



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES
MAESTRÍA EN INGENIERÍAS, ÁREA ELECTRÓNICA



**ESTUDIO DE LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO
UTERINO POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA
FLUORESCENTE NATURAL EN MUESTRAS *EX-VIVO***

DIEGO ROLANDO MAHECHA CAPACHO

Director JÁDER ENRIQUE GUERRERO BERMÚDEZ

Codirector RODRIGO CORREA CELY

Codirector JORGE HUMBERTO ECHEVERRI PERICO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA

2006



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES
MAESTRÍA EN INGENIERÍAS, ÁREA ELECTRÓNICA



**ESTUDIO DE LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO
UTERINO POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA
FLUORESCENTE NATURAL EN MUESTRAS *EX-VIVO***

DIEGO ROLANDO MAHECHA CAPACHO

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA ACCEDER AL TÍTULO DE MAGÍSTER
EN INGENIERÍA EN EL ÁREA DE ELECTRÓNICA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA**

2006

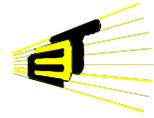


UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES
MAESTRÍA EN INGENIERÍAS, ÁREA ELECTRÓNICA



A mi madre **Libia**, a mi padre **Francisco**
Y a mi hermana **Carolina**

A mis amigos



AGRADECIMIENTOS

A mi director Jáder Enrique Guerrero, codirector Jorge Humberto Echeverri Perico, a la profesora Clara Inés Vargas directora del Departamento de Genética Humana UIS y todo el personal de esa dependencia, al profesor Jorge Mejía adscrito a la Escuela de Química UIS.

A Rosita Milena, Carlos Humberto, Manuel Antonio, Gabriel Alirio, Salvador, Edwin Alberto, David Alejandro, Jenny Victoria, Omar, Pedro Alexander, y a todos aquellos que de alguna forma hicieron posible la realización de este proyecto.



TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	6
INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. APARATO GENITAL FEMENINO	14
1.2. EL CÁNCER DE CERVIX	16
1.1.1. Evolución de las células en el cérvix	16
1.1.2. Métodos de diagnóstico del cáncer cervicouterino	17
1.1.3. Epidemiología del cáncer cervicouterino	21
1.1.4. Papiloma virus	26
1.2. INTRODUCCIÓN A LA LUMINISCENCIA	28
1.3. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA	30
1.3.1. Estados excitados	32
1.3.2. Variables que afectan a la fluorescencia	34
2. LA SENSIBILIDAD Y LA ESPECIFICIDAD	36
3. ESTUDIO DE FLUORESCENCIA EN MUESTRAS <i>EX-VIVO</i>	41
3.1. METODOLOGÍA	42
4. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN MUESTRAS <i>EX-VIVO</i> SIN USO DE FLUOROCROMOS	45
5. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE Y LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN MUESTRAS <i>EX-VIVO</i> SIN USO DE FLUOROCROMOS	51
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	66
ANEXO A. GLOSARIO	66



ANEXO B. ESPECTROELECTROMAGNÉTICO	69
ANEXO C. COENZIMAS RESPONSABLES DE LA FLUORESCENCIA	72
ANEXO D. PROGRAMAS DE REDES NEURONALES	76

LISTADO DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Aparato reproductor femenino	15
Figura 2. Neoplasias malignas del cuello uterino	22
Figura 3. Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente	30
Figura 4. Estados de excitación	33
Figura 5. Hoja de recolección de datos de citología cérvico-uterina	44
Figura 6. Espectro de la fuente de mercurio	45
Figura 7. Microscopio Axiolab con sistema de captura	46
Figura 8. Placa con diagnóstico negativo	47
Figura 9. Placa con diagnóstico NIC II	48
Figura 10. Diferentes tipos de células escamosas	49
Figura 11. Espectrofotómetro y computador	51
Figura 12. Cámara del espectrofotómetro	52
Figura 13. Medición de reflectancia.	52
Figura 14. Medición de transmitancia.	53
Figura 15. Señales espectrales de reflectancia para placas positivas	54
Figura 16. Promedio de las señales espectrales positivas	54
Figura 17. Señales espectrales de reflectancia para placas negativas	55
Figura 18. Promedio de las señales espectrales de reflectancia negativas	56
Figura 19. Comparativo entre las señales promedio con diagnóstico positivo y negativo	57



LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura en citología cervical	20
Tabla 2. Neoplasias malignas del cuello uterino	22
Tabla 3. Neoplasia maligna del cuello uterino	23
Tabla 4. Clasificación del virus del papiloma humano -VPH-	27
Tabla 5. Resultado de una prueba diagnóstica	37
Tabla 6. Placas de citologías organizadas según el diagnóstico	43
Tabla 7. Datos máximos y mínimos promedio de las placas positivas	55
Tabla 8. Datos pico para la señal espectral promedio de las placas negativas	56
Tabla 9. Datos pico para la señal espectral de m01, placa positiva	57
Tabla 10. Datos pico para la señal espectral de m07a, placa negativa	58
Tabla 11. Datos pico para la señal espectral de m07a, placa negativa	58



RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA FLUORESCENTE NATURAL EN MUESTRAS EX-VIVO*

AUTOR: Diego Rolando Mahecha Capacho**

PALABRAS CLAVE: fluorescencia, respuesta espectral, cáncer de cérvix, microscopio de fluorescencia, espectrofotometría

CONTENIDO: En el mundo el cáncer de cérvix o cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte más frecuente entre las mujeres después del carcinoma de glándula mamaria. Es un problema de salud pública que afecta a la mujer, especialmente en los países en vía de desarrollo; en un primer paso, para dar respuesta a nuevas metodologías de diagnóstico se desarrolló una metodología para tal fin. Al intentar presentar un método específico para establecer el diagnóstico de lesiones precursoras y cáncer de cérvix, se consideraron diversas metodologías de estudio del análisis de la respuesta espectral fluorescente natural en muestras ex-vivo y sin el uso de fluorocromos; la primera se centra en el estudio microscópico de fluorescencia se realizaron estudios bajo la microscopía de fluorescencia y la segunda en el análisis de la respuesta de espectrometría.

La microscopía de fluorescencia y la detección precoz de cáncer de cuello uterino en muestras ex-vivo sin uso de fluorocromos, fue un método en donde se pretendía encontrar alguna respuesta a la excitación con luz ultravioleta (UV) en las imágenes obtenidas. Luego de innumerables pruebas con el microscopio se encontró que mediante esta técnica no era posible mostrar alguna diferencia entre una imagen obtenida de una muestra negativa y una positiva. La espectroscopía uv-visible y la detección precoz de cáncer de cuello uterino en muestras ex-vivo sin uso de fluorocromos, se realizó mediante reflectancia difusa y transmitancia, en ambos casos al obtener los espectros para su análisis, se encontró que no se presentaban características distintivas, aún con análisis de redes neuronales backpropagation.

La conclusión del trabajo de investigación es que mediante la fluorescencia natural de las muestras de cuello uterino, no es posible proponer técnicas para la diferenciación entre una placa negativa y una con lesión precursora o con cáncer de cérvix.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Ingenierías Físico-mecánicas. Maestría en Ingeniería, área Electrónica. Director de proyecto, Jáder Enrique Guerrero Bermúdez.



ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE DETECTION OF CANCER OF UTERINE NECK BY MEANS OF THE ANALYSIS OF THE FLUORESCENT NATURAL RESPONSE IN SAMPLES *EX-VIVO**

AUTHOR: Diego Rolando Mahecha Capacho **

KEY WORDS: fluorescence, spectral response, cervical cancer, microscope of fluorescence, spectrophotometer

CONTENT: In the world the cervical cancer or cancer of uterine neck is the most frequent second reason of death between the women after the carcinoma of mammary gland. It's a problem of health public that affects the woman, especially in the countries in route of development; in the first step, to give response to new methodologies of diagnosis I develop a methodology for such a purpose. On having tried to present a specific method to establish the diagnosis of cervical cancer, they were considered to be diverse methodologies of study of the analysis of the spectral fluorescent natural response in samples *ex-vivo* and without the use of fluorocromos; the first one centre on the microscopic study of fluorescence studies were realized under the microscopy of fluorescence and the second one in the analysis of the response of spectroscopy.

The microscopy of fluorescence and the detection of cervical cancer in samples *ex-vivo* without use of fluorocromos, it was a method where one was trying to find some response to the excitation with ultraviolet light (UV) in the obtained images. After innumerable proofs with the microscope one thought that by means of this technology it was not possible to show any difference between an image obtained of a negative sample and positive one. The uv-visible spectroscopy it was realized by means of reflectancia diffuse and transmitancia, in both cases on having obtained the spectra for your analysis, one thought that they were not presenting distinctive characteristics, yet with analysis of neural network (backpropagation).

The conclusion of the work of investigation is that by means of the natural fluorescence of the samples of uterine neck, it's not possible to propose technologies for the differentiation between a negative plate and one with cervical cancer.

* Work of investigation

** Faculty of Engineering's Physicist-mechanics. Master in Engineering, Electronic area. Project director, Jáder Enrique Guerrero Bermúdez.



INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer de cérvix o cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte más frecuente entre las mujeres después del carcinoma de glándula mamaria. Es un problema de salud pública que afecta a la mujer, especialmente en los países en vía de desarrollo; la alta tasa de mortalidad en su mayoría se debe a que las pacientes no acuden al examen oportunamente, en Colombia la tasa de mortalidad ha venido en aumento en donde se paso de una tasa de mortandad del 13.7 en el 2000 a 18.2 en el 2002³. La no asistencia oportuna a la citología es ocasionada por el temor existente ante el examen o a la distancia que debe recorrer la paciente para la toma y luego la entrega del resultado. Por ello se estudian a nivel mundial otras formas más eficientes y rápidas de diagnóstico que la técnica tradicional del Papanicolau.

Uno de los campos de estudio es el de la fluorescencia y su aplicabilidad a la detección de cáncer de cérvix, los estudios muestran que es posible la discriminación de una muestra negativa de una con lesión precursora o con cáncer de cérvix, cuando se realiza el examen *in vivo* como se muestra en las referencias a continuación citadas: [Big97], [Cha05], [Dre02], [Fer03], [Kon04], [Mac03], [Mej97] y [Ric04].

Tomando la idea de las referencias sobre estudios de fluorescencia y adaptándolas a nuestra realidad se generó la pregunta al problema de investigación, ¿es posible la diferenciación entre una muestra negativa y una muestra con lesión precursora o cáncer de cérvix, mediante el análisis de la respuesta espectral de muestras *in-vivo* excitadas con luz ultravioleta (UV) y sin el uso de fluorocromos?

³ Fuente: agencia internacional para investigaciones en cáncer (IARC)



Para dar respuesta a esta pregunta generadora se iniciaron trabajos con un grupo multidisciplinario (Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones; Escuela de Física; Escuela de Medicina; Escuela de Química) de la Universidad Industrial de Santander, en donde se pretende encontrar un método específico para establecer el diagnóstico de lesiones precursoras y cáncer de cérvix.

Es necesario contrastar el resultado de la citología (expresado en la nomenclatura del sistema Bethesda 2001) con el análisis de la respuesta espectral de fluorescencia, para su correcta interpretación este debe realizarse sobre la misma muestra.

El desarrollo de investigaciones sobre el análisis de respuesta fluorescente es nuevo en nuestro medio, por ello, a medida que se profundizó más en el mismo, se llegó a resultados que hicieron cambiar la forma de adquirir la respuesta espectral de la muestra.

El proceso de captura de datos se realizó en los laboratorios de Genética Humana y Espectroscopia de UV-visible, todos pertenecientes a la Universidad Industrial de Santander. Se proponían diversas formas de captura y manejo de la información, a fin de encontrar el método más adecuado para obtener de datos de muestras *ex vivo*.

La conclusión principal del trabajo de investigación es que mediante la fluorescencia natural de las muestras de cuello uterino, no fue posible proponer técnicas para la diferenciación entre una placa negativa, y una con lesión precursora o con cáncer de cérvix, mediante el análisis de la respuesta espectral de muestras *in vitro* excitadas con luz ultravioleta (UV) y sin el uso de fluorocromos.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. APARATO GENITAL FEMENINO

El aparato genital femenino está situado en la porción inferior del abdomen y está formado tanto por órganos internos como externos:

Útero (matriz en latín): es un órgano muscular hueco, de paredes gruesas, aspecto piriforme situado entre la vejiga y el recto. Se proyecta en dirección supero-anterior sobre la vejiga urinaria.

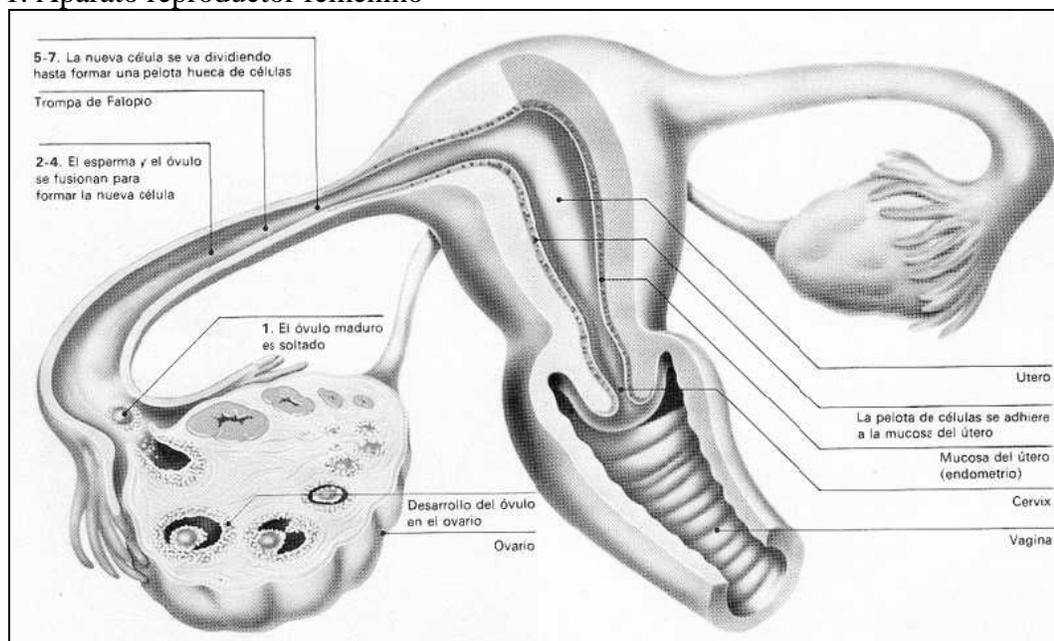
El útero se compone de dos partes fundamentales: La primera compuesta por los dos tercios superiores expandidos que se conocen como cuerpo. Constituido por el *perimetrio* o capa externa, el *miometrio* o capa muscular y el *endometrio* o capa interna, que se modifica durante las distintas etapas del ciclo y acaba desprendiéndose durante la menstruación; estos cambios constituyen el *ciclo endometrial*.

La segunda parte está conformada por el tercio inferior cilíndrico que se denomina cuello *uterino o cérvix*. Está ubicado en el fondo de la vagina, con la que se comunica a través del orificio cervical externo, es el orificio central de la porción inferior del cérvix llamada *portio u hocico de Tenca*. Posee fibras musculares, pero en menor cantidad que el cuerpo. El epitelio cervical también participa del ciclo menstrual pero a diferencia del caso anterior, no se desprende durante la menstruación.

