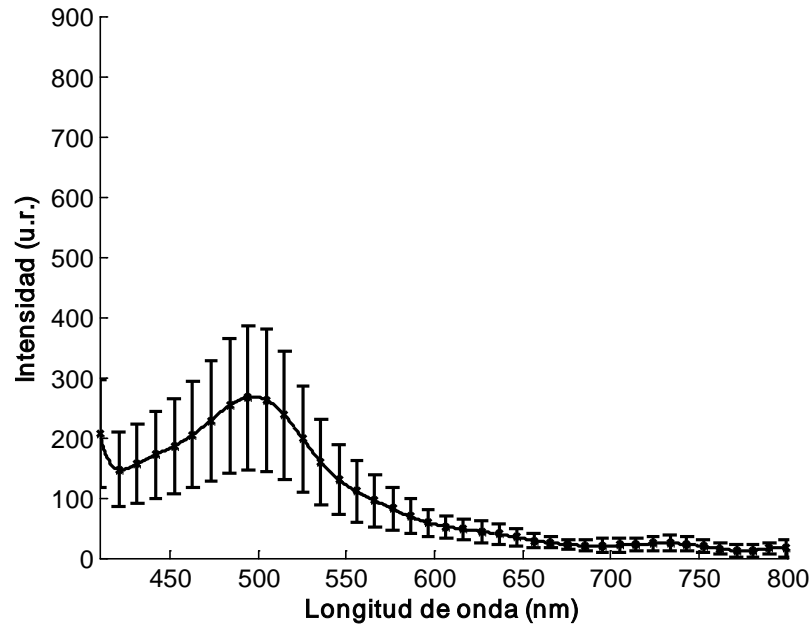
VII. RESULTADOS

En la Tabla 4.1 se muestran las imágenes de cérvix de pacientes sanas, diagnosticadas por los métodos convencionales, iluminadas con luz blanca, ultravioleta, violeta y azul. Se observa fenómeno de reflexión de la luz blanca como aumento de brillo en las zonas con mayor elevación del cérvix, el cual desaparece a la movilización del espejo vaginal. Con iluminación con luz ultravioleta (365 nm) se manifiesta, aunque muy tenue, el fenómeno de fluorescencia de tejido sano. Con iluminación violeta, se observa claramente el fenómeno de fluorescencia manifestado con luz roja el cual es producto de la vascularidad del sitio irradiado. En las últimas dos pacientes se visualiza en la iluminación con violeta heterogeneidad cervical a expensas de zonas que demuestran respuesta diferente a la luz (fenómeno de fluorescencia que difiere del demostrado por vascularidad en el rango del rojo) con respecto al resto de la muestra. Estas imágenes, no desaparecen a la movilización del espejo vaginal.

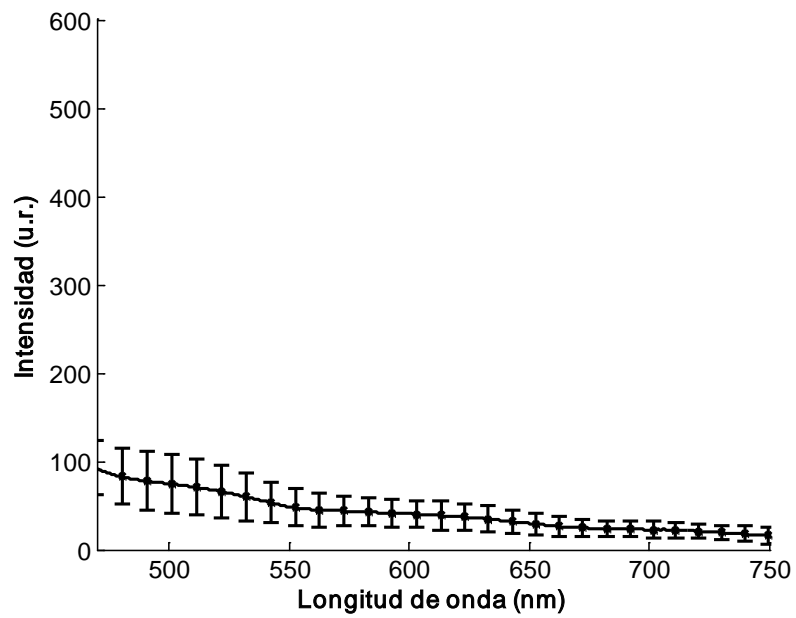
En la tabla 4.2 se muestran los espectros de fluorescencia y reflectancia difusa graficados por el equipo de medición con la sonda bifurcada. Se obtuvieron las distintas muestras de tejido sano tomadas por la sonda en una paciente con los diferentes tipos de LED. Posteriormente, se obtuvo el promedio de todas las muestras tomadas para cada tipo de LED, esto, para ambos fenómenos; reflectancia en luz blanca y fluorescencia en las demás. Se calcularon desviaciones estándar y se obtuvieron los siguientes espectros.



