Análisis de la Piel Humana Mediante Espectroscopía de Reflexión Difusa

por

M.C. José Alberto Delgado Atencio

Tesis que se presenta como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la Especialidad de Óptica

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica

Tonantzintla, Puebla, México, diciembre de 2007.

Supervisada por:

Dr. Alejandro Cornejo Rodríguez
Director de Tesis, Coordinación de Óptica, INAOE

Dr. Juan Francisco Rivas Silva
Co-director de Tesis, Instituto de Física, BUAP

©INAOE 2007
Derechos Reservados
El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir copias de esta tesis en su totalidad o en partes.

Resumen

El estudio de la piel humana utilizando técnicas ópticas modernas es un tema actualmente en desarrollo, destacándose el uso de la espectroscopía de reflexión difusa por su fácil implementación. El objetivo general de este proyecto de tesis ha sido realizar un análisis teórico y experimental de la propagación de la luz en la piel humana, que nos proporcione una mejor comprensión del espectro de reflexión difusa de la piel y su dependencia con los parámetros biológicos de interés, con vista a aplicaciones de diagnóstico médico. El método de Monte Carlo es adoptado para realizar las simulaciones numéricas del espectro de reflexión (especialmente el código MCML) y una variante simplificada de la aproximación analítica es usada en la interpretación de los espectros medidos.

Nuestra contribución al estudio de la piel humana mediante la espectroscopía de reflexión difusa incluye: un nuevo modelo óptico para la piel neonatal con las correspondientes simulaciones; implementación y caracterización de un espectrómetro de fibra óptica para la investigación del espectro de reflexión difusa; investigaciones experimentales del desempeño de espectrómetros comerciales en la medición del espectro de reflexión difusa de la piel de voluntarios y pacientes; y el desarrollo de códigos en MATLAB® que incorporan los parámetros ópticos y biológicos de la piel facilitando el proceso de simulación espectral.

La herramienta computacional implementada facilita la simulación espectral usando como núcleo el código MCML, comprobando la utilidad de esta herramienta al realizarse con ella tres simulaciones de interés. En este sentido se destaca la modelación del espectro de reflexión difusa de la piel de la frente de los neonatos.

El modelo óptico desarrollado para la piel neonatal demuestra que en todos los casos existe una marcada dependencia de la reflexión espectral con la

fracción volumétrica de melanosomas y la fracción volumétrica de sangre. La forma del espectro de reflexión cambia notablemente en el intervalo de 400-500 nm cuando se varía la concentración de bilirrubina, resultando una relación no lineal entre la intensidad espectral y la concentración. El modelo de tres capas usado, reproduce cualitativamente los resultados reportados en la literatura para simulaciones numéricas utilizando la teoría de la difusión.
El espectrómetro de fibra óptica implementado se calibró por longitud de onda cubriendo un intervalo espectral de 180 nm. La automatización se soportó en dos programas: a) el propio de la cámara CCD para la adquisición de imágenes y b) uno desarrollado en Mathcad Professional 2001 para la calibración espectral por longitud de onda y para la adquisición de espectros de reflexión difusa. La resolución alcanzada es aceptable para la medición del espectro de reflexión difusa de la piel humana. Esto se comprobó midiendo el espectro en voluntarios reproduciéndose las características espectrales principales esperadas en el intervalo de 520 a 700 nm.
Por otra parte, se demostró que el espectrómetro comercial CM2 no reproduce el patrón característico ‘’W’’ relacionado con la absorción de la sangre, resultando inapropiado para estudios que contengan a la misma. No obstante, puede ser utilizado para estudios comparativos entre zonas con diferente grado de pigmentación (incluido los diferentes tipos de piel), y zonas sanas y lesionadas.
Por último, el estudio realizado con el espectrómetro USB 4000 nos permitió adquirir información de cómo debe ser perfeccionado el proceso de medición para situaciones reales en un ambiente clínico. Se encontró una dependencia (en el intervalo 600 nm $< \lambda <$ 900 nm) entre la pendiente del espectro registrado y el grado de pigmentación, que cualitativamente indica que a mayor pigmentación mayor pendiente del espectro. Esta relación se cumple tanto para la frente como para el antebrazo, aunque la pendiente del espectro en el antebrazo es inferior a la del espectro en la frente para un mismo individuo. Se elaboraron los programas de graficado de los espectros

usando el ambiente MATLAB® y se adquirió conocimiento del uso y manejo del espectrómetro y su software para esta aplicación. Este espectrómetro registra adecuadamente el patrón “W” típico de la presencia de la sangre.

Dedicatoria

*A **mis padres** Ana y Alberto*
por inculcarme el camino correcto en la vida y apoyarme en todas mis ideas.

*A **mi esposa** Margarita*
por su amor, cariño y comprensión que siempre me han acompañado en todo momento.

*A **mi hijo** Mauricio*
porque todo lo hago por él.

*A **Yanet***
mi otra niña que nunca olvido.

*A **mis hermanas***
Mercedita y Margarita por su cariño de toda la vida.

*Y **a mi sobrina***
Odett que quiero como a una hija.

Agradecimientos

Primeramente me gustaría agradecer a mi asesor de tesis el Dr. Alejandro Cornejo Rodríguez quien me aceptó como su alumno de doctorado en momentos importantes de mi llegada al INAOE. El profe Cornejo, como le llamamos cordialmente, siempre ha motivado la independencia y la confianza en mi trabajo; con su carácter jovial, pero siempre crítico, él ha guiado el desarrollo de este trabajo de tesis y en general a compartir las otras aristas de la vida con nuestros compañeros del grupo. Agradezco también a mi asesor externo, el Dr. Juan Francisco Rivas Silva, por la conducción en el desarrollo de esta tesis, principalmente en lo concerniente a la parte teórica. La simpatía natural y el respecto mutuo entre mis asesores y yo ha sido un factor determinante para el desarrollo y culminación de este trabajo.