Vagina: es el órgano femenino de la copulación en forma de tubo o vaina músculo-membranosa de 7 a 9 cm de longitud. Forma la porción inferior del tracto genital femenino y del canal del parto, y se extiende desde el cuello uterino hasta el vestíbulo

de la vagina. Se coloca por detrás de la vejiga urinaria y por delante del recto y pasa entre los bordes mediales de los músculos elevadores del ano. El cuello uterino se proyecta dentro del extremo superior de la vagina, separando sus paredes; por eso el útero se encuentra casi perpendicular al eje de la vagina en su posición normal de anteversión. El saco vaginal que rodea al cérvix se denomina *fórnix*, el cual está dividido en una cara anterior, dos laterales y otra posterior que es la más profunda y se relaciona con la bolsa rectouterina.

Figura 1. Aparato reproductor femenino



Fuente: <http://www.biocarampangue.dm.cl/2-Aparato-reproductor-femenino.jpg>. Enero 27 de 2006.

Las tubas uterinas o trompas de Falopio: miden 10 a 12cm de longitud y 1cm de diámetro, se extienden lateralmente desde los cuernos del útero. Transportan los ovocitos del ovario y el espermatozoides del útero al lugar donde ocurre la fertilización, en la ampolla de la tuba uterina. Después de haberse formado el cigoto, la tuba lo traslada en fase de división hasta la cavidad uterina.



Ovarios: son glándulas ovaladas, con forma de almendra de color blanco que miden aproximadamente 3cm de largo, 1.5cm de ancho y 1cm de espesor. Su superficie es lisa antes de la pubertad, pero luego se va arrugando progresivamente distorsionándose debido a las repetidas ovulaciones. Se localizan, uno a cada lado cerca de la pared lateral de la pelvis menor en un receso conocido como fosa ovárica.

1.2. EL CÁNCER DE CERVIX

1.1.1. Evolución de las células en el cérvix

El cáncer cervicouterino empieza creciendo lentamente, los tejidos normales pasan por un proceso conocido como displasia, durante el cual empiezan a aparecer células anormales, después, las células cáncerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y en las áreas circundantes. La citología con tinción de Papanicolaou muestra las células pre-malignas.[Ech02b]

El carcinoma cervical tiene su origen, tanto en el canal endocervical como en el orificio cervical externo, especialmente en la unión escamocolumnar. Un estudio de la Universidad del Valle encuentra compromiso de la zona de transformación en la unión escamocolumnar en el 82%, mientras que la unión escamocolumnar y el endocérvix se comprometen en el 10% y el endocérvix en un 8%; esto demuestra claramente como debe dirigirse la toma de la citología. El carcinoma escamocelular (epidermoide) comprende aproximadamente entre el 85% y 90% de los cánceres cervicales mientras que un 10% corresponde al adenocarcinoma; el carcinoma adenoescamoso y carcinoma de células pequeñas son relativamente raros; los sarcomas primarios se describen ocasionalmente y los linfomas malignos primarios y secundarios, se han reportado en forma aislada. [Ech02b]



1.1.2. Métodos de diagnóstico del cáncer cervicouterino

Debido a que no hay síntomas asociados con el cáncer cervicouterino, suelen ser necesarias una serie de pruebas para diagnosticar la enfermedad:

Citología con la tinción de Papanicolaou: se realiza usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula de madera pequeña para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células, se colocan en una laminilla de vidrio y se rocían con un fijador, o se ubican en una botella que contiene un conservante para enviarlas luego al laboratorio para su análisis [Med06]. La muestra es analizada por el citotecnólogo encargado de realizar el tamizaje y si se encuentra algún caso sospechoso de tumor pasa a ser examinado por el patólogo.

Biopsia: si se encuentran células anormales, el médico tendrá que extraer una muestra de tejido del cuello uterino, observarla a través del microscopio para determinar la presencia de células cancerosas. Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido y puede hacerse en la consulta del médico; a veces, es necesario extraer una muestra en forma de cono – conización–.

El pronóstico y selección de tratamiento dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer -si está sólo en el cuello uterino o si se ha diseminado a otros lugares- y el estado de salud de la paciente. [Ech02b]

Cuando es detectado se utilizan diversos tratamientos:

- a. Cirugía: extracción del cáncer en una operación.
- b. Radioterapia: radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas.
- c. Quimioterapia: medicamentos o "venenos" para eliminar las células cancerosas.



Al realizar la extirpación del mismo se puede proceder de las siguientes formas:

- a. Criocirugía: es la eliminación del cáncer por congelamiento.
- b. Cirugía con rayo láser: por medio del uso de un haz de luz intensa se eliminan las células cancerosas.
- c. Conización: es la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anomalía. Se emplea para biopsias, pero también para el tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino.
- d. Escisión electroquirúrgica con asa -LEEP-: es un tratamiento en el cual se utiliza un asa eléctrica para retirar la región del tejido afectado en el cuello del útero.
- e. Una histerectomía es una operación en la cual se extrae todo el útero, incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer. Existen diferentes tipos de histerectomía:
 - Histerectomía vaginal: proceso mediante el cual el útero se extrae a través de la vagina.
 - Histerectomía abdominal: el útero se extrae mediante una incisión en el abdomen, a veces se requiere realizar salpingooforectomía bilateral⁴.
 - Histerectomía radical: se extraen el cuello uterino, el útero y parte de la vagina, así como los ganglios linfáticos⁵ del área.
- f. Exenteración Si el cáncer se ha diseminado afuera del cuello uterino o los órganos femeninos, puede ser necesario extraer el colon inferior, recto o vejiga (dependiendo del lugar al que se haya diseminado el cáncer) junto con el cuello uterino, útero y vagina. La paciente puede necesitar cirugía plástica para formar una vagina artificial –vaginoplastia– después de esta operación.

⁴ Extirpación de los dos ovarios y las trompas de Falopio.

⁵ Estructuras pequeñas en forma de alubia que se encuentran en todo el cuerpo, cuya función es producir y almacenar células que combaten las infecciones.

En ese intento por unificar criterios sobre terminología en citología cervical, el *National Cancer Institute* estableció una reunión de trabajo en Bethesda, Maryland, en 1988. El segundo taller se celebró en abril de 1991, a esa nomenclatura se le designa usualmente " Sistema de Bethesda".

El sistema Bethesda introdujo nuevos términos [LAC05]:

Negativo: para lesiones intraepiteliales o malignidad. Se utiliza esta categoría cuando no hay evidencia de neoplasia, independientemente de si se observan, o no, microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos.

Anomalías celulares epiteliales

a. EN CÉLULAS ESCAMOSAS

Células escamosas atípicas:

- De significado indeterminado (ASC-US)
- No puede excluirse H-SIL (ASC-H)

Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL):

- Displasia leve/CIN o NIC 1
- PVH

Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H -SIL):

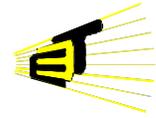
- Displasia moderada, severa y CIS/CIN o NIC 2 y 3
- Con características sugestivas de invasión (si se sospecha invasión)

Carcinoma epidermoide

b. EN CÉLULAS GLANDULARES

Células atípicas

- Endocervicales
- Endometriales
- Glandulares



Células atípicas, sugestivas de neoplasia

- Endocervicales
- Glandulares

Adenocarcinoma endocervical in situ

Adenocarcinoma

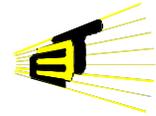
- Endocervical
- Endometrial
- Extrauterino
- No específico (NOS)

OTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS (especificar)

Se utiliza el término “lesión” en lugar de “neoplasia”, aunque etimológicamente es poco específico y significa “cualquier daño”, es utilizado para resaltar el potencial biológico incierto del proceso. La Tabla 1 presenta la nomenclatura para citología cervical de acuerdo al sistema PAP y el sistema Bethesda 2001.

Tabla 1. Nomenclatura en citología cervical

SISTEMA PAP	SISTEMA BETHESDA	
Epitelio:escamoso y glandular	Epitelio escamoso	Epitelio glandular
PAP I – II Normal	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad
	<ul style="list-style-type: none"> • ASCUS* • ASC-H* 	Atipias glandulares <ul style="list-style-type: none"> • Células endocervicales • Células endometriales



PAP III Sospechoso dudoso	<ul style="list-style-type: none"> • EBG – LSIL* <ol style="list-style-type: none"> 1. Cambios por VPH 2. NIC I (displasia leve) • LIEAG – HSIL* <ol style="list-style-type: none"> 1. NIC II (displasia moderada) 2. NIC III (displasia severa) 3. Sospechosa de invasión 	Atipias que favorecen neoplasias <ul style="list-style-type: none"> • Células endocervicales • Células glandulares
PAP IV Altamente sugestivo de malignidad CA IN SITU		Adenocarcinoma Endocervical in situ (AIS)
PAP V Positivo para malignidad	Carcinoma de células escamosas	Adenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> • Endocervical • Endometrial • Extrauterino

Fuente: Liga Santandereana de lucha contra el cáncer

* Las definiciones se encuentran anteriormente especificadas

1.1.3. Epidemiología del cáncer cervicouterino

Al observar las tablas comparativas se observa como varían las tasas de incidencia y mortalidad de los países industrializados a los que se encuentran en vía de desarrollo.

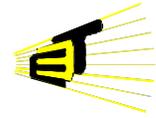
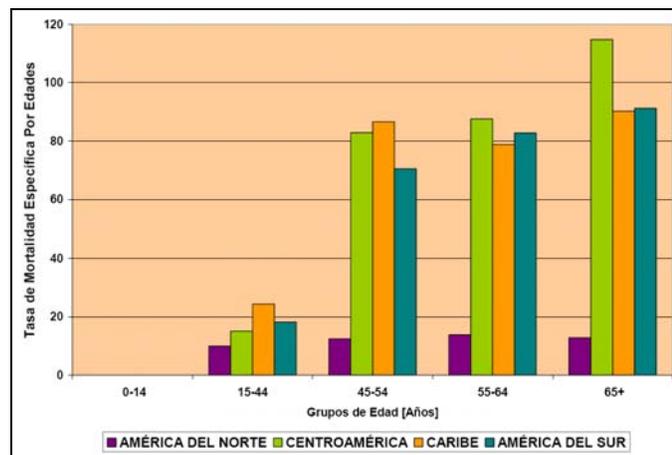


Tabla 2. Neoplasias malignas del cuello uterino
 Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad.

Región	2000		2002	
	Tasa de incidencia	Tasa de mortalidad	Tasa de incidencia	Tasa de mortalidad
África Oriental	44.3	24.2	42.7	34.6
Melanesia	43.8	23.8	38.1	21.7
Centro América	40.3	17.0	30.6	15.0
Caribe	35.8	16.8	32.6	16.0
América del Sur	30.9	12.0	28.6	12.9
América del Norte	7.9	3.2	7.7	2.3

Fuente: Ferlay et al. GLOBOCAN 2000 y 2002. Lyon: Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer / *International Agency for Cancer Research* (IARC).

Figura 2. Neoplasias malignas del cuello uterino
 Tasas de mortalidad específica (por cada 100.000 habitantes, regiones seleccionadas de las Américas, 2000 y 2002)



Fuente: Globocan 2000 y 2002. Lyon: Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer / *International Agency for Cancer Research* (IARC).

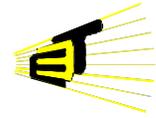


Tabla 3. Neoplasia maligna del cuello uterino
 Casos nuevos y defunciones, con tasas estandarizadas por edad.

País	2000				2002			
	Casos nuevos	Tasa de incidencia	Defunciones	Tasa de mortalidad	Casos nuevos	Tasa de incidencia	Defunciones	Tasa de mortalidad
Argentina	2 953	14.2	1 585	7.6	4 924	23.2	1 679	7.8
Bahamas	31	22.1	13	9.3	25	16.7	9	6.2
Barbados	54	30.4	27	13.6	46	24.9	18	9.4
Belice	30	39.6	11	16.8	40	52.4	16	23.0
Bolivia	1 807	58.1	661	22.2	1 831	55.0	987	30.4
Brasil	24 445	31.3	8 815	11.6	19 603	23.4	8 286	10.2
Canadá	1 608	8.2	650	2.8	1502	7.7	581	2.5
Chile	2 321	29.2	860	10.7	2 163	25.8	931	10.9
Columbia	5 901	32.9	2 339	13.7	6 815	36.4	3 296	18.2
Costa Rica	424	25.0	197	12.1	392	21.5	210	12.0
Cuba	1 586	23.8	730	10.6	1 346	20.2	567	8.3
Ecuador	2 231	44.2	892	18.7	1 978	38.7	1 064	21.0
El Salvador	1 041	40.6	387	15.8	1 213	45.6	609	23.5
EUA	13 230	7.8	6 417	3.3	13 162	7.7	5 214	2.3
Guatemala	1 432	39.6	566	16.8	1 153	30.6	628	17.2
Guyana	184	51.1	69	20.7	160	47.3	71	22.2
Haiti	2 428	93.9	1 326	53.5	2 774	87.3	1 484	48.1
Honduras	833	39.6	329	16.8	664	30.6	361	17.2
Jamaica	489	18.4	209	18.4	383	31.2	151	12.2
México	16 448	40.5	6 650	17.1	12 516	29.5	5 777	14.1
Nicaragua	997	61.1	392	26.1	809	47.2	354	22.3
Panamá	389	31.2	158	13.1	375	28.2	166	12.9
Paraguay	768	41.1	281	15.8	1 131	53.2	513	26.1
Perú	4 101	39.9	1 575	15.8	5 400	48.2	2 663	24.6
Puerto Rico	252	10.3	114	4.3	223	8.8	75	2.8
República Dominicana	1 290	38.4	495	15.8	1 032	30.8	562	17.3
Surinam	77	43.8	31	18.2	51	27.0	26	14.0
Trinidad y Tabago	215	33.3	97	15.1	186	27.1	73	10.7
Uruguay	307	13.8	163	7.6	392	18.8	162	7.0
Venezuela	3 904	38.3	1 454	15.2	3 845	36.0	1 705	16.8
Total	91 776	-----	37 493	-----	86 134	-----	38 238	-----

Fuente: Globocan 2000 y 2002. Lyon: Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer / *Internacional Agency for Cancer Research (IARC)*.

El factor de riesgo más común del cáncer cervicouterino es la exposición a ciertas variedades del HPV, es una infección de transmisión sexual (ITS) que en muchos casos es asintomática, esta característica hace que pueda transcurrir mucho tiempo antes de que se detecte la enfermedad. Otros factores de riesgo del cáncer cervicouterino son [Ops05]:

- No hacerse la prueba de detección de cáncer cervicouterino periódicamente.



- Comenzar las relaciones sexuales a una edad temprana.
- Tener parejas sexuales múltiples, o tener contacto sexual con alguien que ha tenido parejas sexuales múltiples.
- Contraer el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que debilita el sistema inmunológico de la mujer haciéndola más vulnerable a la infección por el HPV.
- Tener una historia familiar de cáncer cervicouterino.
- Grupo de edad, las mujeres de 30-60 años de edad corren un riesgo mayor y éste también aumenta con la edad.
- Fumar.
- Estado socio-económico, las tasas de mortalidad e incidencia son más elevadas entre mujeres pobres ya que ellas no tienen acceso a los servicios de diagnóstico y tratamiento.