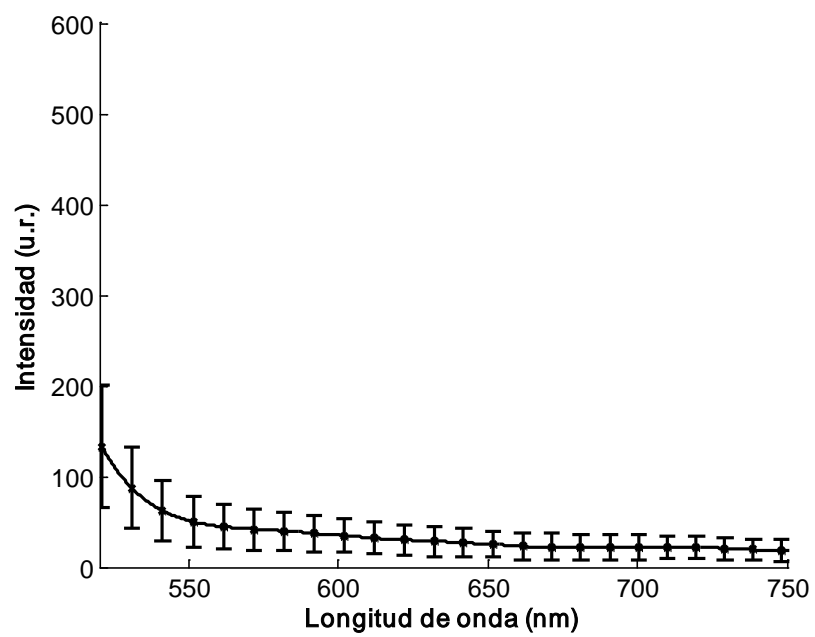
GRÁFICA 7.1. Espectro de reflectancia difusa del tejido cervical sano al ser iluminado con luz blanca



GRÁFICA 7.2 Espectro de fluorescencia de tejido cervical sano al ser iluminado con luz ultravioleta


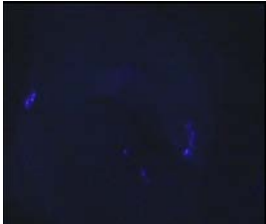
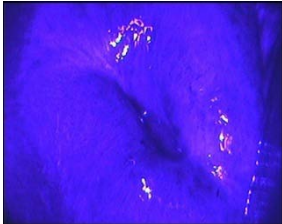
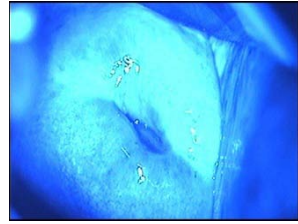

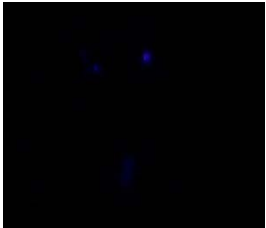
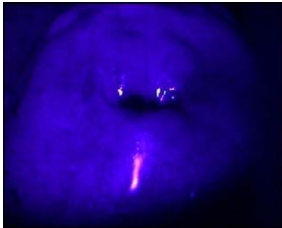
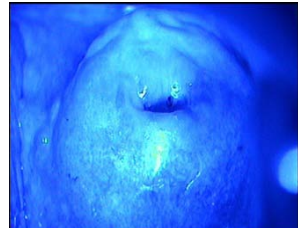

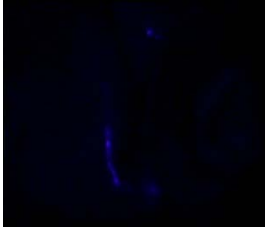
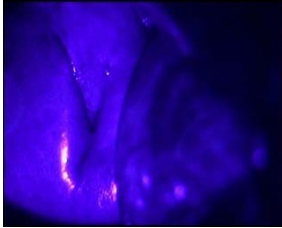
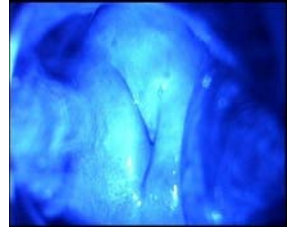