Agradezco al Dr. Gabriel Martínez Niconoff quien me comunicó la aceptación por parte del INAOE para iniciar mis estudios de doctorado en esta institución. Esta comunicación y el apoyo que recibí de él en todo momento son dos cosas inolvidables en mi memoria.

Siempre estaré agradecido de mis amigos Arllene Pérez y César Santiago por su solidaridad incondicional a mi llegada a México, por facilitar que mi estancia en este hermano país fuera más amena y segura. Hago extensivo este agradecimiento a la familia de César que siempre me acogió como uno más de los suyos. Quiero agradecer también a mi amigo Suren Stolik por todo el apoyo brindado que contribuyó a realizar estos estudios.

Agradezco al Dr. Ponciano Rodríguez por su amable cooperación a este proyecto al prestar parte de su instrumentación para el proceso de calibración del espectrómetro implementado. Al Dr. Jorge Castro al iniciarme en el uso y manejo de la adquisición de imágenes con cámaras CCD. Al estudiante Miguel Alcaraz por ayudarme a realizar los primeros programas en

Mathcad. A los doctores Javier Báez y Félix Aguilar por su siempre disposición en colaborar y debatir algunos puntos de la temática.
El desarrollo de los arreglos experimentales implementados en esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo brindado por los compañeros del taller de óptica, especialmente los técnicos Salvador Quechol López y Miguel Arroyo Hernández. En este sentido también contribuyeron el técnico de laboratorio Pedro Tecualt Tecualt, la licenciada Ana Maria Zarate y el ingeniero mecánico Javier Arriaga.
Parte del trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo del Dr. Sergio Vázquez y Montiel en el establecimiento de la colaboración con empresas privadas y hospitales del sector médico interesados en la aplicación de la investigación de este tema de tesis.
Aprovecho para agradecer a los compañeros de mi generación por brindarme la oportunidad de compartir con ellos, especialmente a quienes se convirtieron en mis amigos, Edmundo Rodríguez y Helen Zúñiga; ellos permitieron que yo conociera parte de la cultura, costumbres y problemas de México. Especialmente con Edmundo estoy eternamente en deuda pues me enseñó que yo podía programar y que lo importante era que el código hiciera lo que yo necesitaba. En este sentido también agradezco al Dr. Paco Renero quien nos alentó al trabajo en grupo durante el curso que tradicionalmente imparte. También, me es muy grato recordar la ayuda de mis compañeros de seminario de avances de tesis, los estudiantes Perla, Félix, Fausto, Luis y Melquiades.
Un especial agradecimiento para el Dr. Steven L.Jaques por las discusiones personales y vía correo electrónico relacionadas con la temática de la óptica de los tejidos biológicos, especialmente las concernientes a las simulaciones numéricas del espectro de reflexión difusa de la piel neonatal.
Gracias también para el Dr. Fermín Granados por estar siempre dispuesto a prestarme un libro, indicarme una dirección u orientarme en los asuntos

académicos. Me ha dado mucho gusto conocer a personas como él en este país.

A las secretarias Patty, Liliana, Eicela y Aurora por su carácter tan amable y la disposición de orientarme y apoyarme en todos los detalles de la Coordinación de Óptica.

Un merecido agradecimiento expreso a Don Raúl y a Doña Serafina, propietarios de la casa donde he vivido este tiempo, quienes me acogieron desde el principio como uno más de su familia.

En general agradezco toda la ayuda y orientación recibida del personal de la Biblioteca, la Coordinación Docente, la Administración, y todos los que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a mi institución en Cuba, el CEADEN, por el apoyo brindado para realizar mis estudios de doctorado. Especialmente quiero agradecer a Juan Gualberto Darias, Antonio Leyva, Luis Baly, Guido Martín, Prieto, y Frías por su excelente hábito de facilitar los trámites burocráticos sin descuidar la disciplina. Especialmente Tony consideró mi trabajo con posibilidades de darse a conocer en el Simposio de Física Médica efectuado en el año 2002. Aprovecho también justo aquí para expresar mi gratitud al Dr. Luis Manuel Montaño del CINVESTAV, México.

También en Cuba estoy en deuda con los doctores Anasagasti y Matos quienes han colaborado a la realización de esta tesis al brindar su experiencia y criterios médicos, en los estudios realizados en el Hospital Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

Por último y no por ello menos importante, quiero dar gracias a todos mis amigos que siempre han extendido su mano para que yo pudiera culminar felizmente estos estudios, y al pueblo de México por aceptar que personas como yo podamos aprovechar sus instalaciones académicas y compartir su tierra como hermanos.

Prefacio

El trabajo presentado en esta tesis se llevo a cabo bajo el programa de doctorado en Ciencias en la Especialidad de Óptica del Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE) de México, con apoyo de una beca institucional de dicho enditad. El proyecto se desarrolló principalmente en los laboratorios de óptica del INAOE y en menor grado en el Instituto Nacional Oncología y Radiobiología de Cuba (INOR).

El INAOE ha desarrollado investigaciones en el campo de la biofotónica y la óptica medica. Estas investigaciones incluyen por ejemplo la manipulación de objetos biológicos mediante la técnica de pinzas ópticas y estudios y aplicación de sistemas para la caracterización y diagnóstico del ojo humano, entre otras aplicaciones. Esta tesis aborda, como parte de las investigaciones en el campo de la óptica médica, el tema de la espectroscopía de reflexión difusa como herramienta para el diagnóstico de enfermedades de la piel.

El proyecto desarrollado tiene un carácter académico con un enfoque dirigido hacia aplicaciones prácticas en el sector médico biológico, de ahí que los objetivos y los resultados del trabajo presentados están en correspondencia con este aspecto. El objetivo general de este proyecto de tesis ha sido realizar un estudio teórico y experimental de la propagación de la luz en la piel humana que nos proporcione una mejor comprensión del espectro de reflexión difusa de la piel y su dependencia con los parámetros biológicos de interés con vista a aplicaciones de diagnóstico médico.