La prevención es la herramienta más importante en la lucha contra el cáncer cervicouterino. Esto representa desafíos importantes para las mujeres, especialmente las pobres [Ops05].

- Las mujeres, en particular las de países en desarrollo, no tienen acceso a los servicios de salud gratuitos, o no tienen dinero para pagar los análisis. Además, si estos servicios están disponibles probablemente están en los centros urbanos, limitando su acceso a las mujeres que viven en zonas rurales.



- Comúnmente, la mujer le da prioridad a la salud de su familia que a la propia. Si hay dinero para servicios médicos, ella lo gastará en sus hijos y no en sí misma.
- El temor a su pareja también puede desalentar a la mujer de hacerse las pruebas periódicas para detectar el cáncer cervicouterino. Él puede oponerse a que visite al ginecólogo, a pagar por la prueba o por el costo del transporte a la clínica o al hospital.
- En muchas sociedades la mujer no controla sus relaciones sexuales. El que la mujer tenga o no control de cuando, cómo y con quien tiene contacto sexual es de suma importancia para poder protegerse contra el HPV.
- Las experiencias negativas con médicos u otros profesionales de la salud en general pueden también ser un impedimento a someterse a los exámenes periódicos.
- En Latinoamérica los exámenes normalmente tienden a estar vinculados a los programas de planificación familiar, beneficiando primordialmente a mujeres menores de 30 años. El grupo de mujeres que corre mayor riesgo de cáncer cervicouterino es de 25-60 años de edad, estos programas no son muy eficaces.
- La falta de información sobre el procedimiento, o el temor a los resultados puede disuadir a la mujer de hacerse los exámenes periódicos.

La incidencia y la severidad de una enfermedad tan fácilmente detectable y prevenible debería convertirse en un llamado a la acción para los profesionales de la salud, los formuladores de política y defensoras de género [Ops05].



- El mensaje sobre el cáncer cervicouterino debería darle prioridad a los aspectos de prevención y no al tratamiento de la enfermedad y sus consecuencias. Donde existan se deben estimular los programas de pruebas para detectar el cáncer cervicouterino y las mujeres deben ser informadas ampliamente acerca del procedimiento y sus beneficios.
- La capacidad de la mujer de controlar su salud sexual y reproductiva ha sido una prioridad en la abogacía de género desde hace muchos años. Ahora también debe convertirse en una prioridad de salud pública no sólo para la protección contra el HPV y el cáncer cervicouterino, sino también para reducir la propagación del VIH/SIDA y otras enfermedades de transmisión sexual.
- Los médicos y demás profesionales de la salud deben ser capacitados para reconocer que el género y el lugar de la mujer en la sociedad tienen un impacto profundo en su salud y en la atención que recibe.

1.1.4. Papiloma virus

El papiloma virus se caracteriza por inducir una variedad de lesiones epiteliales proliferativas en el hombre y en animales llamados papilomas o verrugas. Existen más de 120 tipos de VPH identificados, de los cuales a 80 se les caracterizó molecularmente y alrededor de 30 infectan el cuello uterino; de estos, 20 se consideran factor etiológico principal para carcinoma invasivo y sus lesiones precursoras. [Ech02b]

El periodo de incubación es de 3 a 4 meses, infecta todo tipo de epitelio escamoso queratinizado y no queratinizado, como piel y mucosas. Entre los factores que determinan el significado clínico de las infecciones por VPH están: localización de las lesiones, el genotipo viral y el potencial oncogénico. [Ech02b]

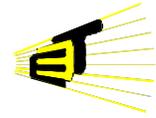


Tabla 4. Clasificación del virus del papiloma humano -VPH-

		Clasificación epidemiológica	
		Alto riesgo	Bajo riesgo
Clasificación filogenética	Alto riesgo	16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,82,53,66	70
	Bajo riesgo	73	6,11,40,42,43,44,54,61,72,81,CP6108

Mientras en países desarrollados la incidencia y la mortalidad debidas a cáncer de cérvix decreció de manera significativa en este siglo, demostrándose que con coberturas de tamizaje del 80% se logra disminuir la mortalidad en más del 60%, en los países pobres o en vías de desarrollo no se observa este descenso; en particular, América Latina se caracterizan por notificar las mayores tasas de incidencia en todo el orbe. Se estima que en esta región, una de cada 1000 mujeres de 35 a 55 años padece cáncer del cuello uterino, enfermedad que es precedida durante meses o años de una lesión premaligna *in situ*.

De acuerdo a los datos obtenidos en la Secretaria de salud de Santander, el 3% de las citologías leídas en el laboratorio departamental presentan lesiones neoplásicas en fases preinvasoras o invasoras.



1.2. INTRODUCCIÓN A LA LUMINISCENCIA

La fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia molecular son tres fenómenos interrelacionados entre sí, las moléculas de analito son excitadas, provocando en ellas una emisión espectral que puede suministrar información cualitativa y cuantitativa; estos fenómenos ópticos se conocen como formas luminiscentes. [Sko94]

Los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia se producen debido a la absorción de fotones por parte de la molécula excitada; como tienen el mismo principio de excitación se les conoce a estos dos fenómenos con el nombre de fotoluminiscencia.

La diferencia fundamental entre la fluorescencia y la fosforescencia son las transiciones electrónicas que tienen lugar en la excitación, estas transiciones no involucran un cambio en el espín del electrón. La fluorescencia tiene una vida más corta ($<10^{-5}$ s), caso contrario ocurre en la fosforescencia en donde se ve afectado el espín del electrón que cambia de dirección produciendo un efecto luminoso aún después de haber dejado de excitar a la molécula (de 10^{-4} a 10 segundos o más). La respuesta fotoluminiscente en la mayoría de los casos presenta una longitud de onda más larga que la radiación utilizada para su excitación; cuando esto sucede parte de esta energía es emitida en forma de luz, el proceso conlleva dos pasos: primero, la energía inicial hace que los electrones de los átomos del material luminiscente se exciten y salten de las órbitas internas de los átomos a las externas; segundo, cuando los electrones vuelven a su estado original y se emite un fotón de luz. [Mee85] [Big97]

Por una parte la quimioluminiscencia se produce en la emisión de una especie excitada debida a una reacción química, las partículas excitadas son producto en su mayoría de

la interacción entre el analito y un reactivo (un oxidante fuerte como el ozono o el peróxido de hidrógeno).

Como resultado de la medición de la intensidad de fotoluminiscencia o quimioluminiscencia se puede establecer de forma cuantitativa una variedad importante de especies inorgánicas y orgánicas a nivel traza.

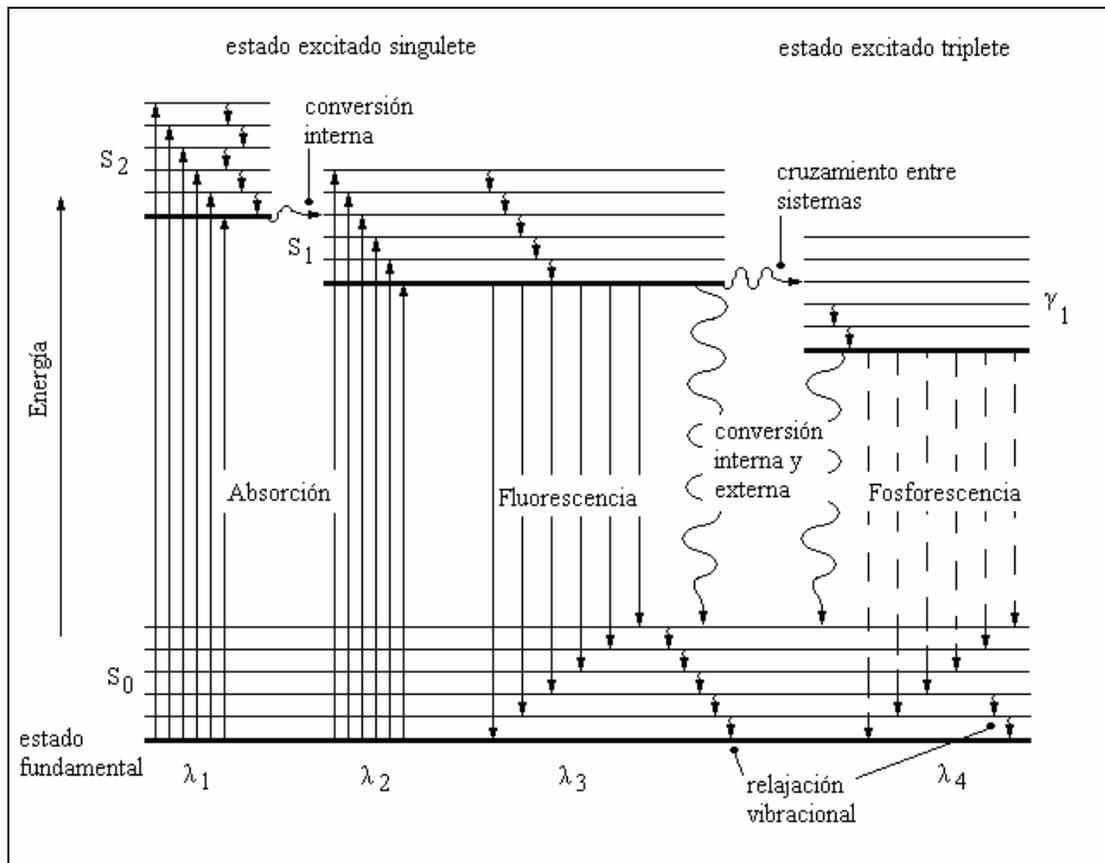
Cuando un sistema es excitado por medio de luz se pasa de un estado de menor energía a uno de mayor energía, y sucede lo contrario cuando el sistema tiende a restablecerse, es decir el cuerpo comienza a emitir la energía que ganó de la excitación, la energía expulsada sale en forma de radiación electromagnética –REM– la cual es posible registrar. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, motivo por el cual, se escogió para el análisis de patologías de tejidos. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer y la baja eficiencia en la fluorescencia natural. [Mie82] [Mej97] [Per00]



1.3. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA

El tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de las más importantes de estos mecanismos son la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente. [Sko94]

Figura 3. Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente





La relajación no radiante se divide en relajación vibracional y en conversión interna; la primera señalada –Figura 3– por las flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas. La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10 a 15 [s].

También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación llamado algunas veces conversión interna, se ilustra por las flechas onduladas largas. [Sko94]

En la figura se ilustra el otro proceso de relajación: la fluorescencia. Se puede observar que las bandas de radiación son producidas cuando las moléculas fluorescen debido a que las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico fundamental. De igual forma que las bandas de absorción molecular, las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver. [Sko94]

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa. [Sko94]



La fotoluminiscencia se limita a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de desactivación sin radiación se reduzcan hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente.

Se observa que las bandas de fluorescencia molecular están formadas principalmente por bandas que tienen longitudes de onda más largas, por tanto energías menores que la banda de radiación responsable de su excitación. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores se llama desplazamiento de *Stokes*.

En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda –misma energía– se conoce como radiación de resonancia o resonancia fluorescente. Debido a que las diferencias de energía entre los estados vibracionales es aproximadamente el mismo, tanto para el estado fundamental como para el excitado, la absorción, o espectro de excitación, y el espectro de emisión o fluorescencia de un compuesto frecuentemente aparece como una imagen especular de uno a otro con una sobreposición que ocurre en la línea de resonancia.

1.3.1. Estados excitados

Según el principio de exclusión de Pauli un átomo no puede tener dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales, en otras palabras, no más de dos electrones por órbita y con estados de espín opuestos. A este fenómeno se le denomina apareamiento de espines, y se presenta en la mayoría de las moléculas, cuando este fenómeno está presente se dice que las moléculas son diamagnéticas –son repelidas por campos magnéticos permanentes–. Por el contrario las paramagnéticas, se presentan en los radicales libres que contienen electrones desapareados. [Sko94]

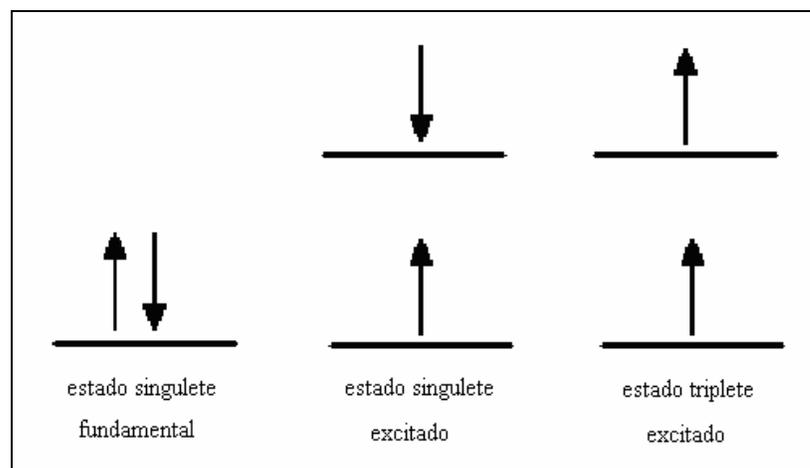


Cuando todos los espines están apareados en una estructura molecular se le llama estado singulete, en donde no se tiene un desdoblamiento del nivel de energía cuando la molécula se expone a un campo magnético.

Al excitar uno de los electrones de una molécula, se consigue el paso del electrón a un nivel de energía superior, se produce un estado singulete o triplete excitado. En el estado singulete excitado el espín del electrón que ha ganado energía todavía se encuentra apareado con el electrón del estado fundamental; por el contrario en el estado triplete excitado los espines de los dos electrones se encuentran desapareados. Los tres casos mencionados se pueden apreciar en la Figura 4 en donde las flechas representan la dirección del espín. [Sko94]

Debido al cambio del espín, el tiempo de vida medio de un estado triplete excitado oscila entre 10^{-4} a varios segundos, mientras que el tiempo de vida medio para un estado singulete excitado es de 10^{-5} a 10^{-8} s. La excitación inducida por radiación de una molécula en el estado fundamental a un estado excitado triplete presenta una muy baja probabilidad de ocurrencia y los picos de absorción debidos a estos procesos son menores que los producidos entre el estado fundamental y el estado singulete excitado.

Figura 4. Estados de excitación



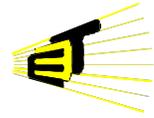


1.3.2. Variables que afectan a la fluorescencia

- a. Rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas.
- b. Estructura: la fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia.

- c. Rigidez estructural: la fluorescencia está particularmente favorecida por moléculas que poseen estructuras rígidas. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelatantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ión metálico.
- d. Temperatura y disolvente: la eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante –conversión externa–. Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.



- e. Efecto del pH: la fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto.

- f. Efecto de la concentración: la potencia de la radiación fluorescente es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema. Este efecto es el resultado del desvanecimiento, en el cual las moléculas del analito absorben la fluorescencia producida por otras moléculas de analito.