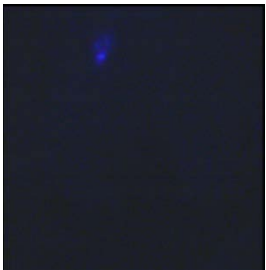
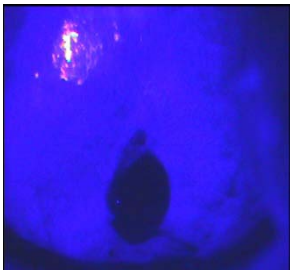
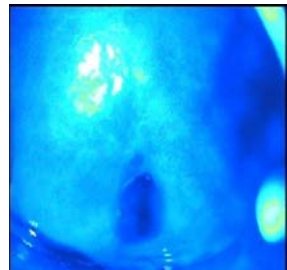


GRÁFICA 7.3 Espectro de fluorescencia de tejido cervical sano al ser iluminado con luz violeta



GRÁFICA 7.4. Espectro de fluorescencia de tejido cervical sano al ser iluminado con luz azul

TABLA 4.1.- Imágenes de Cérnix en pacientes sanas bajo diferentes fuentes de iluminación.

PACIENTE 1	LUZ ULTRAVIOLETA	LUZ VIOLETA	LUZ AZUL
			
<p>PACIENTE 2</p> 			
<p>PACIENTE 3</p> 			
<p>PACIENTE 4</p> 			

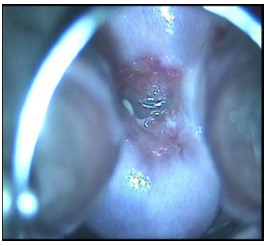

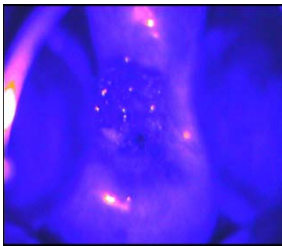
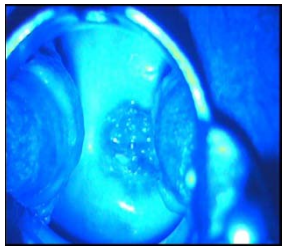
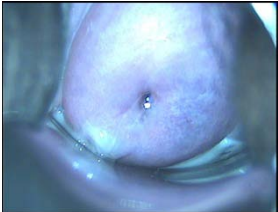
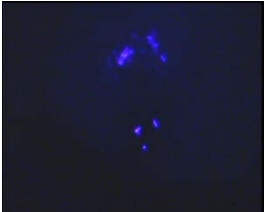
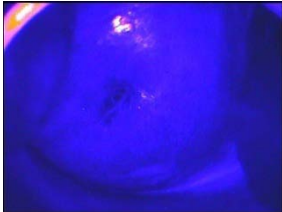
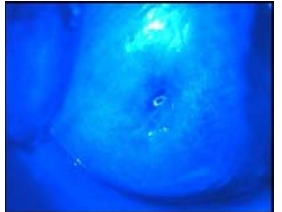

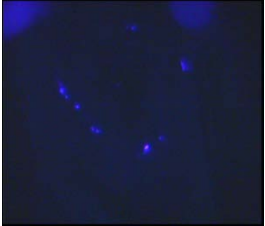
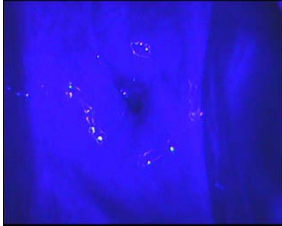
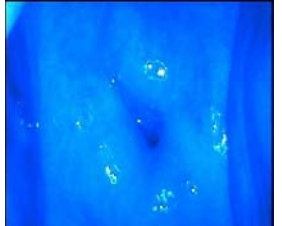


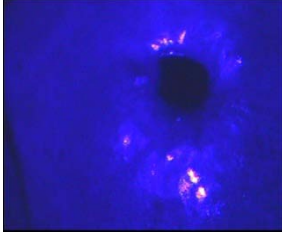
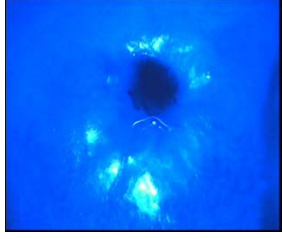
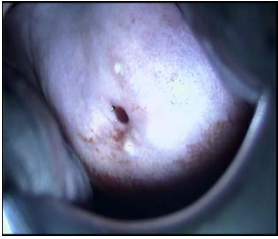