El Capítulo 1 proporciona una breve introducción a la temática que abordamos en esta tesis, la motivación y los objetivos. Se abarca tanto una panorámica general de las técnicas experimentales como los modelos matemáticos que son básicos para la simulación de la interacción de la luz con la piel.

En el Capítulo 2 se consideran los fundamentos teóricos de la interacción de la radiación óptica con la piel humana. Inicialmente se abordan las características ópticas generales de los medios biológicos y se particulariza al caso de la piel, revisando su anatomía y los principales componentes de importancia óptica en la zona visible del espectro electromagnético. Posteriormente hacemos alusión a la Teoría del Transporte como el marco teórico que usaremos para explicar la distribución de la luz en la piel y presentamos además el método de Monte Carlo como una solución numérica exacta de la ecuación de transferencia radiativa. Este método es adoptado para realizar las simulaciones numéricas en este trabajo de tesis. Aquí se describe brevemente un paquete de software de dominio público denominado MCML. Además, presentamos y describimos dos códigos en MATLAB®, desarrollados en este proyecto, con el propósito de implementar el estudio espectral de las magnitudes físicas de salida que proporciona el programa ejecutable MCML.

El Capítulo 3 es dedicado a realizar la simulación numérica del espectro de reflexión de la piel humana para varios casos de interés en el diagnóstico clínico (dermatología y neonatología). Se combinan aquí, la propuesta de varios modelos ópticos de la piel con la herramienta de simulación espectral desarrollada en el Capítulo 2.

La implementación de un espectrómetro de reflexión es presentada en el Capítulo 4, donde se lleva a cabo un estudio experimental de este arreglo atendiendo a los siguientes parámetros: rango espectral de trabajo, calibración por longitudes de onda y resolución espectral. Además se evalúa la funcionalidad de este arreglo en la determinación del perfil de emisión espectral de fuentes de luz de características espectrales conocidas y del espectro de reflexión de la piel en voluntarios sanos.

El Capítulo 5 presenta dos estudios experimentales realizados para la medición de la reflexión espectral de la piel humana en diferentes patologías médicas y condiciones de salud. El primer estudio aborda el análisis de la

factibilidad del empleo del espectrofotómetro comercial CM2S (Color Savvy, Color Mouse Too! Instrumentation) para realizar mediciones comparativas *in-vivo* del espectro de reflexión difusa de lesiones de la piel y zonas sanas circundantes en pacientes y personal voluntario. El segundo estudio se lleva a cabo utilizando un espectrómetro comercial de fibra óptica (USB 4000, Ocean Optics) que opera en la zona visible e infrarroja cercana del espectro electromagnético. El objetivo aquí es evaluar este espectrómetro y sus aditamentos en la medición *in- vivo* del espectro de reflexión difusa de la piel en sitios corporales diferentes del personal voluntario. Este estudio servirá de referencia para uno más completo que se realizará en pacientes que asistan al servicio de consulta externa de cáncer de piel del Hospital Universitario de Puebla.

Por último, el Capítulo 6 está dedicado a presentar las conclusiones principales de esta tesis y las perspectivas futuras de trabajo que dan continuidad a la misma.

La Tesis cuenta de los apéndices A, B, C, D y E. El apéndice E contiene la lista de publicaciones y participaciones en congresos nacionales e internacionales en los que está basado el trabajo de tesis doctoral.

Índice General

Resumen i
Dedicatoria v
Agradecimientos vii
Prefacio xi
Capítulo1. Introducción 1
1.1 INTRODUCCIÓN 1
1.1.1 Técnicas experimentales 1
1.1.2 Modelos matemáticos 4
1.2 MOTIVACIÓN 9
1.3 OBJETIVOS 10
1.4 CONCLUSIONES 11
REFERENCIAS 13
Capítulo 2. Fundamentos Teóricos 17
2.1 MEDIOS BIOLÓGICOS 18
2.1.1 Esparcimiento 19
2.1.2 Absorción 21
2.2 ANATOMÍA DE LA PIEL 23
2.2.1 Epidermis 24
2.2.2 Dermis 25
2.2.3 Hipodermis 26
2.3 INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ÓPTICA CON LA PIEL 27
2.3.1 Teoría del Transporte 27
2.3.2 Solución de la Ecuación de Transferencia Radiativa por el Método de Monte Carlo 28
2.3.3 Especificaciones del código MCML.exe aplicado a la piel. 31
2.4 IMPLEMENTACIÓN DE ESTUDIOS ESPECTRALES CON MCML.exe 31
2.4.1 Desarrollo de los códigos MCMLinput y MCMLoutput en MATLAB®. 32

2.5 CONCLUSIONES 34
REFERENCIAS 35
Capítulo 3. Simulaciones Numéricas 39
3.1 EXPRESIONES ANALÍTICAS DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS. 40
3.1.1 La piel de adultos 40
Absorción 40
Esparcimiento.....42
3.1.2 La piel de neonatos 42
3.2 SIMULACIÓN DE SITUACIONES CLÍNICAS EN LAS ESPECIALIDADES DE DERMATOLOGÍA Y NEONATOLOGÍA. 43
3.2.1 Piel sana de adultos con diferente grado de pigmentación 44
Modelo óptico de dos capas.....44
3.2.2 Enfermedad inflamatoria.....47
3.2.3 Hiperbilirrubinemia neonatal 49
Modelo óptico de tres capas para la piel de neonatos.....50
Situaciones consideradas.....51
3.3 SIMULACIÓN DE UNA SITUACIÓN ASOCIADA A LA MEDICIÓN DE PARÁMETROS ÓPTICOS.....55
3.3.1 Reflexión difusa Rd(λ) para orientación natural e inversa de la piel 56
3.4 CONCLUSIONES 60
REFERENCIAS 62
Capítulo 4. Implementación de un Espectrómetro de Reflexión Difusa 65
4.1 INTRODUCCIÓN 66
4.2 ARREGLO EXPERIMENTAL PROPUESTO 67
4.2.1 Fuente de Iluminación 69
4.2.2 Sonda de Fibras Ópticas 70
4.2.3 Calibración Espectral, Resolución y Medición 71
Calibración espectral por longitudes de onda.....72
Visualización gráfica de la resolución del instrumento. 74
Espectro de reflexión difusa 77