2. LA SENSIBILIDAD Y LA ESPECIFICIDAD

La medicina es una ciencia de probabilidades y un arte de manejar la incertidumbre. Dicha incertidumbre se extiende no sólo a las actividades preventivas, terapéuticas y de pronóstico sino también a las diagnósticas. En las fases del proceso diagnóstico intervienen la historia clínica, la exploración física y la realización de pruebas complementarias. Cuando existen varias hipótesis diagnósticas, se realizará el diagnóstico diferencial y las pruebas complementarias tratarán de aclarar las dudas existentes [Sac94] [San80].

Una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un *test* son:

Validez: es el grado en que un examen mide lo que se supone que debe medir. ¿Con que frecuencia el resultado del examen es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos? La sensibilidad y la especificidad de un examen son medidas de su validez.

Reproductividad: es la capacidad del examen para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada del propio examen, determinan su reproductividad.

Seguridad: se determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo. ¿Con que seguridad un examen predecirá la presencia o ausencia de enfermedad? Ante un resultado positivo de un examen ¿qué probabilidad existe de que este resultado indique presencia de la enfermedad? Veremos posteriormente que esta probabilidad está muy influenciada por la prevalencia de la patología.

De igual forma el examen debe ser sencillo de aplicar, aceptado por los pacientes o la población general, que tenga los mínimos efectos adversos y que económicamente sea soportable.

Tabla 5. Resultado de una prueba diagnóstica

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falso Positivo (FP)
Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

El caso más sencillo planteado es el de una prueba dicotómica, en donde se clasifica a cada paciente como sano o enfermo en función de que el resultado de la prueba sea positivo (lesión precursora o cáncer, para el caso propuesto) o negativo. Los datos obtenidos permiten clasificar a los sujetos en cuatro grupos según una tabla 2x2 como la que se muestra en la Tabla 5. Se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica con el estado real de los pacientes o, el resultado de la prueba de referencia o *gold estándar* [Alt94a], en donde surgen los conceptos:

Sensibilidad: probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo o la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican como se muestra en la Tabla 5, la sensibilidad se obtiene mediante la fórmula:

$$sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

La sensibilidad se conoce como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”.



Especificidad: probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano o la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. A partir de la Tabla 5 la especificidad se estima:

$$especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

La especificidad se denomina “fracción de verdaderos negativos (FVN)”.

Lo ideal es trabajar con pruebas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. Las pruebas de *screening* deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. Una prueba muy sensible será especialmente adecuada en aquellos casos en los que el no diagnosticar la enfermedad puede resultar fatal para los enfermos, como ocurre con enfermedades peligrosas pero tratables, como los linfomas o la tuberculosis, o en enfermedades en las que un falso positivo no produzca serios trastornos psicológicos o económicos para el paciente.

Las pruebas confirmatorias del diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos. Los exámenes de alta especificidad son necesarios en enfermedades graves pero sin tratamiento disponible que las haga curables, cuando exista gran interés por conocer la ausencia de enfermedad o cuando diagnosticar a un paciente de un mal que realmente no padece pueda acarrear graves consecuencias, ya sean físicas, psicológicas o económicas.

Cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información a priori acerca de su verdadero diagnóstico, y la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo (negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (sano)? Por medio de valores predictivos se complementa la información [Alt94b]:



Valor predictivo positivo: probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el examen, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor predictivo negativo: probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se encuentra al dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Los valores de sensibilidad y especificidad, a pesar de definir completamente la validez de la prueba diagnóstica, presentan la desventaja de que no proporcionan información relevante a la hora de tomar una decisión clínica ante un determinado resultado de la prueba. Sin embargo, tienen la ventaja adicional de que son propiedades intrínsecas a la prueba diagnóstica, y definen su validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica.

El concepto de valores predictivos, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presenta la limitación de que dependen en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad a diagnosticar en la población objeto de estudio.

Cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad, siendo así el valor predictivo negativo mayor. Por el contrario, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, resultando en un bajo valor predictivo positivo.

La prevalencia es un factor determinante en los valores predictivos de un examen y no puede ser utilizada como índice a la hora de comparar dos métodos diagnósticos diferentes, ni al extrapolar los resultados de otros estudios a datos propios. Es necesario determinar otros índices de valoración que sean a la vez clínicamente útiles y no dependan de la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar, como [Duj94]:

Razón de verosimilitud positiva o cociente de probabilidades positivo: es el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad).

$$RV_{+} = \frac{\textit{Sensibilidad}}{1 - \textit{Especificidad}}$$

Razón de verosimilitudes negativa o cociente de probabilidades negativo: es el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad).

$$RV_{-} = \frac{1 - \textit{Sensibilidad}}{\textit{Especificidad}}$$

La razón de probabilidades tiene la ventaja de que relaciona la sensibilidad y la especificidad de una prueba en un solo índice. Pueden obtenerse razones de probabilidad según varios niveles de una nueva medida y no es necesario expresar la información de forma dicotómica. No varía con la prevalencia, lo que permite utilizarlo como índice de comparación entre diferentes pruebas para un mismo diagnóstico.



3. ESTUDIO DE FLUORESCENCIA EN MUESTRAS *EX-VIVO*

Los cambios biofísicos que acompañan los procesos displásicos conducen a alteraciones en las características del tejido. Aprovechando estas alteraciones se pueden proponer nuevas técnicas de diagnóstico que permitan la detección de lesiones por nuevos métodos de diagnóstico. Particularmente, se han venido desarrollando estudios clínicos basados en la espectroscopia de fluorescencia que han demostrado alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de lesiones precursoras o con cáncer de cérvix [Cha05], estos estudios son realizados *in vivo* y con recursos provenientes del estado (Estados Unidos) [Ric04].

La espectroscopia de fluorescencia mide las características ópticas del tejido que se presentan por cambios bioquímicos o estructurales que acompañan las lesiones precursoras o el cáncer de cérvix. La nicotidamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y la flavina adenina dinucleótido (FAD) son moléculas fluorescentes presentes en la mitocondria que tienen un importante rol en el metabolismo celular (anexo C) [Cha05].

El incremento de las coenzimas NADH y FAD, produce el aumento de la fluorescencia en la célula [Pal03] [Mil03] y en el tejido [Pav03], que se relaciona con un incremento en la actividad metabólica, y dependiendo del aumento en el porcentaje de fluorescencia se predice el grado de lesión en el que se encuentra la muestra [Cha05].

El diagnóstico se deriva de la extracción y análisis directo de la información más significativa de las mediciones de fluorescencia. Modelos matemáticos pueden ser desarrollados con base a los datos obtenidos de las mediciones, encontrando características que permitan la discriminación de células normales o negativas de células anormales o con presencia de lesiones precursoras o cáncer [Cha05].



Varios modelos matemáticos se han desarrollado para estimar las características ópticas de tejidos midiendo la fluorescencia [Bel01] [Cha05] [Fin05] [Nai02] [Wu04]. Estos modelos son desarrollados a partir de datos de pruebas realizadas *in-vivo*, la investigación propuesta se desarrolló en muestras *ex-vivo*.

Para corroborar que los datos medidos y los obtenidos tenían relación con el tipo de estado en el que se encuentra el tejido (sano o enfermo), se tenía como *gold standard* [Cha05] el resultado de las pruebas citológicas realizadas en los centros que permitieron el análisis de placas que ellos poseían.

3.1. METODOLOGÍA

Las muestras para estudio fueron facilitadas por dos centros especializados en el análisis de citologías de la ciudad de Bucaramanga, el centro de Planificación Familiar, Sexual y Reproductiva (PROFAMILIA) y La Liga Santandereana de Lucha Contra el Cáncer.

En PROFAMILIA se realizó el primer intento para la recolección de muestras, para ello se acordó con la citotecnóloga del centro la toma de doble placa citológica, una para el análisis por medio de los métodos tradicionales y la otra para el estudio con fluorescencia; el resultado de este proceso sólo arrojó muestras que presentaban resultados negativos de un total de 100 placas recolectadas. Como el proceso mostraba que era necesario un número grande de muestras para tener una representación significativa de placas con lesiones precursoras o cáncer de cérvix se optó por ir a los archivos citológicos.



Tabla 6. Placas de citologías organizadas según el diagnóstico

Negativa	Negativa	15
Célula escamosa atípica	Ascus	15
	ASC-H	1
L-SIL	NIC I	15
H-SIL	NIC II	15
	NIC III	15
	Carcinoma in situ	12

Los archivos de citologías se consiguieron en la Liga Santandereana contra el cáncer y fueron escogidos según el tipo de lesión presente en las muestras. En la Tabla 6 se muestra el número de placas y su distribución según la clasificación que presentaron.

Se consideraban también los datos más relevantes del paciente (Figura 5) y la composición de los reactivos utilizados para la preparación de las muestras.

Reactivos de MERK utilizados en las pruebas cérvico-uterinas [Fic98].

- Solución de Papanicolau 2^a solución de anaranjado G (OG 6) para diagnóstico del cáncer y del ciclo
- Solución de Papanicolau 3b solución policroma EA 50
- Solución de Papanicolau 1a solución de hematoxilina según Harris
- Etanol 96% Reag. Ph Eur
- Amoniaco en solución 25% p.a.

Figura 5. Hoja de recolección de datos de citología cérvico-uterina

PROFAMILIA		CITOLOGÍA CÉRVICO - UTERINA		No. 1522438	
APELLIDOS		NOMBRES		C.C.	
DIRECCIÓN RESIDENCIA		TELÉFONO		MUNICIPIO DEPARTAMENTO	
ANTECEDENTES					
EDAD	PAREJA	METODO DE PLANIFICACION	TIEMPO DE USO	FECHA ULTIMA MENEJACION	
DD MM AAAA	DD MM AAAA	DD MM AAAA	DD MM AAAA	DD MM AAAA	
ALGUNA VEZ LE PRACTICARON:					
CAUTERIZACION EN CUELLO UTERINO	CONDUCCION DEL CUELLO UTERINO	VAPORIZACION	CRIOTERAPIA		
DD MM AAAA	DD MM AAAA	DD MM AAAA	DD MM AAAA		
CALIDAD DE LA MUESTRA					
1. SATISFACTORIA PERO LIMITADA POR:			4. INADECUADA POR:		
<input type="checkbox"/> ADECUADA	<input type="checkbox"/> Ausencia material endocervical	<input type="checkbox"/> Material homogéneo	<input type="checkbox"/> Mala tinción		
<input type="checkbox"/> REPERTE	<input type="checkbox"/> Celulas / mala preservacion	<input type="checkbox"/> Material muy grueso	<input type="checkbox"/> Otros: (especificar)		
<input type="checkbox"/> REPERTE	<input type="checkbox"/> Cantidad excesiva	<input type="checkbox"/> Excluido inflamatorio			
LECTURA HORMONAL					
<input type="checkbox"/> Efecto de androgeno	<input type="checkbox"/> Moderado efecto estrogenico	<input type="checkbox"/> Marcado efecto estrogenico	<input type="checkbox"/> Posible efecto progesteronico		
MICROORGANISMOS PRESENTES					
<input type="checkbox"/> Bacilos de Döderlein	<input type="checkbox"/> Flora normal	<input type="checkbox"/> Coque	<input type="checkbox"/> Gardnerella	<input type="checkbox"/> Herpes	<input type="checkbox"/> Trichomonas
INTERPRETACION					
1. NEGATIVO PARA LESION PREINVASIVA - MALIGNA					
2. CAMBIOS REACTIVOS SECUNDARIOS A: 1. Preparacion 2. Abrisa 3. Irradiacion 4. RU 5. Otro					
CITOLOGIA ANORMAL COMPATIBLE CON:					
<input type="checkbox"/> Alguno de los celulas incoherentes de significancia indeterminada	<input type="checkbox"/> Cambios inusuales				
<input type="checkbox"/> Lesion intraepitelial de bajo grado	<input type="checkbox"/> Alguno de celulas grandes				
<input type="checkbox"/> Cambios compatibles a superlesion de CIN I - (Distinta tincion)	<input type="checkbox"/> Incoherentes				
<input type="checkbox"/> Lesion intraepitelial de alto grado	<input type="checkbox"/> Otros resultados malignos: Especificar				
<input type="checkbox"/> Otros resultados: NEC. C. (Incluir causas: NIC III)					
TOMA Y LECTURA					
CÓDIGO CENTRO		TOMADA POR		CARGO	
DD MM AAAA		DD MM AAAA		DD MM AAAA	
LEIDA POR LABORADOR/O PROFESIONAL				NO PLACA	
DD MM AAAA				DD MM AAAA	
SEGUNDA LECTURA				CARGO	
DD MM AAAA				DD MM AAAA	
OBSERVACIONES:					

La obtención de los datos que sirven para la investigación “Estudio de la detección precoz de cáncer de cuello uterino por medio del análisis de la respuesta fluorescente natural en muestras *ex vivo*”, se realizó en laboratorios de la Universidad Industrial de Santander.

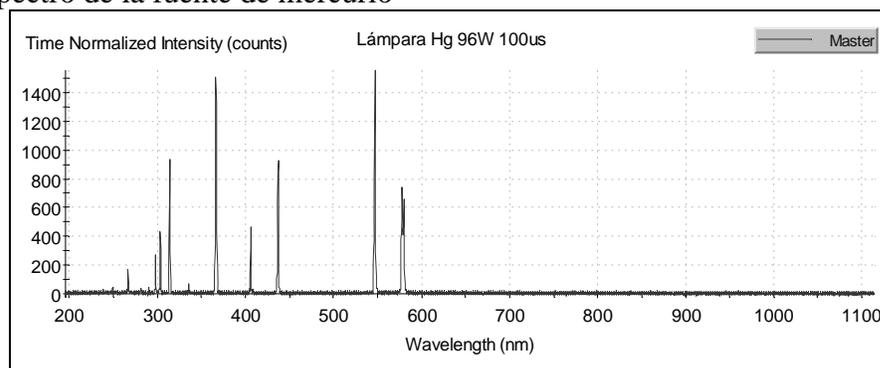
Otro factor a considerar en la proposición de un método de detección es que tan sensible y específica es la prueba, por ello antes de mirar las evaluaciones realizadas con las muestras se presenta cómo y qué son estos términos.

4. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN MUESTRAS *EX-VIVO* SIN USO DE FLUOROCROMOS

Estudios clínicos muestran el potencial de la espectroscopia de fluorescencia y reflectancia para la detección de neoplasias a nivel cervical usando fluorocromos. La espectroscopia óptica identifica lesiones cervicales al detectar los cambios bioquímicos y estructurales que acompañan el desarrollo de la displasia; estudios recientes muestran que la espectroscopia de fluorescencia es sensible al aumento de los fluoróforos a nivel mitocondrial en epitelio precanceroso. [Ben03]

El objetivo del estudio es registrar la intensidad luminosa de la muestra al ser estimulada con luz ultravioleta (fluorescencia de muestras *ex-vivo*) sin la adición de fluorocromos, para la detección y diagnóstico, con la posibilidad de detectar el estado de la lesión cervical si se encuentra que el resultado es positivo.

Figura 6. Espectro de la fuente de mercurio



El proceso se realizó con el microscopio Axiolab para luz transmitida y epifluorescencia (marca CARL ZEISS), el cual consta básicamente de una fuente de

mercurio, cámara CCD marca COHU (Figura 7) y *software* LEICA QFISH V1.01 que permite la captura de las imágenes a diferentes tiempos de exposición.