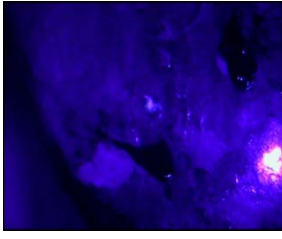
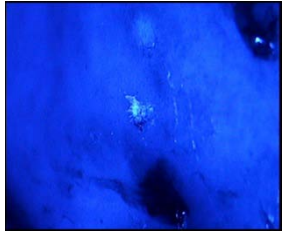
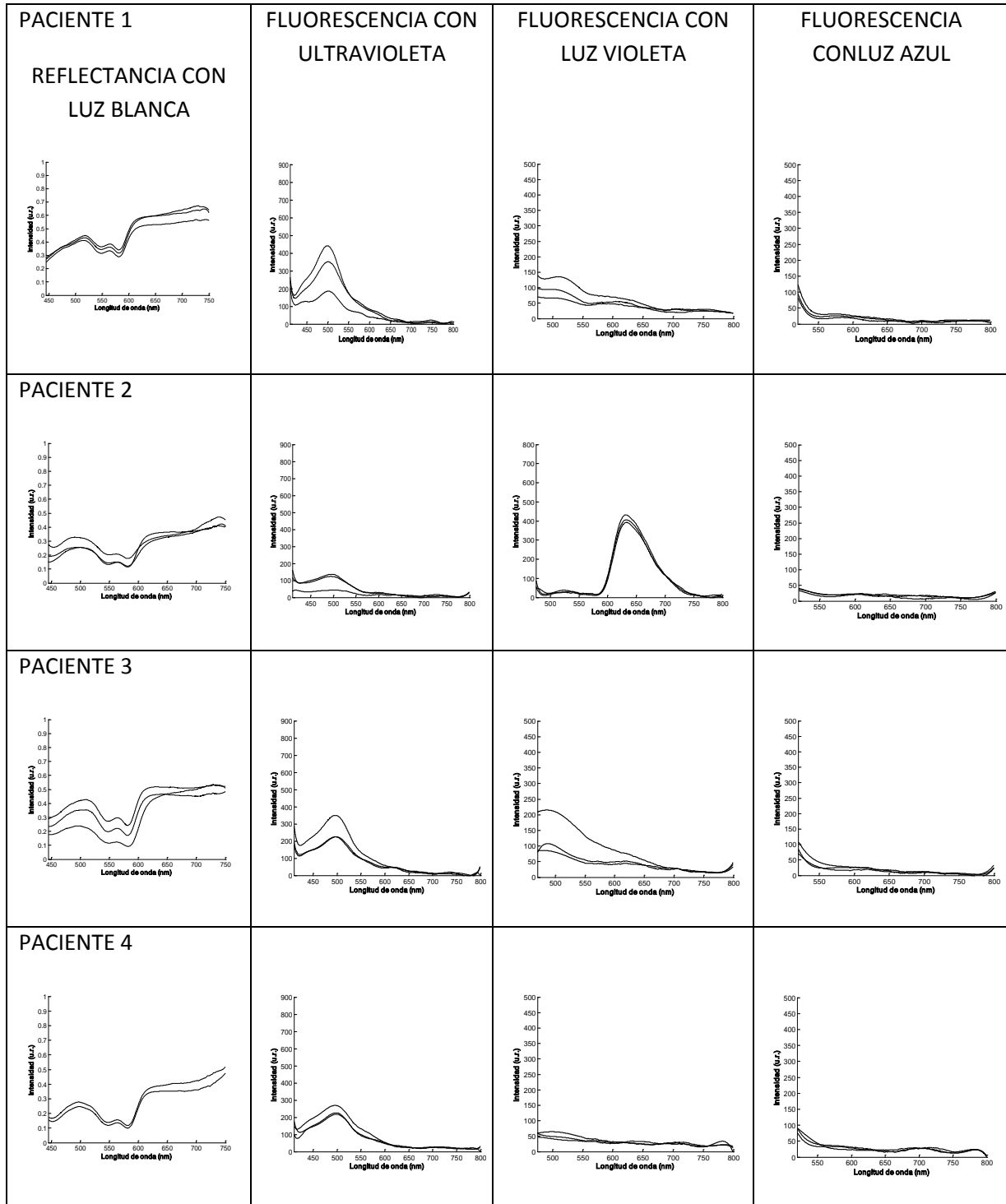