4.3 PRUEBAS AL ESPECTRÓMETRO 77
4.3.1 Medición de una Fuente Halógena Filtrada 77
4.3.2 Medición de la piel de voluntarios sanos 78
4.4 CONCLUSIONES 80
REFERENCIAS 82
Capítulo 5. Estudios Experimentales 83
5.1 DESEMPEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO CM2S EN LA MEDICIÓN DE LA REFLEXIÓN DIFUSA ESPECTRAL DE LA PIEL HUMANA.....84
5.1.1 Introducción 84
5.1.2 Materiales y Métodos.....85
Mediciones de la reflectancia espectral 85
Muestras.....86
Voluntarios y pacientes 87
5.1.3 Resultados y discusiones 88
5.1.4 Conclusiones 90
5.2 EVALUACIÓN DEL ESPECTRÓMETRO COMERCIAL USB 4000 EN LA MEDICIÓN DEL ESPECTRO DE REFLEXIÓN DIFUSA EN HUMANOS.....91
5.2.1 Introducción 91
5.2.2 Materiales y Métodos.....91
Medición del espectro de reflexión difusa.....91
Voluntarios.....93
Análisis de las mediciones 93
5.2.3 Resultados y discusiones 94
5.3 CONCLUSIONES 99
REFERENCIAS 100
Capítulo 6. Conclusiones 101
6.1 CONCLUSIONES GENERALES 101
6.2 TRABAJO FUTURO 104

Apéndice **105**
A. Archivo típico generado con el código MCMLinput.m.....105
B. Coeficientes de extinción molar para la hemoglobina y la bilirrubina 107
C. Espectrómetro Implementado 109
C.1. Calibración espectral característica 109
C.2. Espectros de reflexión de voluntarios 111
D. Forma del permiso de participación 113
E. Publicaciones y participación en congresos 115
E.1. Lista de publicaciones 115
E.2. Lista de participación en congresos 116
Lista de Figuras **119**
Lista de Tablas **123**

Capítulo 1

Introducción

''Para que no se me olvide la letra, voy a anotarla en tu piel.
Sé que jamás perderé esa libreta.
Sé que la conservaré y que la consultaré''

Silvio Rodríguez

En este Capítulo se presenta una breve introducción a la temática que abordamos en esta tesis doctoral que abarca tanto una panorámica general de las técnicas experimentales como de los modelos matemáticos que son básicos para la simulación de la interacción de la luz con la piel. Además se plantean las motivaciones que dieron lugar a la realización de este trabajo y los objetivos trazados para su desarrollo y cumplimiento.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Técnicas experimentales

La piel, ese órgano peculiar y vital de nuestro cuerpo tanto por su estructura como por sus funciones, es el objeto de estudio de esta tesis doctoral. Si bien la piel ha sido fuente de inspiración de poetas, artistas y escritores desde los más remotos tiempos, también es uno de los primeros órganos a inspeccionar por médicos y especialistas con la finalidad de diagnosticar un número considerable de enfermedades que padece el hombre.

Es lógico suponer que el uso de la luz con fines diagnósticos y terapéuticos es tan antiguo como la propia civilización humana. La inspección visual de ciertos órganos constituye en sí un método práctico para valorar cualitativamente el estado de salud de un paciente y la piel ocupa un lugar privilegiado en este sentido por su fácil acceso visual y manual. Sin embargo, a veces la inspección visual puede no ser suficiente para el diagnóstico de determinada enfermedad o verse perturbada por determinados factores como son: el grado de pigmentación, la vascularidad y la edad, entre otros.

El uso de la lupa y posteriormente del microscopio (simple y compuesto), permitieron ampliar el grado de detalle en objetos diminutos. Fue el neerlandés Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) el primero en confirmar y desarrollar en 1668 el descubrimiento de la red de capilares del italiano Marcelo Malpighi, demostrando cómo circulaban los glóbulos rojos por los capilares de la oreja de un conejo y la membrana interdigital de la pata de una rana. En 1674 Leeuwenhoek realizó la primera descripción precisa de los glóbulos rojos. También se atribuyen a él las primeras descripciones de las bacterias y espermatozoides humanos en el año 1679 [1]. Otro gran investigador, que imprimió su originalidad al uso de la luz y los instrumentos ópticos en la investigación de los tejidos biológicos, fue el científico Robert Hook (considerado como el padre Inglés de la microscopía) quien en 1665 publicó el libro *Micrographía ,* relato de 50 observaciones microscópicas y telescópicas con detallados dibujos. Este libro contiene por primera vez la palabra *célula* para identificar estructuras microscópicas durante la observación de una laminilla de corcho [2]. La actividad científica de Leeuwenhoek y Hook, marcó el nacimiento de la microscopia óptica como herramienta poderosa para el monitoreo de las células y los tejidos con una aplicación directa para el diagnóstico y tratamiento de disímiles enfermedades.