Figura 7. Microscopio Axiolab con sistema de captura

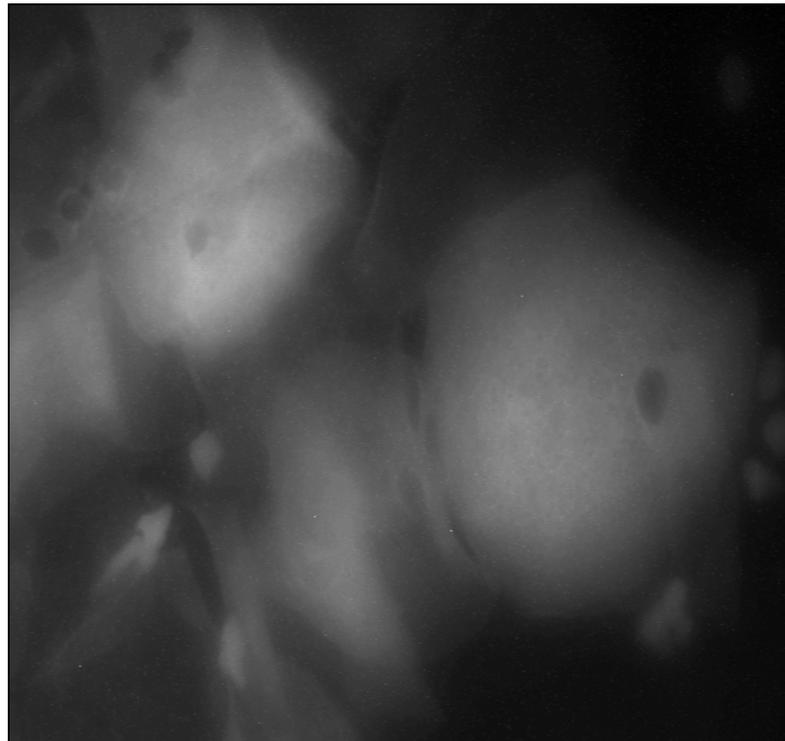


La fuente de luz se basa en una lámpara de arco de mercurio, integrada con un reflector parabólico el cual permite que los haces de salida vayan a la corredera de reflectores, en donde se encuentran el reflector encargado de dirigirla luz hacia la muestra, donde se tiene el filtro que bloquea la luz ultravioleta (UV) para cuando esta se envíe hacia la cámara.

Al irradiar la placa con luz UV se produce una respuesta del tejido a la excitación, produciendo una imagen resultado la fluorescencia, la cual es capturada por la cámara monocromática con un tiempo de exposición variante entre 0 y 20s.

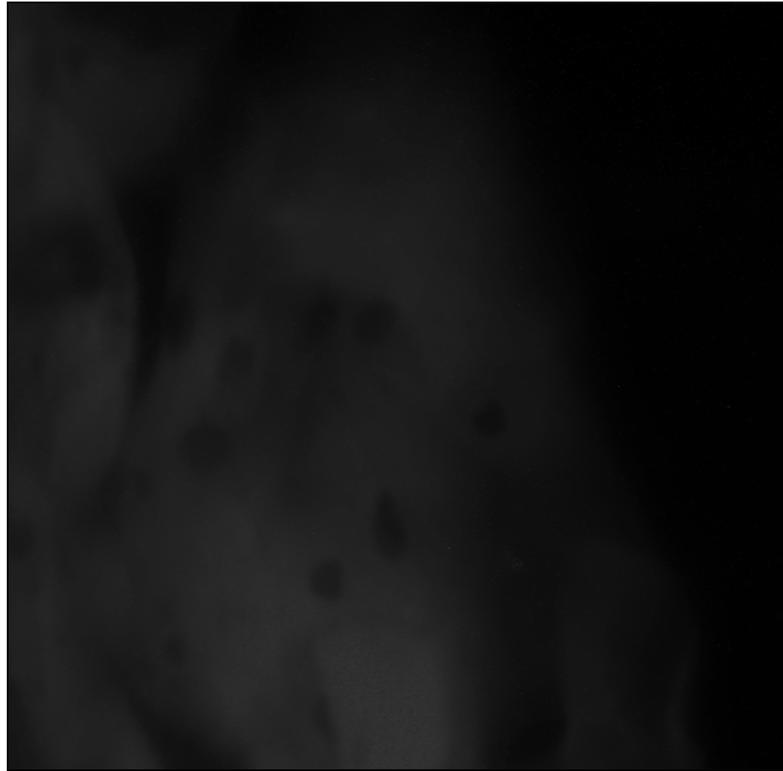
El mayor interés en la investigación era la inspección visual de la muestra sin el uso de fluorocromos para inducir fluorescencia en las muestras, los resultados obtenidos son los mostrados en las figuras 8 y 9.

Figura 8. Placa con diagnóstico negativo⁶



⁶ Placa de la Liga número de referencia 04-09101. Tiempo de exposición 20[s], objetivo x20.

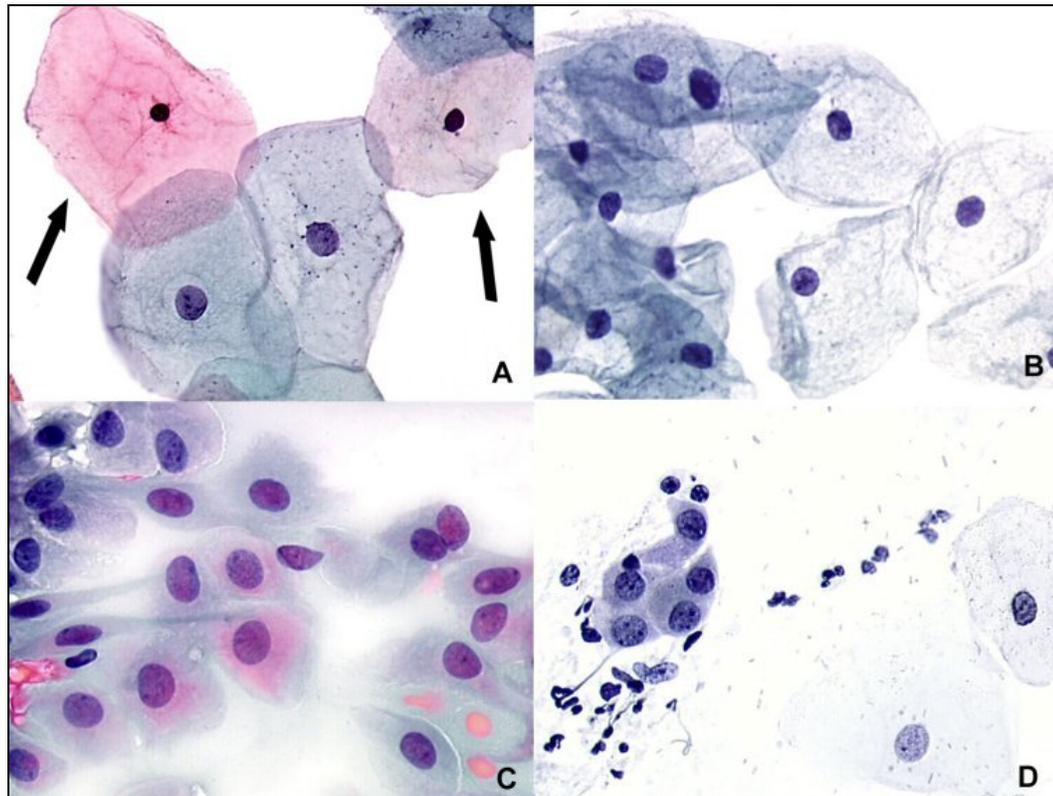
Figura 9. Placa con diagnóstico NIC II⁷



Las imágenes mostradas presentan la forma de las células dentro de cada una de las placas de estudio, al evaluarlas se determinó que la visual fluorescente natural no arrojó información contundente en el área que han sido establecidas como precancerosas por los métodos tradicionales. Y por tanto es difícil que sean empleadas como factor discriminante entre muestras negativas y positivas de lesión cervical, diferente a si se utilizan fluorocromos como en el estudio realizado por [Reb03].

⁷ Placa de la Liga número de referencia 04-09944. Tiempo de exposición 20 [s] , objetivo x20.

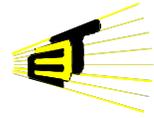
Figura 10. Diferentes tipos de células escamosas



Fuente: http://screening.iarc.fr/atlascyto_detail.php?flag=1&lang=1&Id=malpi01b&cat=D1

Al evaluar el método para determinar las causas de la no obtención de los resultados esperados se encontró que:

1. La potencia de la fuente de luz de estimulación es demasiado baja para la estimulación de fluorescencia a nivel celular.



2. El trabajo con muestras *ex vivo*, uno de los pilares de la investigación es el estudio de placas citológicas.⁸

Debido a lo expuesto anteriormente, se buscó la forma de incrementar la potencia de la fuente de excitación, pero en el laboratorio de genética humana es imposible realizar un cambio al sistema debido a que con ese equipo se trabaja en pruebas de laboratorio de cariotipos; por ello se examinó la posibilidad de trasladar la investigación.

⁸ En estudios de doctorado se tiene pensado el abordar la pregunta ¿cómo afecta la excitación con luz UV al tejido del cérvix en muestras *in vivo*?

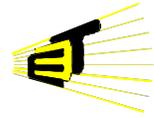
5. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE Y LA DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN MUESTRAS *EX-VIVO* SIN USO DE FLUOROCROMOS

Ahora con la investigación en el laboratorio de Química, se determinan las condiciones de trabajo en donde igual que en los casos anteriores el parámetro de comparación será el resultado de las muestras citológicas y las variables a analizar serán el porcentaje de reflectancia y el porcentaje de transmitancia.

El trabajo de medición de espectroscopia UV-Visible se realizó con el equipo de espectrofotometría Shimadzu serie UV- 2200 y el software UVPROBE en la opción espectro. En las imágenes siguientes se presentan el espectrofotómetro y la cámara para la colocación de las muestras.

Figura 11. Espectrofotómetro y computador



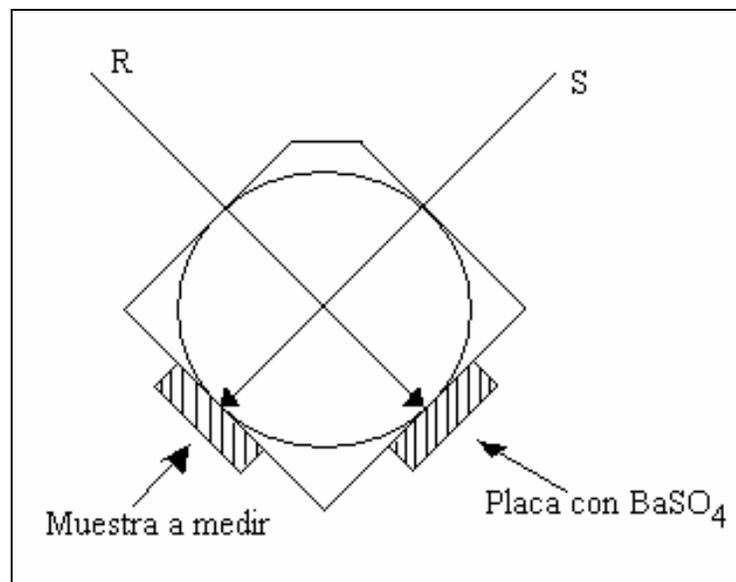


La toma de datos se realizó en dos etapas, la primera se utilizó la reflectancia difusa para la toma de datos y en la segunda la transmitancia. En la Figura 13 y Figura 14 se señala la forma de colocación de la muestra dentro de la cámara para realizar la medición correspondiente.

Figura 12. Cámara del espectrofotómetro

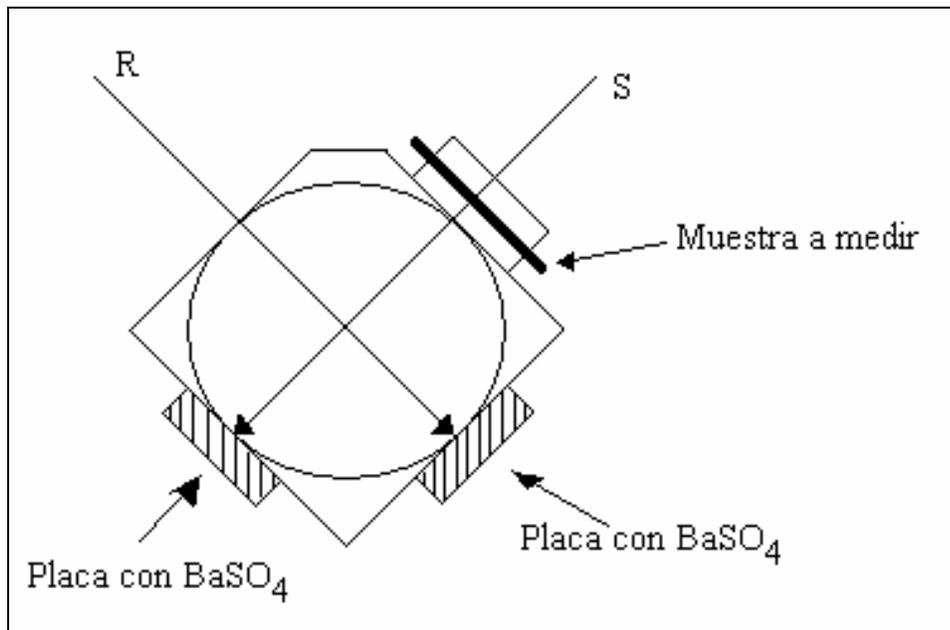


Figura 13. Medición de reflectancia.



La Figura 13 muestra cómo dentro de la cámara dos haces de luz inciden sobre el dispositivo uno de ellos es el de referencia y el otro incide sobre la muestra, al caer el haz de luz sobre la muestra en ella se produce una reflexión que es medida y comparada con la línea base.

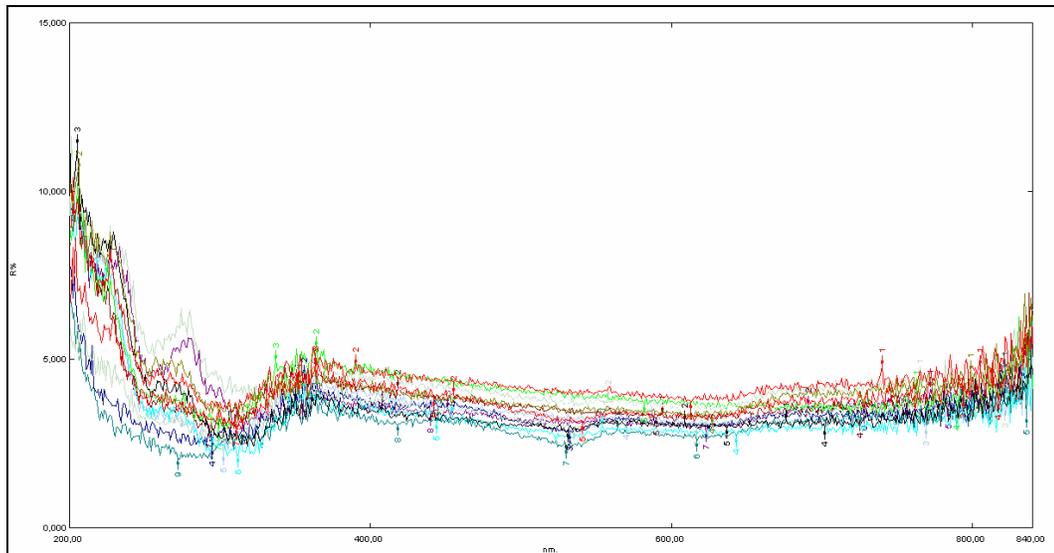
Figura 14. Medición de transmitancia.