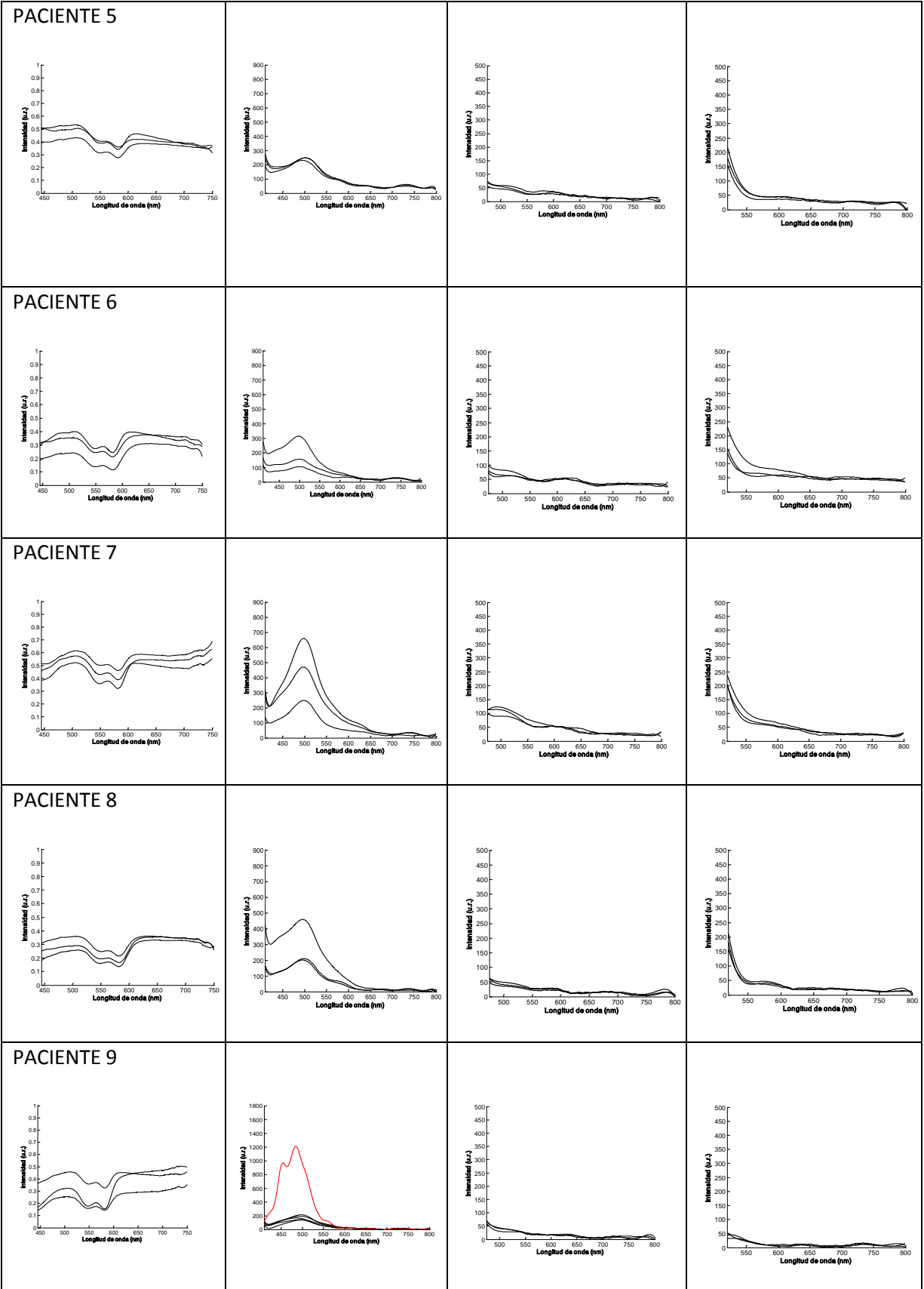
<p>PACIENTE 5</p> 			
<p>PACIENTE 6</p> 			
<p>PACIENTE 7</p> 			
<p>PACIENTE 8</p> 			
<p>PACIENTE 9</p> 			