El posterior desarrollo de la humanidad y con ella de ramas específicas del conocimiento, como la óptica y la electrónica, han posibilitado el

advenimiento de la instrumentación y las técnicas necesarias para realizar estudios cuantitativos de la piel cada vez más precisos y menos invasivos. Se destacan, por ejemplo, el uso de la microscopía confocal y la tomografía óptica coherente (OCT) que permiten alcanzar resoluciones del orden de pocas micras en la creación de una imagen óptica de los tejidos biológicos. La ventaja principal de la OCT respecto a la microscopia óptica tradicional es que puede proporcionar la imagen en tiempo real de una sección transversal de los tejidos superficiales de forma no invasiva [3, 4] evitándose la escisión de tejido y el procedimiento de su preparación.

Otra técnica ampliamente utilizada es la espectroscopía de reflexión difusa, que se aplica a la investigación cuantitativa de la piel humana. Un ejemplo de esto es el monitoreo *in-vivo* y no invasivo de los principales pigmentos de la piel, tales como: melanina (epidermis), hemoglobina y bilirrubina (dermis), etc. En un trabajo de revisión publicado en el año 1981 Anderson et al [5] refieren el trabajo de Hasselbach como uno de los pioneros en el estudio espectroscópico de la transmisión de la luz ultravioleta a través de la piel humana y comentan además varios trabajos, de la década de los 50 del siglo pasado, que abordan el estudio de la reflectancia espectral de la piel humana en la zona visible e infrarroja cercana del espectro electromagnético. En las décadas del 80 y 90 pasado, se diseñaron y usaron las técnicas espectrales cuantitativas para el monitoreo *in-vivo* y el diagnóstico de ciertas enfermedades cutáneas y sistémicas. Específicamente se distingue el uso combinado de la espectroscopía de reflexión y de fluorescencia [6] aplicadas al análisis de cambios morfológicos y alteraciones funcionales de la piel, mejoramiento de la exactitud del diagnóstico y terapias de la piel mediante el análisis y control de sus parámetros ópticos, evaluación de los índices de eritema y pigmentación, determinación de la oxigenación de la hemoglobina, etc.

En la actualidad se cuenta con técnicas espectroscópicas modernas bien consolidadas que se aplican al estudio *in-vivo* de los elementos integrantes de la piel. Ejemplos de ello son:

1. La creación de una libreta de laboratorio electrónico [7] que apoya a la espectrometría de reflexión aplicada a la medicina legal,
2. La determinación del nivel de bilirrubina transcutánea en neonatos, mediante la aplicación de principios básicos del transporte de radiación óptica combinados con la medición del espectro de reflexión difusa mediante un arreglo espectrofotométrico integrado (SpectRx BiliCheck) [8], o de otras variantes que miden la reflexión difusa de la piel en determinadas bandas espectrales (Minolta AirShields JM102) [9].

1.1.2 Modelos matemáticos

Diferentes modelos matemáticos han sido empleados para describir la interacción de la radiación óptica con los tejidos biológicos. Especialmente cuando la densidad de partículas esparcidoras es “alta”, como ocurre para la mayoría de los tejidos biológicos y particularmente para la piel, los fenómenos de esparcimiento múltiple se convierten en predominantes y en este caso los modelos matemáticos comúnmente aplicados se clasifican en dos teorías: La Teoría Analítica y La Teoría del Transporte Radiativo (TTR) [10].

La Teoría Analítica es rigurosa desde el punto de vista matemático porque se pueden incluir en principio todos los efectos de la interacción de la luz con el tejido: esparcimiento múltiple, difracción, interferencia, etc [10]. Las ecuaciones de partida en esta teoría son las ecuaciones de Maxwell para el campo electromagnético en la materia y las magnitudes estadísticas como la varianza y funciones de correlación son las incógnitas.

En la Teoría del Transporte Radiativo la ecuación básica es la conocida ecuación de la transferencia radiativa o ecuación del transporte, la cual

resulta ser una ecuación íntegro-diferencial. La magnitud incógnita en esta ecuación es la intensidad específica o radiancia, apareciendo como parámetros de la ecuación, los coeficientes de esparcimiento y absorción, y el factor de anisotropía del medio. Este último está incluido en la llamada función de fase o función de esparcimiento que se verá con más detalle en el Capítulo 2 de esta tesis.

La solución de la ecuación de transporte se puede abordar utilizando varios métodos. Por el carácter básico y de amplio uso en la descripción de la propagación de la luz en los tejidos, describimos a continuación solo tres de ellos: la aproximación de la difusión, la teoría de Kubelka-Munk, y el método de Monte Carlo.

La aproximación de la difusión [11] permite resolver la ecuación de transporte de forma analítica luego de asumir que se cumplen un conjunto de condiciones que se resumen a continuación:

- La intensidad total se divide en dos partes: la intensidad reducida incidente y la intensidad difusa, siendo la segunda creada dentro del medio debido al esparcimiento.
- La intensidad difusa encuentra muchos centros de esparcimiento y es esparcida “casi uniformemente” en todas las direcciones, pero con una magnitud ligeramente mayor en la dirección del flujo directo.
- La función de esparcimiento es función sólo del ángulo entre la dirección de incidencia y la dirección de esparcimiento del fotón (válido para partículas esféricas).
- Cálculo del factor de anisotropía mediante la función de Henyey-Greenstein (válido para partículas con dimensiones mucho menores que la longitud de onda).
- Condición de frontera aproximada: el flujo difuso total hacia el interior del medio es nulo.

La aproximación de la difusión combina el coeficiente de esparcimiento y el factor de anisotropía en otro parámetro denominado coeficiente de

esparcimiento reducido. Esta aproximación es aplicable cuando los eventos de esparcimiento son mucho más probables que los de absorción. Para un medio semi-infinito e isotrópico se puede aplicar el método de dipolo propuesto por Farrel et al [12] que permite obtener una expresión analítica para la reflexión difusa a una distancia conocida del punto de entrada del haz luminoso puntual incidente.

La aproximación de la difusión falla cuando se analiza la distribución de la luz en zonas próximas a la fuente luminosa o cuando el medio tiene un esparcimiento dirigido en la dirección y sentido de la radiación que se propaga.