La Figura 14 muestra el proceso para la medición de transmitancia en una placa, existen dos haces de luz uno pasa a través de la muestra y el otro es el de referencia.

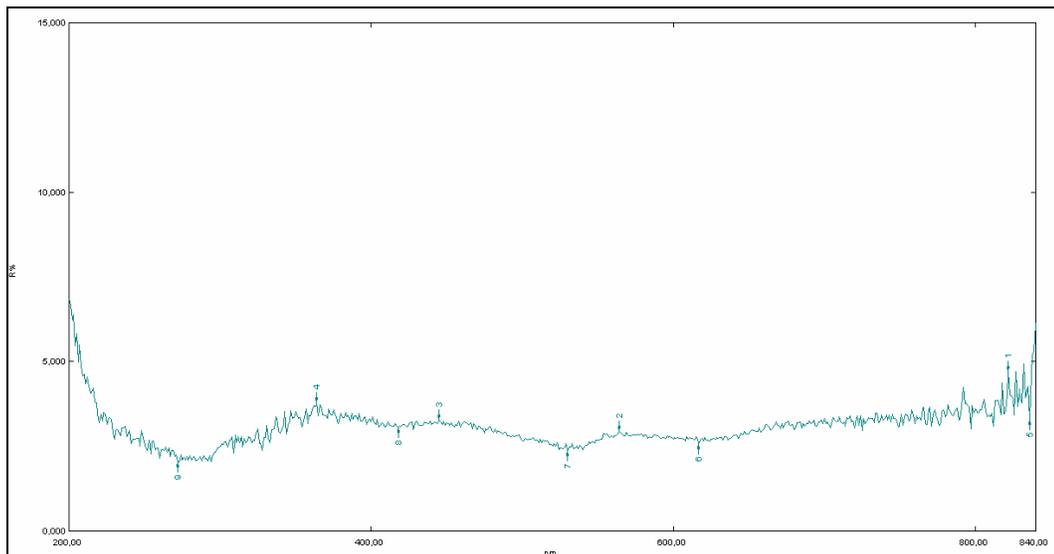
Los resultados obtenidos al colocar las muestras dentro de la cámara por medio del análisis de reflectancia y transmitancia se muestran en las gráficas y tablas siguientes.

Figura 15. Señales espectrales de reflectancia para placas positivas⁹



La figura 15 muestra las señales espectrales de muestras citológicas con lesiones de alto grado y carcinoma.

Figura 16. Promedio de las señales espectrales positivas¹⁰



⁹ Muestras pertenecientes a la Liga contra el cáncer, 14 muestras –m38a a m43b–

¹⁰ Se tomaron las 14 señales espectrales para sacar el promedio

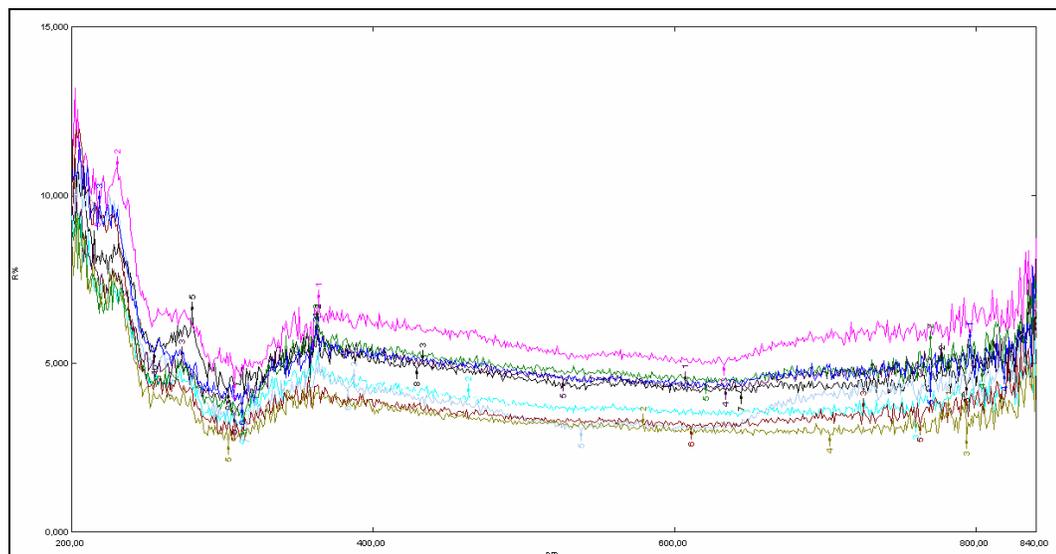


Tabla 7. Datos máximos y mínimos promedio de las placas positivas¹¹

No.	Pico/valle	Longitud de onda (nm)	% R
1	↑	822,00	4,701
2	↑	564,00	2,936
3	↑	445,00	3,281
4	↑	364,00	3,793
5	↓	836,00	3,288
6	↓	617,00	2,589
7	↓	530,00	2,373
8	↓	418,00	3,065
9	↓	272,00	2,046

La Tabla 7 muestra los valores más representativos de la señal espectral de la Figura 16 con el respectivo porcentaje de reflectancia producido. Los datos que presentan una flecha hacia arriba representa los valores pico de la señal, los mostrados con una flecha hacia abajo representan los valles de la misma.

Figura 17. Señales espectrales de reflectancia para placas negativas¹²



¹¹ Figura 23

¹² Muestras pertenecientes a la Liga contra el cáncer, 10 muestras –m44a a m48b–



Figura 18. Promedio de las señales espectrales de reflectancia negativas¹³

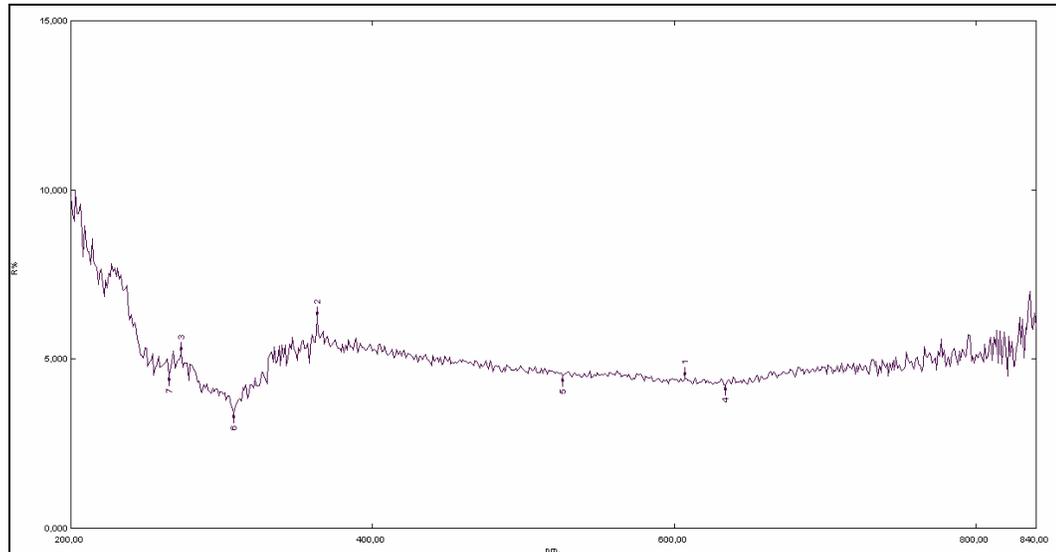


Tabla 8. Datos pico para la señal espectral promedio de las placas negativas

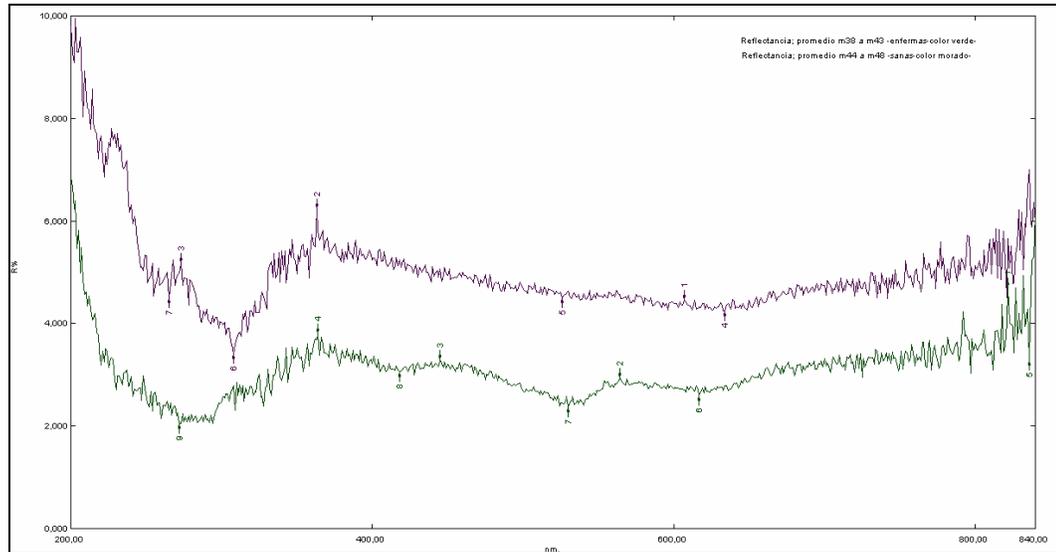
No.	Pico/valle	Longitud de onda (nm)	% R
1	⬆	607,00	4,459
2	⬆	363,00	6,227
3	⬆	273,00	5,179
4	⬇	634,00	4,245
5	⬇	526,00	4,506
6	⬇	308,00	3,418
7	⬇	265,00	4,510

En la Figura 19 se muestran las señales promedio de muestras positivas (verde) y negativas (morado), en ellas no se aprecia ningún cambio que pueda ser representativo para realizar una segregación por grupos.

¹³ Se tomaron 10 muestras para sacar el promedio



Figura 19. Comparativo entre las señales promedio con diagnóstico positivo y negativo



En la Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11 se presentan los porcentajes de reflectancia presentes en algunas muestras valoradas.

Tabla 9. Datos pico para la señal espectral de m01, placa positiva

No.	Pico/valle	Longitud de onda (nm)	% R
1	⬆	819,00	6,465
2	⬆	493,00	3,851
3	⬆	450,00	4,277
4	⬆	363,00	5,040
5	⬇	832,00	5,402
6	⬇	528,00	3,494
7	⬇	491,00	3,749
8	⬇	409,00	3,839
9	⬇	322,00	4,102

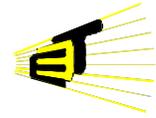


Tabla 10. Datos pico para la señal espectral de m07a, placa negativa

No.	Pico/valle	Longitud de onda (nm)	% R
1	⬆️	885,00	75,137
2	⬆️	739,00	4,858
3	⬆️	347,00	5,188
4	⬇️	773,00	4,344
5	⬇️	355,00	4,138
6	⬇️	299,00	3,514

Tabla 11. Datos pico para la señal espectral de m07a, placa negativa

No.	Pico/valle	Longitud de onda (nm)	% R
1	⬆️	801,00	3,348
2	⬆️	554,00	2,708
3	⬆️	423,00	3,159
4	⬆️	364,50	3,822
5	⬆️	206,50	23,357
6	⬇️	806,00	2,759
7	⬇️	628,00	2,454
8	⬇️	539,00	2,583
9	⬇️	494,00	2,690
10	⬇️	421,00	3,049
11	⬇️	289,00	2,129
12	⬇️	194,50	20,204

Al comparar los resultados de las placas con los promediados y por grupos no se encontró ninguna característica particular entre señales pico se muestras positiva y negativas.

Como último intento se realizó el análisis de los datos mediante dos programas realizados en MATLAB¹⁴; se desarrollaron dos programas el primero encargado de

¹⁴ MATLAB es la abreviatura de *Matrix Laboratory* (laboratorio de matrices), es un programa de cálculo numérico, orientado a matrices y vectores. Contiene *Toolbox*, algunas de ellas están destinadas al redes

seleccionar los datos, la distribución de las muestras de entrenamiento y prueba de la red, y el segundo una red neuronal¹⁵ *backpropagation* (ver anexo D).

El primer programa tomaba los datos obtenidos por las pruebas de reflectancia y transmitancia, tomaba dos grupos de estudio una para entrenamiento de la red y otro para la validación de los datos, se normalizaban los mismos y se arreglan en un solo vector para su ingreso a la red neuronal.

En programa de la red neuronal *backpropagation* se introducen el vector de datos encargado de seleccionar la mejor configuración para la red, el proceso dura 50 horas continuas, tiempo en el cuál se producen algunas redes para las pruebas; al tomar el segundo conjunto de datos para analizar los resultados obtenidos no se obtuvieron los mejores resultados.

La comprobación no arrojó ninguna red que pudiese discriminar una muestra negativa de una positiva. Al buscar las posibles causas para los resultados obtenidos se encontró que el factor que podía tener mayor relevancia es la toma de datos con muestras *ex-vivo*.

neuronales, procesado digital de señal, adquisición de datos, economía, inteligencia artificial, lógica difusa, entre otras. También cuenta con otras herramientas como Simulink, que sirve para simular sistemas.

¹⁵ Las redes de neuronas artificiales (RNA) son un paradigma de aprendizaje y procesamiento automático inspirado en la forma en que funciona el sistema nervioso de los animales. Consiste en simular las propiedades observadas en los sistemas neuronales biológicos a través de modelos matemáticos recreados mediante mecanismos artificiales (como un circuito integrado, un ordenador o un conjunto de válvulas). El objetivo es conseguir que las máquinas den respuestas similares a las que es capaz el cerebro que se caracterizan por su generalización y su robustez



CONCLUSIONES

1. Este trabajo es un primer acercamiento en al estado del arte y el aspecto metodológico de la determinación cáncer de cuello uterino mediante técnicas de microscopia y espectroscopia de fluorescencia.
2. Se encontró que al realizar la investigación para la determinación del estudio de la respuesta fluorescente natural en muestras *ex-vivo*, no es posible realizar una separación entre placas negativas y positivas. Como evidencia se presentan los métodos descritos en los capítulos 3 y 4.
3. Se desarrollo un procedimiento numérico para clasificar los tejidos sanos, con lesión o carcinoma a través de MATLAB, dicho procedimiento reforzó la hipótesis nula¹⁶ de la investigación. Siempre correlacionando los resultados obtenidos con el sistema internacional Bethesda 2001.
4. La investigación abre un camino para la realización de estudios en el campo de la fluorescencia especialmente al desarrollo de técnicas para la respuesta fluorescente de muestras *in-vivo*¹⁷. Estos nuevos investigadores poseerán una herramienta para direccionar su investigación.

¹⁶ Mediante la fluorescencia natural de las muestras de cuello uterino *ex-vivo*, no es posible diferenciar el tejido anormal del tejido sano por medio del análisis de la respuesta espectral.