TABLA 4.2 Espectros de reflectancia difusa y fluorescencia en pacientes sanas diagnosticadas por métodos convencionales.

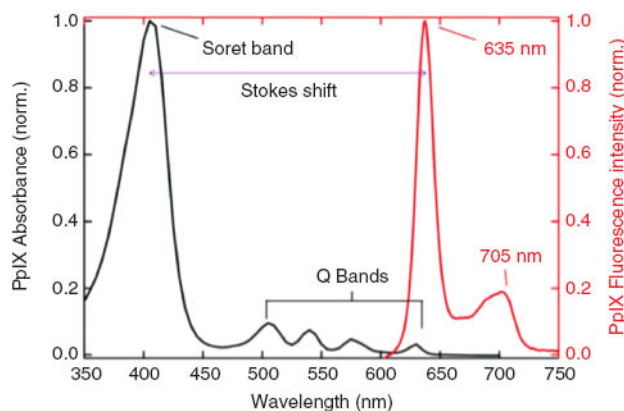




ANÁLISIS DE RESULTADOS

Obtención de imágenes:

En los resultados observacionales, el 95% de las pacientes presentaron los mismos patrones imagenológicos al ser iluminados con los cuatro espectros de luz. Se observaron fenómenos de fluorescencia cuando se iluminó con luz ultravioleta y violeta. Con luz azul y blanca solo se observa reflexión. El fenómeno de fluorescencia más evidente observado visualmente en estas pacientes fue el emitido por las zonas mayormente irrigadas y se observaron como manchas rojas. La luz violeta es fuertemente absorbida por la sangre en la banda de Soret (ver figura 2.2 y gráfica 7.5) con una alta eficiencia de fluorescencia en el rojo. Con lo anterior, podemos decir que al analizar el tejido cervical con luz violeta, la fluorescencia nos arroja información sobre la vascularización del tejido.



Gráfica 7.5. Absorción y fluorescencia de la protoporfirina 9 (K. R. Rollakanti, S. C.- Kanik. S. C. Davis, B. W. Pogue, E. V. Maytin, "Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy" Photonics and Lasers in Medicine, Vol. 2,4, 2013).

Estas imágenes, representan en este estudio piloto las características visuales de una muestra colposcópica de una paciente sana, al iluminar con espectros de luz blanca, ultravioleta, violeta y azul.

Solo el 5% de las pacientes presentó patrones distintos. Estas diferencias solo se observaron en los rangos del violeta y el azul, con mayor definición en el violeta. Se observaron fenómenos de fluorescencia en la zona de transformación, que si bien, no pueden ser bien caracterizados de manera objetiva por imagen, se pueden caracterizar a través de la medición del espectro de reflectancia y fluorescencia.

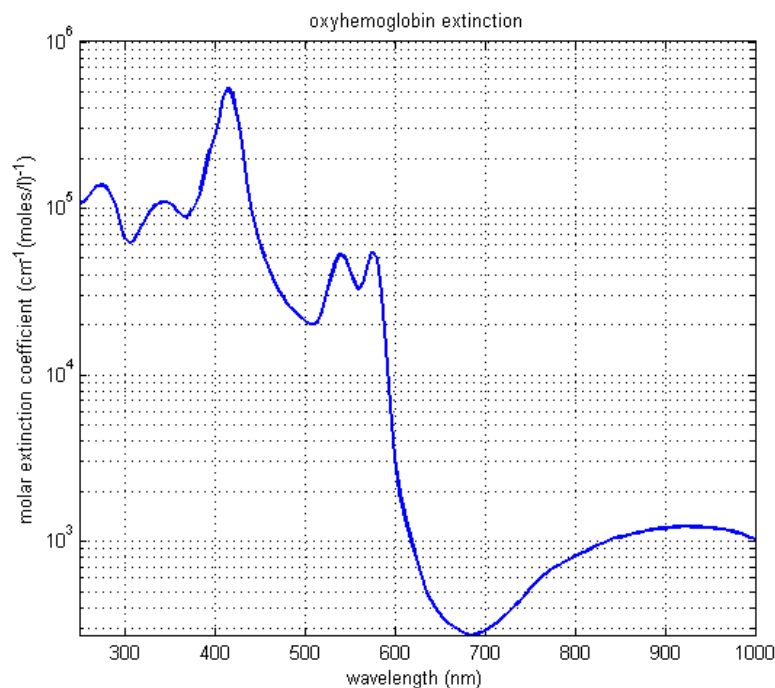
De acuerdo a la literatura la luz ultravioleta (365 nm) y violeta (405 nm) tiene una profundidad de penetración del orden de 1.1 mm en tejido cervical sano. Cuando este es irradiado por medio de la punta de auscultación la luz reflejada en la interfaz es aproximadamente el 0.34 % de la luz incidente. Lo anterior debido a la diferencia entre los índices de refracción del cuarzo

(1.54) y del epitelio (1.37)(Q. Wong, *Dissertation "In situ measurement of epithelial tissue optical properties: Development and implementation of diffuse reflectance spectroscopy techniques"*, Chapter 5 "Optical property measurement of layered tissue". Pro Quest 2009, UMI Microform 3359316).

Cuando el tejido es irradiado por un LED desde cierta distancia la reflexión en la interfaz es aproximadamente del 2.43 %. Lo anterior debido a la diferencia entre los índices de refracción del aire (1.0) y del epitelio (1.37). Por tal motivo, al igual que con la iluminación directa sobre el tejido, es posible observar fenómenos de fluorescencia iluminando a distancia a través del colposcopio con luz ultravioleta o violeta.