La teoría de Kubelka-Munk fue originalmente plasmada en un artículo enfocado al estudio teórico del cambio del color de un substrato al que se aplicaba una película protectora de absorción, esparcimiento y espesor conocido [13], y constituye desde el punto de vista teórico, un modelo simplificado de transferencia radiativa (modelo de 2-flujos) que conduce a una expresión analítica para la reflexión difusa en función de los parámetros ópticos y el espesor de la capa de pintura. Esta teoría ha sido aplicada con éxito al estudio de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos [5], aunque otros autores la utilizan como “primera aproximación” a este problema [14]. El modelo de 2-flujos puede derivarse de manera formal a partir de la ecuación de transferencia radiativa [15] haciendo consideraciones relativamente sencillas.

El método de Monte Carlo permite resolver de forma exacta la ecuación de transferencia radiativa [16]. En esencia este método consiste en simular con ayuda de la computadora las trayectorias de los fotones durante su interacción con los centros de absorción y esparcimiento del tejido. La simulación está basada en el uso de caminos aleatorios para dichas trayectorias y el correspondiente registro, en cada punto del tejido, de la ocurrencia de los eventos de absorción y escape de los fotones. Los caminos aleatorios son generados a través del muestreo aleatorio de las variables de

propagación (longitud de trayectoria libre media, ángulo de esparcimiento y ángulo acimutal) mediante el uso de distribuciones de probabilidad bien establecidas. La repetición de este proceso para un número grande de fotones garantiza la convergencia a una solución real de la distribución de la luz dentro y fuera del tejido. Esto último impone un compromiso entre la exactitud de la simulación y el tiempo de cómputo. La solución hallada aplicando este método es una solución exacta, pero no analítica y tiene que encontrarse tantas veces como se varíe cualquiera de los parámetros (ópticos y geométricos) de entrada al código de simulación. Una ventaja notable del método es que puede aplicarse sin restricciones relativas a las propiedades ópticas del tejido o a la distancia entre el punto de incidencia de fuente luminosa en el tejido y el punto de detección.

El método de Monte Carlo es mundialmente utilizado en la actualidad por muchos grupos de investigación dedicados a la temática que se aborda en esta tesis. Se destaca el uso del código de computadora de dominio público denominado MCML, un código desarrollado por Wang y Jacques [17] para obtener la distribución estacionaria de la luz en los tejidos estratificados. Una tendencia muy practicada es la de adaptar este código a la solución del problema concreto que investiga cada grupo, generándose así versiones del mismo. Otros grupos sin embargo, prefieren desarrollar sus propios códigos Monte Carlo, para atacar el problema concreto que están estudiando. Por ejemplo, Krishnaswamy [18] ha desarrollado el llamado código *BioSpec*, definido como un modelo espectral basado en consideraciones biofísicas que permite estudiar la interacción de la luz con la piel y que emplea técnicas estándares de simulación del método de Monte Carlo. Este modelo considera la piel formada por cinco capas: el estrato córneo, la epidermis, la dermis papilar, la dermis reticular y la hipodermis. El tejido subcutáneo o hipodermis es considerado como un tejido altamente reflector. Además el modelo toma en consideración tres componentes principales de la distribución de la luz: la reflectancia superficial, la reflectancia subsuperficial y la transmitancia. La

aplicación del modelo está relacionada con la predicción de imágenes sintetizadas de diferentes tonos de la piel y en la simulación espectral de situaciones médicas. Otros investigadores también han simulado el espectro de reflexión difusa de la piel humana [19, 20, 21] mediante códigos Monte Carlo que, hasta donde conocemos, no han sido liberados al uso público.

Considero que en este momento es oportuno comentar que muchos de los modelos matemáticos explicados anteriormente tienen su origen en la solución a problemas de transferencia radiativa de la atmósfera de los planetas y de atmósferas interestelares, que han sido planteados y resueltos por investigadores del campo de la óptica atmosférica, destacándose entre ellos Chandrasekhar [22]. Por ejemplo, concerniente a la teoría de la difusión, en un trabajo del año 1954 Fritz [23] ya emplea el término “energía difusa” para referirse a una parte de la luz solar esparcida por nubes de gotas grandes. Este autor aplica, una vez generada la llamada energía difusa, la “bien conocida” ecuación de la difusión para describir la distribución espacial de la energía en la nube. Otro ejemplo son los actuales códigos Monte Carlo, que si bien se aplicaron por primera vez a los tejidos biológicos en el año 1983 por Adam y Wilson [24], tienen por antecedentes trabajos como los de Danielson y Moore [25] en los que se incluye ya la función de Henyey-Greenstein para simular numéricamente el ángulo de esparcimiento de los fotones en las nubes, además de introducir conceptos estándares del método de Monte Carlo originalmente planteados por Metrópolis [26] relacionados con el proyecto Manhattan.

1.2 MOTIVACIÓN

Dos razones principales nos han motivado a la realización de esta tesis de doctorado. En primer lugar se encuentra la continuación de los trabajos de investigación realizados con muestras *ex-vivo* de tejido humano en colaboración con especialistas del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) en Cuba [27, 28] y en segundo lugar, la posibilidad de iniciar estudios de investigación en pacientes del Hospital Universitario de Puebla (HUP) bajo un proyecto de colaboración conjunta firmado entre el INAOE y este hospital.

Los trabajos de investigación en Cuba tenían un carácter puramente experimental y estuvieron dirigidos tanto al estudio de la profundidad de penetración óptica de la luz en los tejidos como a la investigación de la discriminación del tejido sano y neoplásico mediante la medición de la intensidad de su auto-fluorescencia. Estas mediciones se realizaban en una banda espectral estrecha o a longitudes de ondas específicas.