¹⁷ Este nuevo trabajo de investigación será realizado en estudios de doctorado.



5. Los principales actores responsables de la fluorescencia en las células del cérvix son el NADH y FAD, estas coenzimas participes del metabolismo requieren estudios adicionales para que futuras investigaciones den más luces en la forma de trabajo de ellas.



BIBLIOGRAFÍA

- [Alt94a] Altman, D. Bland, J. *Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity*. 1994.
- [Alt94b] Altman D.G., Bland J.M. *Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values*. 1994.
- [Ben03] Benavides, J.M. Et al. *Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer*. *Optics Express*. Vol 11, No 10. Mayo 2003.
- [Bel01] Belinson, J. Qiao, Y.L. Et al. *Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: A Cross-Sectional Comparative Trial of Multiple Techniques to Detect Cervical Neoplasia*. *Gynecologic Oncology*. Septiembre de 2001.
- [Big97] Bigio, I. *Ultraviolet and visible spectroscopy for tissue diagnostics: fluorescent spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy*. *Phys. Med. Biol.* 42. 1997.
- [Car05] Carlson, K. Et al. *Confocal microscopy: imaging cervical precancerous lesions*. *Gynecologic oncology*. Septiembre 6 de 2005.
- [Cap04] Cabriales, R. Luminiscencia en polímeros semiconductores. *Revista Ingenierías*, Vol. VII, No 23. Nuevo León, México. Abril-Junio 2004.
- [Cha05] Chang, S.K. Pavlova, I. Follen, M. Richards, R.K. *Fluorescence spectroscopy as a tool for detecting cervical pre-cancer*. *Science Direct*. EL SEVIER. 2005.
- [Dre02] Drezer, R. Follen, M. Richards, R.K. *Optical imaging for the detection of cervical cancers in vivo*. IEEE. 2002.
- [Dre03] Drezer, R. Et al. *Optical imaging of the cervix. Second international conference on cervical cancer. Supplement to cancer*. Abril 29 de 2003.
- [Duj94] Dujardin, B. Van, J. Van, A. Unger, J. Van, P. *Likelihood ratios: a real improvement for clinical decisión making?*. 1994.



- [Ech02a] Echeverri, J.H. Trabajo de investigación sobre la sensibilidad y especificidad de la prueba de papanicolau para la detección de infección por VPH en hombres. Bucaramanga. 2002.
- [Ech02b] Echeverri, J.H. *Marco Teórico Cáncer*. Bucaramanga. 2002.
- [Fer03] Ferenczy, A. Faupel, M . *Optical Imaging of the Cervix. Second International Conference on Cervical Cancer*. Houston, Texas. American Cancer Society. 2003.
- [Fic98] Ficha de datos de seguridad. MERCK. Diciembre 15 de 1998.
- [Fin05] Finlay, J.C. Foster, T.H. *Recovery of hemoglobin oxygen saturation and intrinsic fluorescence with a forward-adjoint model. Appl Opt.* Abril de 2005.
- [Gom06] Gómez, A . Página de Internet. http://www.tuotromedico.com/temas/cancer_uterino.htm. Enero 27 de 2006.
- [Huu04] Huh, W. Et al. *Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in vivo: Results of a 604-patient study. American journal of obstetrics and gynecologic.* 2004.
- [Kon04] Kong, S. “Análisis of hyperspectral fluorescente images for poultry skin tumor inspection”. *Applied Optics*. Vol.43 No. 4. 1 de Feb. de 2004.
- [Lac05] Lacruz, P.C. Nomenclatura de las lesiones cervicales. 7º congreso hispanoamericano de anatomía patológica. http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id_trabajo=538. Septiembre de 2005.
- [Mac03] MacRae, M. *Solutions for materials analysis. Spectroscopy as an Emerging Tool for Cancer Diagnostics and Monitoring*. Review Spectroscopy, 2003.
- [Mee85] Meehan. *Optical Methods. Fundamentals of spectrophotometry*. 1985.
- [Med06] MedlinePLUS. Prueba Papanicolau. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003911.htm>. Página internet. Septiembre 2006.
- [Mej97] Mejía, E. *Tesis de Grado. Implementación de un método de análisis cualitativo y cuantitativo por espectroscopía de fluorescencia inducida por láser*. Universidad Industrial de Santander. 1997.



- [Mie82] Mielenz, Klaus D. Measurement of photoluminescence. New York: academic press, 1982.
- [Mil05] Milbourne, A. Et al. *Result of pailot study of multiespectral digital colpscopy for the in vivo detection of cervical intraepithelialneoplasia. Gynecologic oncology.* Octubre 3 de 2005.
- [Mil03] Millot, C. Bondza, P. Millot, J.M. Lallermand, A. Manfait, M. *Autofluorescence spectroscopy of malpighian epithelial cells, as a new tool for analysis of cervical cancer precursors. Histol Histopathol.* Abril de 2003.
- [Mül01] Müller, M. and Georgakoudi, Irene. *Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. Applied Optics.* Vol 40. 2001.
- [Nai02] Nair, M.S. Ghosh, N. Raju, N.S. Pradhan, A. *Determination of optical parameters of human breast tissue from spatially resolved fluorescence: a diffusion theory model. Appl Opt.* Julio de 2002.
- [Ops05] Organización Panamericana de la Salud. *Cáncer Cervicouterino. Hoja informativa. Página de Internet.* Septiembre de 2005.
- [Pag04a] Página de Internet. <http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/molspec>. UV-Vis Luminescence Spectroscopy Theoretical principles. Agosto 2004.
- [Pag04b] Página de Internet. http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/principio_microscopia_fluorescencia.htm. Principios de la microscopía de fluorescencia. Agosto 2004.
- [Pal03] Palmer, G.M. Keely, P.J. Breslin, T.M. Ramanujam, N. *Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines. Photochem Photobiol.* Noviembre 2003.
- [Pav03] Pavlova, I. Sokolov, K. Drezek, R. Malpica, A. Follen, M. Richards-Kortum, R. *Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy. Photochem Photobiol.* Mayo de 2003.
- [Per00] Pérez, F. Tesis de grado. *Diseño y montaje de un sistema espectroscópico para espectroscopía Raman intensificada por efecto superficial.* Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2000.



- [Rah05] Rahman, M. Et al. *Optical imaging of cervical pre-cancer with structured illumination: An integrate approach. Gynecologic oncology*. Septiembre 9 de 2005.
- [Ric04] Richards-Kortum, Rebecca. Informe sobre estudios clínicos sobre una sonda de detección óptica de cáncer cervical. Universidad de Texas en Austin. Página de Internet “*Anderson Cancer Center home page*”. Marzo de 2004.
- [Rid06] Riddle, D. Revisión de producto: espectrómetros *Ocean Optics* y software. *Advanced Aquarist’s Online magazine*. Página de Internet. Septiembre de 2006.
- [Rod04] Rodriguez, E. Klinger, J. Montaña, R. Castro, W. Bastidas, A. Modelo de construcción de un fotómetro de dispersión y fluorescencia aplicable al estudio de células patológicas. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. 2004
- [Sac94] Sackett, D. Haynes, R. Guyatt, G. Tugwell P. Epidemiología clínica. Ciencia básica para la medicina clínica. 2^a ed. Madrid, España. Editorial médica panamericana. 1994.
- [San80] Sandler G. *The importance of the history in the medical clinic and the cost of unnecessary test*. 1980.
- [Sko94] Skoog, D.A. Leary, J. J. Análisis instrumental. Madrid, España. McGraw-Hill. 1994.
- [Tum98] Tumer, K. Ramanujam, N. Ghosh, J. Richards-Kourtum, R. *Ensembles of radial basis function networks for spectroscopic detection of cervical precancer*. IEEE. *Transaction on biomedical engineering*. Agosto, 1998.
- [Uni87] Espectroscopía Raman y Estructura molecular. Universidad de Concepción, Departamento de Química. Chile. 1987.
- [Wu04] Wu, Y.C. Xi, P. Qu, J. Cheung, T.H. Yu, M.Y. *Depth-resolved fluorescent spectroscopy reveals layered structure of tissue*. *Optics Express*. Julio de 2004.



ANEXOS

ANEXO A. GLOSARIO

Bioluminiscencia: emisión de luz sin radiación apreciable de calor por parte de un organismo vivo. La luz procede de una reacción química de enzimas y otras sustancias en el organismo.

Emisión: desactivación radiante de un estado excitado; transferencia de energía de una entidad molecular a un campo electromagnético.

Espectroscopia: en física y química física, el estudio de los espectros. La espectroscopia se basa en que cada elemento químico tiene su espectro característico.

Estado doblete: estado que tiene un número cuántico de espín electrónico total igual a $1/2$.

Estado excitado: estado de mayor energía que el estado fundamental de una entidad química. En fotoquímica habitualmente significa estado electrónico excitado.

Estado singlete: estado que tiene número cuántico de espín electrónico total igual a 0.

Estado triplete: estado que tiene un número cuántico de espín electrónico total igual a 1.

Filtro (óptico): dispositivo que reduce el intervalo espectral (filtros de banda, de corte y de interferencia) o la potencia radiante de la radiación incidente (filtro neutro o filtro de atenuancia) al transmitir la radiación.



Fluorescencia: emisión espontánea de radiación (luminiscencia) desde una entidad molecular excitada sin modificar su multiplicidad de espín.

Fosforescencia: desde el punto de vista fenomenológico el término se ha utilizado para describir la luminiscencia de larga duración. En fotoquímica mecánica, el término designa a la luminiscencia relacionada con un cambio en la multiplicidad de espín, habitualmente de triplete a singlete o viceversa. También es fosforescencia la luminiscencia desde un estado cuartete a un estado doblete.

Fotoluminiscencia: luminiscencia procedente de la fotoexcitación.

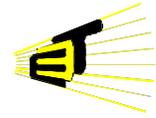
Fotón: cuanto de energía electromagnética de una frecuencia determinada.

Luminiscencia: emisión espontánea de radiación desde una especie excitada electrónica o vibracionalmente y que no está en equilibrio térmico con su entorno.

NAD (nicotinamida adenín dinucleótido): es una coenzima, de la vitamina B3 cuya función principal es el intercambio de hidrogeniones en la producción de energía de todas las células. Forma el primer complejo en la captación de hidrógenos en la fosforilación oxidativa y aparece en múltiples reacciones del metabolismo. El NADH es la nicotinamida adenín dinucleótido reducida, siendo la forma activa. Cuando pierde el hidrógeno (deshidrogenación), cede energía.

Quimioluminiscencia: es provocada por una reacción química; ocurre, por ejemplo, cuando el fósforo amarillo se oxida en el aire produciendo una luminiscencia verde.

Radiación ultravioleta, radiación electromagnética cuyas longitudes de onda van aproximadamente desde los 400nm, el límite de la luz violeta, hasta los 15nm, donde empiezan los rayos X.



Rayos infrarrojos, emisión de energía en forma de ondas electromagnéticas en la zona del espectro situada inmediatamente después de la zona roja de la radiación visible. Oscila entre aproximadamente 700nm y 1mm.

Transferencia de energía: desde un punto de vista fenomenológico, el término se utiliza para describir el proceso a través del cual una entidad molecular absorbe luz y se origina un fenómeno desde el estado excitado de otra entidad molecular. En fotoquímica mecanística este término se reserva para describir el proceso fotofísico por el que un estado excitado de una entidad molecular (el donador) se desactiva a un estado de menor energía mediante la transferencia de su energía a una segunda entidad molecular la cual pasa a un estado de mayor energía. La excitación puede ser electrónica, vibracional, rotacional o translacional. El donador y el aceptor pueden ser dos partes de la misma entidad molecular, en cuyo caso el proceso se denomina transferencia de energía intramolecular.

Transferencia de energía singlete-singlete: transferencia de excitación desde un donador excitado electrónicamente en un estado singlete a un aceptor en el que se produce un estado excitado singlete.

Transferencia de energía singlete-triplete: transferencia de excitación desde un donador excitado electrónicamente en un estado singlete a un aceptor en el que se produce un estado excitado triplete.

Transferencia de energía triplete-triplete: transferencia de energía desde un triplete electrónicamente excitado para producir un aceptor electrónicamente excitado en su estado triplete.

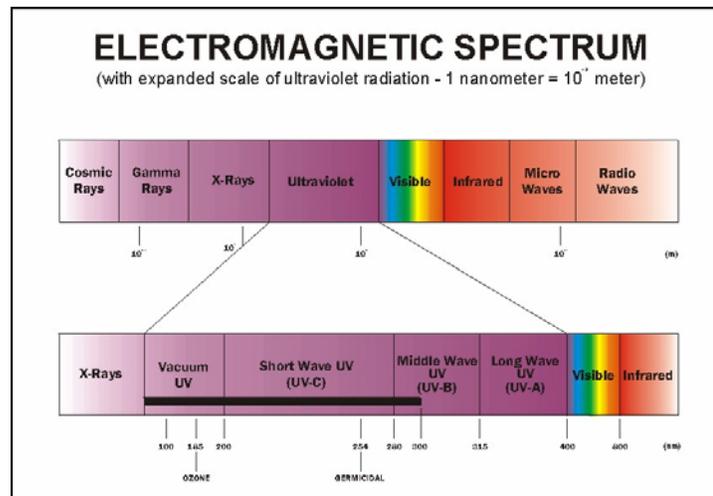
Transiciones triplete-triplete: transiciones electrónicas en las cuales tanto el estado inicial como el final son estados triplete.



ANEXO B. ESPECTROELECTROMAGNÉTICO

Las ondas electromagnéticas se organizan de acuerdo a sus longitudes así se obtiene el espectro electromagnético en donde las ondas mas largas (longitudes desde metros a kilómetros) se encuentran en un extremo (Radio) y las mas cortas en el otro (longitudes de onda de una billonésima de metros) (Gamma).

Figura B1. Espectro electromagnético.



Fuente: <http://www.bigbrandwaterfilter.com/uvdisinfection.html>

Luz Visible: Isaac Newton fue el primero en descomponer la luz visible blanca del Sol en sus componentes mediante la utilización de un prisma. La luz blanca está constituida por la combinación de ondas que tienen energías semejantes sin que alguna predomine sobre las otras. La radiación visible va desde 384×10^{12} hasta 769×10^{12} hz. Las frecuencias mas bajas



de la luz visible (longitud de onda larga) se perciben como rojas y las de mas alta frecuencia (longitud corta) aparecen violetas.

Tabla B1. Longitudes de onda de la luz visible.

Color	Intervalo longitud de onda	Intervalo de frecuencia
rojo	~ 625 to 740 nm	~ 480 to 405 THz
naranja	~ 590 to 625 nm	~ 510 to 480 THz
amarillo	~ 565 to 590 nm	~ 530 to 510 THz
verde	~ 520 to 565 nm	~ 580 to 530 THz
cian	~ 500 to 520 nm	~ 600 to 580 THz
azul	~ 430 to 500 nm	~ 700 to 600 THz
violeta	~ 380 to 430 nm	~ 790 to 700 THz

Fuente: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/e/ec/Spectrum441pxWithnm.png>

Rayos infrarrojos: la radiación infrarroja fue descubierta por el astrónomo William Herschel (1738-1822) en 1800, al medir una zona más caliente mas allá de la zona roja del espectro visible. La radiación infrarroja se localiza en el espectro entre 3×10^{11} hz. hasta aproximadamente los 4×10^{14} Hz. La banda infrarroja se divide en tres secciones de acuerdo a su distancia a la zona visible: próxima (780 - 2500 nm), intermedia (2500 - 50000 nm) y lejana (50000 - 1mm). Toda molécula que tenga un temperatura superior al cero absoluto (-273° K) emite rayos infrarrojos y su cantidad esta directamente relacionada con la temperatura del objeto.