Obtención de espectros

Al obtener los espectros de reflectancia difusa de todas las pacientes observamos el mismo patrón, el cual presenta disminución de la reflexión en el rango de 500 a 600 nm, mostrando la característica W dependiente de la vascularidad; fenómeno ya reportado en investigaciones anteriores (ver gráfica 7.6). Podemos concluir que la reflexión del tejido cervical sano se mantiene alrededor de un 40% de la luz que se le incide en todo el espectro visible, excepto en el intervalo de 500 a 600 nm, donde baja a alrededor del 25%.



Scott Prahl, "Optical absorption of hemoglobin" Oregon Medical Laser Center omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html (Consultado el 22 de Julio de 2014)

Por otro lado, la iluminación con luz ultravioleta induce fluorescencia en el tejido sano con picos alrededor de 250 unidades arbitrarias observados en el rango de 400 a 500 nm. Este fenómeno de fluorescencia fue el más evidente en todas las muestras.

No se obtuvo fluorescencia visiblemente significativa (por arriba de 100 unidades arbitrarias) al ser iluminado con luz violeta, excepto en la paciente número 2, quien mostró picos de fluorescencia alrededor de 400 unidades arbitrarias en el intervalo de 600 a 700 nm. Este patrón espectral, se ha reportado como de malignidad en estudios de cáncer laríngeo y de colon (S.Andersson, J. Johansson, K. Svanberg, S. Svanberg. "Fluorescence imaging and point measurement of tissue: Applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue" *Photochemistry and Photobiology*, Vol.53, No. 6, pp. 807-814, 1991). Se ha demostrado la presencia de protoporfirina 9 en los tejidos que presentan este fenómeno, lo que hace suponer aumento de la irrigación de dichos tejidos, es decir, tejidos con alto potencial de malignidad (Y.Wu, J.Y.Qu, "Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissue" *Journal of Biomedical Optics* 11(5), 054023 p.p. 1-11,2006)

No se obtuvo fluorescencia visiblemente significativa (por arriba de 100 unidades arbitrarias) al ser iluminado con luz azul.

Las muestras de la paciente número 9 demostraron fenómenos con diferencias visiblemente significativas. El espectro de fluorescencia inducido por el UV de un punto específico dado (identificado como un punto heterogéneo con las imágenes en violeta y azul), además de presentar modificaciones en el patrón previamente obtenido por las demás muestras de la misma paciente, presentó un elevado aumento de intensidad en el intervalo de 430 a 530 nm (alrededor de 1000 a 1200 unidades arbitrarias), el cual se desvió incluso de la desviación estándar ya calculada en el espectro de fluorescencia en el UV de todas las pacientes.

VIII.-CONCLUSIONES

Se lograron obtener patrones tanto de imagen, como de forma de los espectros de reflectancia difusa y fluorescencia para pacientes con tejido cervical sano, lo cual nos corrobora la hipótesis y nos sugiere continuar con el mismo estudio para aumentar el tamaño de la muestra.

Los espectros de fluorescencia del tejido cervical sano son más evidentes con la iluminación a través de la sonda al ser alimentada con luz ultravioleta que con luz violeta o azul.

Los fenómenos de fluorescencia observados con luz violeta, son dependientes de la vascularización del tejido irradiado.

Los hallazgos imagenológicos no esperados se correlacionaron con alteraciones en el patrón de fluorescencia, lo que ya nos hace pensar en la capacidad de discernimiento del equipo.

Se logro la adaptación adecuada tanto de las fuentes de luz, como del equipo de medición de reflectancia y fluorescencia al colposcopio.

RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO A FUTURO

Considerando la nitidez de las imágenes y la posibilidad de visualización directa de fenómenos que se observan con luz violeta, y que no se observan con luz blanca, este tipo de LED se debe tomar en cuenta para la visualización y toma de imágenes de estudios posteriores.

Durante la toma de los estudios, se encontraron ciertas dificultades técnicas que se fueron corrigiendo y que se continuarán modificando para facilitar el procedimiento.

Queda por definir los fluoroporos que hacen que en tejido sano presente fluorescencia en el UV para el mejor entendimiento de la histopatología del CaCu.

Después de obtener una curva de normalidad con una muestra representativa, se debe continuar con pacientes que muestran anomalías en los estudios convencionales.