En esta tesis hemos ampliado el campo de investigación anterior al incorporar la técnica de espectroscopía de reflexión y el uso de instrumentación comercial que abarca todo el rango espectral visible y parte del infrarrojo cercano. También hemos añadido el empleo de métodos teóricos para la simulación numérica de la interacción luz–piel, lo cual nos brinda la posibilidad de pronosticar las características del espectro de reflexión difusa medido experimentalmente para determinadas situaciones clínicas. Por otra parte hemos contemplado además, la implementación y evaluación de un espectrofotómetro de reflexión difusa de un costo relativamente bajo en comparación con los que se ofertan en el mercado internacional y que resultan de precios prohibitivos para las posibilidades económicas con que se cuenta en Cuba.

Los estudios de investigación en pacientes del Hospital Universitario de Puebla bajo el proyecto de colaboración conjunta mencionado están dirigidos a dos especialidades médicas: oncología (tumores periféricos o cáncer de piel) y neonatología (hiperbilirrubinemia neonatal).

Los trabajos de investigación-desarrollo en el estudio de la hiperbilirrubinemia neonatal por métodos ópticos, se han centrado principalmente en la simulación numérica del espectro de reflexión difusa por el método de Monte Carlo. Por otra parte, como una primera etapa a los trabajos de investigación en la detección y caracterización del cáncer de piel mediante espectroscopía de reflexión difusa, hemos llevado a cabo un estudio preliminar en el INAOE con personal voluntario sano. Este estudio preliminar tiene por objetivo evaluar los parámetros de adquisición del espectrómetro, las variables de mayor influencia durante la medición y la elaboración de programas de análisis de la información contenida en los espectros de reflexión medidos. Los primeros resultados de este estudio constituyen un importante paso para el inicio de estudios de investigación en el Hospital Universitario de Puebla los cuales quedan fuera del alcance de esta tesis, aunque el protocolo de colaboración conjunta INAOE-HUP fue abordado durante el desarrollo de la misma.

1.3 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis es realizar un estudio teórico y experimental de la propagación de la luz en la piel humana que nos proporcione una mejor comprensión del espectro de reflexión difusa de la piel y su dependencia con los parámetros biológicos de interés con vista a aplicaciones de diagnóstico médico. Los objetivos específicos de la tesis son:

- Revisar los parámetros ópticos y biológicos de la piel humana de adultos y neonatos.

- Implementar la herramienta computacional necesaria para facilitar el estudio espectral de la reflexión difusa de la piel cuando se varían los parámetros biológicos de sus capas.
- Construir un modelo óptico de la piel que explique las características del espectro de reflexión difusa en el caso de estados de hiperbilirrubinemia neonatal, examinando principalmente el efecto de la influencia del grado de pigmentación y la fracción volumétrica de sangre sobre el espectro de reflexión.
- Implementar y caracterizar un espectrómetro de relativamente bajo costo para medir el espectro de reflexión difusa de la piel humana.
- Evaluar la factibilidad de empleo del espectrómetro comercial CM2S para realizar mediciones del espectro de reflexión difusa en pacientes con lesiones de la piel y en voluntarios sanos.
- Realizar un estudio exploratorio con el espectrómetro comercial de fibra óptica USB4000 evaluando tanto su desempeño en la medición del espectro de reflexión difusa de la piel humana en diferentes sitios corporales como la influencia del grado de pigmentación en el espectro medido. Además se evalúan los parámetros de adquisición típicos del espectrómetro para esta aplicación.

1.4 CONCLUSIONES

La óptica médica es un campo de investigación-desarrollo relativamente joven y de una actividad en la investigación creciente. Se destaca el uso de diferentes técnicas ópticas como herramientas en este campo. Entre ellas hemos seleccionado la espectroscopía de reflexión difusa para realizar un estudio tanto teórico como experimental de la piel humana. Dada la naturaleza estratificada y compleja de este órgano hemos decidido utilizar el método de Monte Carlo para realizar los estudios teóricos del espectro de reflexión difusa de la piel para determinadas situaciones clínicas.

Específicamente empleamos el código Monte Carlo MCML, escrito en lenguaje ANSI standard C [17] en combinación con dos programas de MATLAB® desarrollados en esta tesis para facilitar la simulación numérica de la reflexión difusa, en la zona visible del espectro electromagnético.

REFERENCIAS

[1] Leeuwenhoek http://es.wikipedia.org/wiki/Anton_van_Leeuwenhoek. Accesado 25 de noviembre de 2005.

[2] Robert Hook http://es.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke Accesado 25 de noviembre de 2005.

[3] J.M. Schmitt. "Optical Coherent Tomography (OCT): A Review." IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics Vol.5, No. 4, 1205-1215. (1999).

[4] C. Salvini. "Application of Optical Coherent Tomography in Non-invasive Characterization of Skin Vascular Lesions." Skin Research and Technology The Authors Journal Compilation (2007), recibido via correo electrónico.

[5] R.R. Anderson et al. "The Optics of Human Skin." The Journal of Investigative Dermatology Vol.77,No. 1, 13-19 (1981).

[6] V.V. Tuchin, "Chapter 13 Reflectance and Fluorescence Spectroscopy of Human Skin *In Vivo*." En Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Parte III. Una publicación de SPIE, Bellingham, Washing USA (2002). Editor Valery V Tuchin. pp. 727.

[7] http://arxiv.org/PS_cache/cs/pdf/0612/0612123v1.pdf L. Belenkaia. "Electronic laboratory Note Book Assisting Reflectance Spectrometry in Legal Medicine." Accesado 22 de diciembre de 2006.

[8] S.L. Jacques et al. "Developing an optical fiber reflectance spectrometer to monitor bilirubinemia in neonates". En Laser Tissue Interaction-1996, editado por S.L. Jacques, SPIE proceeding Vol.2975, San José, CA, 1997, pp. 115-124.