Microondas: la región de las microondas se encuentra entre los 109 hasta aproximadamente 3×10^{11} Hz (con longitud de onda entre 30 cm a 1 mm).



Ondas de Radio: Heinrich Hertz (1857-1894), en el año de 1887, consiguió detectar ondas de radio que tenían una longitud del orden de un metro. La región de ondas de radio se extiende desde algunos Hertz hasta 109 Hz con longitudes de onda desde muchos kilómetros hasta menos de 30 cm.

Rayos X: en 1895 Wilhelm Röntgen invento una máquina que producía radiación electromagnética con una longitud de onda menor a 10 nm a los cuales debido a que no conocía su naturaleza las bautizó como X.

Radiación Ultravioleta: sus longitudes de onda se extienden entre 10 y 400 nm más cortas que las de la luz visible.

Rayos Gamma: se localizan en la parte del espectro que tiene las longitudes de onda mas pequeñas entre 10 y 0.01 nm.



ANEXO C. COENZIMAS RESPONSABLES DE LA FLUORESCENCIA

C.1. Metabolismo

Cada célula desarrolla miles de reacciones químicas que pueden ser exergónicas (con liberación de energía) o endergónicas (con consumo de energía), que en su conjunto constituyen el metabolismo celular.

1. Las células asocian las reacciones: las reacciones endergónicas se llevan a cabo con la energía liberada por las reacciones exergónicas.
2. Las células sintetizan moléculas portadoras de energía que son capaces de capturar la energía de las reacciones exergónicas y las llevan a las reacciones endergónicas.
3. Las células regulan las reacciones químicas por medio de catalizadores biológicos: ENZIMAS.

Las células acostumbran a guardar la energía necesaria para sus reacciones en ciertas moléculas, la principal es el: ATP, trifosfato de adenosina. Las células lo usan para capturar, transferir y almacenar energía libre necesaria para realizar el trabajo químico.

Estructura del ATP: es un nucleótido compuesto por la adenina (base nitrogenada), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato.

Las células requieren energía para múltiples trabajos:

Sintetizar y degradar compuestos

Transporte a través de las membranas (activo, contra el gradiente de concentración)

- Endocitosis y exocitosis
- Movimientos celulares
- División celular
- Transporte de señales entre el exterior e interior celular

Esta energía se encuentra en las moléculas de ATP, en las uniones químicas de alta energía de los fosfatos. Las moléculas de ATP se ensamblan en las mitocondrias a partir del ADP y los Pi con la energía tomada de la ruptura de moléculas complejas como la glucosa, que a su vez deriva de los alimentos ingeridos.

La Glucosa (C₆ H₁₂ O₆) es el combustible básico para la obtención de energía, muchos otros compuestos sirven como alimento, pero casi todos son transformados a glucosa mediante una serie de numerosísimas oxidaciones graduales, reguladas enzimáticamente, al cabo de las cuales el oxígeno atmosférico (ingresado por respiración pulmonar) se une a los átomos de hidrógeno de las citadas moléculas para formar H₂O. En cada oxidación se liberan gradualmente pequeñas porciones de energía que son capturadas para formar el ATP. Si las oxidaciones son fueran graduales, la energía se liberaría de manera violenta y se dispersaría como calor.

C.2. REDOX

Cuando los grupos fosfatos se transfieren al ADP para formar ATP, se está almacenando energía. Otra forma es transferir electrones (e⁻), las reacciones se denominan de oxidorreducción o reacciones redox.

La ganancia de uno o más e⁻ por un átomo, ión o molécula --> REDUCCIÓN

La pérdida de uno o más e⁻ por un átomo, ión o molécula --> OXIDACIÓN

C.2.1. Cofactores Redox

Durante las principales reacciones redox del catabolismo de la glucosa intervienen dos moléculas intermediarias: NAD y FAD. Se denominan cofactores Redox: alternativamente se reducen y luego se oxidan.

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido. NAD⁺ en su forma oxidada y NADH + H cuando está reducido.

La concentración de NAD⁺ en la célula es pequeña; por lo tanto debe reciclarse continuamente de la forma oxidada a la reducida y viceversa.

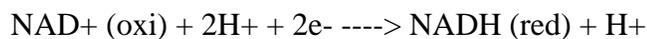
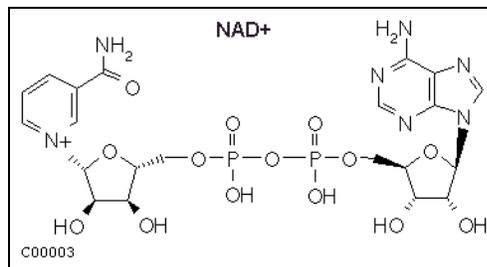


Figura C.1. Estructura del NAD⁺



Fuente: http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/kegg/kegg/db/ligand/cpdhtml/C00003.html

FAD: flavina adenina dinucleótido. Transporta 2H, por lo que es FAD en su forma oxidada y FADH₂ cuando está reducido.

Otros cofactores Redox:

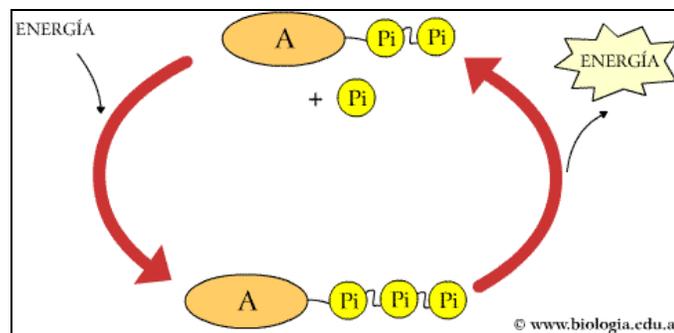
Ubiquinona (Coenzima Q) -- transporta 2H



Grupo Hemo (en los citocromos) -- transporta un electrón

Estas coenzimas responsables de la fluorescencia se producen en el proceso de producción de ATP, que cuando se presentan lesiones o alteraciones dentro de la célula se incrementa la producción de coenzimas especialmente NADH y FAD.

Figura C.2. Procesote producción de ATP



Fuente: www.biología.edu.ar



ANEXO D. PROGRAMAS DE REDES NEURONALES

Para la determinación de las características y procesamiento de datos obtenidos en el laboratorio de química se utilizó MATLAB para la elaboración de las redes neuronales, a continuación se presentan dos de ellos el primero utilizado para la determinación de la red más apropiada para el estudio, El segundo para probar la red seleccionada en el primer programa y comprobar su verdadera eficiencia.

PROGRAMA 1

```
clear all; clc;

%=====
% Encuentra la red más
% apropiada para los datos
% característicos
%=====
tic

load características;
      % De la 01 a 21 son
N_R
      % De la 22 a 31 son
NIC2_R
      % De la 32 a 40 son
NIC3_R
      % De la 41 a 50 son
carc_R

% Vectores de salida
salida_1(1:21)=1;      % muestras
negativas

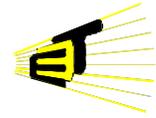
salida_1(22:50)=-1; % muestras positivas

salida_2=ones(2,50); % vector salida dos
filas
salida_2(1,22:50)=-1; % muestras
negativas
salida_2(2,1:21)=-1; % muestras
positivas

% Creación grupo prueba y validación
caracteristica_Te=caracteristica_T(:,1:2:50
);
caracteristica_Tv=caracteristica_T(:,2:2:50
);

salida_1e=salida_1(1:2:50);
salida_1v=salida_1(2:2:50);
salida_2e=salida_2(:,1:2:50);
salida_2v=salida_2(:,2:2:50);

%=====
h=1;
```



```

for h=1:9                %selección
del tipo de entrenamiento
    if h==1
        clase='trainlm';
    elseif h==2
        clase='trainbfg';
    elseif h==3
        clase='trainrp';
    elseif h==4
        clase='trainscg';
    elseif h==5
        clase='traincgb';
    elseif h==6
        clase='traincgp';
    elseif h==7
        clase='traincgp';
    elseif h==8
        clase='trainoss';
    else
        clase='traingdx';
    end

    s=1;                % Neuronas capa de
salida
    g=14;                % Neuronas capa de
entrada
    f=8;                % Segunda capa
    d=8;                % Tercera capa
    y=1;                % configuración capas

    for f=8:22
    for d=8:22
        for s=1:2
            numneuronas=[g f d s];

            for y=1:3
                if y==1
                    tipocapa={'tansig'
'tansig' 'tansig' 'tansig'};
                elseif y==2
                    tipocapa={'purelin'
'tansig' 'tansig' 'tansig'};
                else

                    tipocapa={'purelin'
'purelin' 'tansig' 'tansig'};

                    t=1;

                    % Creación de la red
                    neuronal

                    while t<=4
                        nett
                        =
                        newff(minmax(caracteristica_T),numneuro
                        nas,tipocapa,clase);
                        nett.trainParam.goal
                        = 0.001;
                        nett.trainParam.epochs
                        = 2000;
                        nett.trainParam.time
                        = inf;
                        %nett.trainParam.show
                        = NaN;

                    % Entrenamiento red
                    neuronal

                    if s==1                % Una
                    neurona en la salida
                        [nett,trt]
                        =
                        train(nett,caracteristica_Te,salida_1e,[],[],[
                        ],[]);
                    else                % Dos
                    neuronas en la salida
                        [nett,trt]
                        =
                        train(nett,caracteristica_Te,salida_2e,[],[],[
                        ],[]);
                    end

                    % Prueba con datos de
                    validación

                    Resultado_caracteristica_T
                    =
                    sim(nett,caracteristica_Tv);
                end
            end
        end
    end
end

```




```

[datos_T_NICI,
encabezado_T_NICI] =
xlsread('clasificacion_muestras.xls',
'NICI T');
[datos_T_Ascus,
encabezado_T_Ascus] =
xlsread('clasificacion_muestras.xls',
'ASCUS T');
[datos_T_n, encabezado_T_n]
= xlsread('clasificacion_muestras.xls',
'n T');

%toma solo la primera fila del
encabezado

encabezado_T_p =encabezado_T_p(1,:);
encabezado_T_carc =encabezado_T_carc(1,:);
encabezado_T_NICIII =encabezado_T_NICIII(1,:);
encabezado_T_NICII =encabezado_T_NICII(1,:);
encabezado_T_NICI =encabezado_T_NICI(1,:);
encabezado_T_Ascus =encabezado_T_Ascus(1,:);
encabezado_T_n =encabezado_T_n(1,:);

[spf spc] = size(datos_T_p);
[scf scc] = size(datos_T_carc);
[s3f s3c] = size(datos_T_NICIII);
[s2f s2c] = size(datos_T_NICII);
[s1f s1c] = size(datos_T_NICI);
[saf sac] = size(datos_T_Ascus);
[snf snc] = size(datos_T_n);

%=====
%organizando el vector de datos

i=1;j=1;

while i<=spf;

longitudonda(j,1)=datos_T_p(i,1);
T_p(j,:) = datos_T_p(i,2:spc);
T_carc(j,:) = datos_T_carc(i,2:scc);
T_NIC3(j,:) =
datos_T_NICIII(i,2:s3c);
T_NIC2(j,:) =
datos_T_NICII(i,2:s2c);
T_NIC1(j,:) =
datos_T_NICI(i,2:s1c);
T_ascus(j,:) =
datos_T_Ascus(i,2:sac);
T_n(j,:) = datos_T_n(i,2:snc);

i=i+2;
j=j+1;
end

%=====
% grupo muestras
% e = entrenamiento; v =
validación

%grupo de muestras carcinoma, NICIII,
NICII, NICI y negativas

e_p_T = T_p(:,1:2:spc-1);
[FpT CpT] = size(e_p_T);
v_p_T = T_p(:,2:2:(spc));
[FvpT CvpT] = size(v_p_T);

e_n_T = T_n(:,1:2:snc-1);
[FnT CnT] = size(e_n_T);
v_n_T = T_n(:,2:2:(snc));
[FvnT CvnT] = size(v_n_T);

%grupo entrenamiento
e_T = [e_p_T e_n_T];

%grupo validación
v_T = [v_p_T v_n_T];

e_visibleT = e_T(211:510,:);
    
```



```

e_violetaT = e_T(211:240,:);
e_anilT = e_T(241:260,:);
e_azulT = e_T(261:310,:);
e_cianT = e_T(311:330,:);
e_verdeT = e_T(331:375,:);
e_amarilloT = e_T(376:400,:);
e_naranjaT = e_T(401:435,:);
e_rojoT = e_T(436:500,:);

%entrenamiento neuronal verde
red
%net = newff(minmax(ne_verdeT),[1 10
10 2],{'purelin' 'purelin' 'tansig'
'tansig'},'trainlm');
%net.trainParam.goal = 0.01;
%net.trainParam.epochs = 500;
%net.trainParam.show = NaN;

%se asigno 1 a muestras positivas y -
1 a muestras negativas
salida1(1:CpT) = 1;
salida1(CpT+1:CpT+CnT) = -1;

salida2=zeros(2,CpT+CnT);
salida2(1,1:CpT) = 1;
salida2(2,CpT+1:CpT+CnT) = -1;

%salidas para la validación de
resultados
vsalida1(1:CvpT) = 1;
vsalida1(CvpT+1:CvpT+CvnT) = -1;

vsalida2=zeros(2,CvpT+CvnT);
vsalida2(1,1:CvpT) = 1;
vsalida2(2,CvpT+1:CvpT+CvnT) = -
1;

%=====
=====
%normalización

ne_visibleT=sqrt(e_visibleT);
nv_visibleT=sqrt(v_visibleT);

ne_verdeT=sqrt(e_verdeT);
nv_verdeT=sqrt(v_verdeT);

%prom_tredR =
mean(Red_entrena_R);
%std_tredR = std(Red_entrena_R);
%norma_tredR = (Red_entrena_R-
repmat(prom_tredR,711,1))./repmat(
std_tredR,711,1);

%red neuronal espectro
visible
%nett = newff(minmax(ne_visibleT),[8 12
10 2],{'tansig' 'tansig' 'tansig'
'tansig'},'trainscg');
%nett.trainParam.goal = 0.015;
%nett.trainParam.epochs = 1000;
%nett.trainParam.time = inf;
%nett.trainParam.show = NaN;

%[nett,trt] =
train(net,ne_verdeT,salida2,[],[],[],[]);

%Resultado_entrenamiento_verdeT =
sim(net,ne_verdeT)

%Resultado_validacion_verdeT =
sim(net,nv_verdeT)

%[nett,trt] =
train(net,ne_visibleT,salida2,[],[],[],[]);

%Resultado_entrenamiento_visibleT =
sim(net,ne_visibleT)

%=====
=====
%verificación red neuronal
ESPECTRO VISIBLE

%Resultado_validacion_visibleT =
sim(net,nv_visibleT)

toc
    
```