IX. REFERENCIAS

- [1] Wallboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., et al. **“Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer Worldwide.”** J Pathol 1999; 189:12-9.
- [2] Madrigal de Campa M.A., Lascano Ponce E.C., Infante Castañeda C., **“Ginecol Obstet México”** 2005; 73:637-47.
- [3] Hegde D., Shetty P.K., Rai S. **“Diagnostic value of acetic acid comparing with convencional Pap smear in the detection of colposcopic biopsy-proved CIN”.** J Can Res Ther 2011; 7: 454-8
- [4] Puig Tintoré L.M., Tomé A., Jordi. **“Digital colposcopy in cervical intraepithelial neoplasia. Histological correlation and clinical utility”.** Prog. Obstet Ginecol 2001; 44:490-6.
- [5]] <http://drbotaciocolposcopia.com/colposcopia/biografia.htm>
- [6] <http://www.colpomexlab.com.mx/lugol.html>
- [7] Thekkek N., Richards-Kortum R. **“Optical Imaging for cervical cancer detection: solution for a continuing global problem”** Nat. Rev. Cancer 8(9),(2008): 725-731.
- [8] Tan H.J., Wrede CDH. **“New Technologies and advances in colposcopic assessment”.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 25 (2011):667-677.
- [9] Chang S.K., Mirabal Y.N., Atkinson E.N., et al., **“Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer”** J. Biomed. Opt. **10**(2), (2005): 1-11.
- [10] Parekh D.J., Lin WC and Herrell S.D, **“Optical spectroscopy characteristics can differentiate benign and malignant renal tissues: a potentially useful modality”** J. Urol. **174**(5), (2005):1754-1758.
- [11] Bigio I.J. and Mourant J.R., **“Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy”**Phys. Med. Biol. **42**(5),(1997): 803-814
- [12] Prasad N., **“Introduction to Biophotonics”**, John Wiley & Sons, New Jersey (2003)
- [13] Tabrizi S.H., Aghamiri S.M.R., Farzaneh F. and Sterenborg H.J.C.M., **“The use of optical spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer”**, Laser Med. Sci. DOI 10.1007/s10103-013-1288-3, Published on line: 07 March 2013
- [14] Valdespino V.M. and Valdespino V.E., **“Cervical cancerscreening: state of the art”**, Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 18, 2006, 35-40
- [15] Duraysami K., Jaganathan K.S. and Bose J. Ch., **“Methods of detecting cervical cancer”**,Advances in BiologicalResearch, 5(4), 2011, 226-232

- [16] Dallenbach-Hellweg G., Knebel Doeberitz M.V., Trunk M.J., **“Histopatología del cuello uterino”**, Journal, Buenos Aires, 2 da. Ed. 2006
- [17] Flores Flores G., **“Oncología Ginecológica”**, Trillas, México, 2011
- [18] Mitchel M.F., Schottenfeld D., Tortolero-Luna G., Cantor S.B., Richards-Kortum R. **“Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis”**. Obstet. Gynecol. 91(1998):626-631.
- [19] Denny L., Quinn M. and Sankaranarayanan R., **“Chapter 8: Screening for cervical cancer in developing countries”**, Vaccine, 24S3, 2006, S3/71-S3/77.
- [20] Sankaranarayanan R., Gaffikin L., Jacob M, Sellors J. and Robles S., **“A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia”**, International Journal of Gynecology and Obstetrics, 89, 2005, S4-S12.
- [21] <http://www.historiadelamedicina.org/papanicolau.htm>
- [22] Salomatina E., Jiang B., Novak J. and Yaroslavsky A.N., **“Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range”** J. Biomed. Opt. 11(6),(2006) 064026.
- [23] Butte P.V., Mamelak A.N., Nuno M., Bannykh S.I., Black K.L., Marcu L., **“Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors”** Neuroimage. 54(2011) S125-35.
- [24] Brown J.Q., Bydlon T.M., Richards L.M, Yu B., Kennedy S.A., Geradts J., Wilke L.G., Junker M., Gallagher J., Barry W. and Ramanujam N., **“Optical assessment of tumor resection margins in the breast”** IEEE J Sel Top Quantum Electron. 16(3),(2010): 530-544.
- [25] Fabila D.A., de la Rosa J., Stolik S., Moreno E., Domínguez J., Mercado S.M., López T., Álvarez M., Arellano A., Mercado R., Soto J.L.. **“Portable System for Measuring Fluorescence Signals of Biological Tissue”** IEEE Latin American Transactions, USA, Vol. 9, No. 7 (2011) 1012-1017.
- [26] de la Rosa J., Fabila D.A., Hernández L.F., Moreno E., Stolik S., de la Rosa G., Álvarez M., Arellano A., López T., Mercado R., Soto J.L., Arredondo L., Bustos J., Mosqueda A., Rivero I. **“In vivo spectroscopy for detection and treatment of GBM with NPt[®] implantation”** in Nanomedicine and cancer therapies, Apple Academic Press, USA, Chapter 2, April 2012, Pags. 19-30.