[9] M.J. Maisels et al. "Evaluation of a New Transcutaneous Bilirubinometer." Pediatrics Vol.113, No 6, 13-19 (2004).

[10] A. Ishimaru, "Chapter 7 Transport Theory of Wave Propagation in Random Particles" En Wave Propagation and Scattering in Random Media. Parte II The IEEE/OUP Series on Electromagnetic Wave Theory.

Reimpresión por Academic Press y Oxford University 1997. Editor Donald G.Dudley. pp. 147.
[11] A. Ishimaru, “Chapter 9 Diffusion Approximation” En Wave Propagation and Scattering in Random Media. Parte II The IEEE/OUP Series on Electromagnetic Wave Theory. Reimpresión por Academic Press y Oxford University 1997. Editor Donald G.Dudley. pp. 175.
[12] T.J. Farrell et al. “A Diffusion Theory Model of Spatially Resolved, Steady State Diffuse Reflectance for Non Invasive Determination of Tissue Optical Properties in vivo.” Medical Physics Vol.19, No. 4, 879-888 (1992).
[13] P. Kubelka y F. Munk. “An Article on Paint of Layers.” Traducción al ingles del artículo original de Kubelka y Munk por un autor desconocido.
[14] A. Roggan et al. “Measurements of Optical Tissue Properties Using Integrating Sphere Technique”. En Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring, editor general R.F. Potter., SPIE proceeding Vol.IS11, Bellingham , Washington USA, 1993, pp. 149-165.
[15] A. Ishimaru, “Chapter 9 Diffusion Approximation” En Wave Propagation and Scattering in Random Media. Parte II The IEEE/OUP Series on Electromagnetic Wave Theory. Reimpresión por Academic Press y Oxford University 1997. Editor Donald G.Dudley. pp. 175-180.
[16] S.A. Prahl, “Light Transport in Tissue”. Tesis doctoral, Diciembre 1988
[17] L.Wang et al. “MCML-Monte Carlo Modeling of Light Transport in Multi-layered Tissues.” Computers Methods and Programs in Biomedicine Vol.47, 131-146 (1995).
[18] A. Krishnaswamy “BioSpec: A Biophysically-Based Spectral Model of Light Interaction with Human Skin”. Tesis doctoral, 2005.
[19] N. Tsumura. “Mapping Pigmentation in Human Skin by Multi-visible-Spectral Imaging by Inverse Optical Scattering Technique”. En The Eight Color Imaging Conference: Color Science and Engineering Systems, Technologies, Applications 2000.

[20] M. Kobayashi “Analysis of Nonlinear Relation for Skin Hemoglobin Imaging.” Optics Express Vol.9, 802-812 (2001).

[21] I.V. Meglinski y S.J. Matcher. “Computer Simulation of the Skin Reflectance Spectra.” Computers Methods and Programs in Biomedicine Vol.70, 179-186 (2003).

[22] S. Chandrasekhar, “Radiative Transfer”, publicado por Dover Publications, Inc, New York.1960, pp. 1-393.

[23] S. Fritz “Scattering of Solar Energy by Clouds of “Large Drops”.” Journal of Meteorology Vol.11, 291-300 (1954).

[24] B.C, Wilson y G. Adam. “A Monte Carlo Model for the Absorption and Flux distributions of Light in Tissues.” Medical Physics. Vol.10, No 6, 824-830 (1983).

[25] R.E. Danielson y D.R Moore “The Transfer of Visible Radiation Through Clouds.” Journal of the Atmospheric Science. Vol.10, No 6, 1078-1087 (1969).

[26] N. Metropolis “The Beginning of the Monte Carlo Method.” Los Alamos Science. Edición especial, 125-130 (1987).

[27] J.A. Delgado et al. “Ex vivo Autofluorescence Measurements of Human Tissues.” En Seventh Mexican Symposium on Medical Physics -2003, editado por N. Bruce et al., AIP proceeding Vol.682, Melville, New York, 2003.

[28] J.A. Delgado et al. “Safety of Ultraviolet Radiation for Autofluorescence Diagnosis of Skin Cancer.” Revista Mexicana de Física E, Vol.52, No 1. 78-83 (2006).

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

''The light scattered from the molecules would suffice to give us a blue sky, not so very greatly darker than that actually enjoyed''

Lord Rayleigh

En este Capítulo se consideran los fundamentos teóricos de la interacción de la radiación óptica con la piel humana. Inicialmente se abordan las características ópticas generales de los medios biológicos y se particulariza al caso de la piel, revisando su anatomía y los principales componentes de importancia óptica haciendo énfasis en su estructura intrínsecamente estratificada. Posteriormente hacemos alusión a la Teoría del Transporte Radiativo como el marco que usaremos para explicar la distribución de la luz en la piel y presentamos además el método de Monte Carlo como una solución numérica exacta de la ecuación de transferencia radiativa. Además se describe brevemente un paquete de software de dominio público denominado MCML.exe que será utilizado para las simulaciones numéricas en el Capítulo 3 de esta tesis. Presentamos y describimos dos códigos en MATLAB® con el propósito de implementar el estudio espectral de las magnitudes físicas de salida que proporciona el programa ejecutable MCML.exe.

2.1 MEDIOS BIOLÓGICOS

Generalmente todos los medios biológicos contienen agua en proporciones relativamente altas. En nuestro cuerpo el agua aparece en proporciones abundantes; en el feto representa el 90% de su peso, en el recién nacido un 80% y en el hombre adulto un 65% de su peso corporal [1]. En los principales tejidos (tejido epitelial, conectivo, muscular, nervioso, vascular y linfático [2]) el contenido de agua varía considerablemente. Por ejemplo ocupa un 80% de la sangre, un 70% del músculo y un 15% del tejido adiposo. A nivel microscópico se considera que el agua está distribuida en dos compartimentos: el agua intracelular con un 40%, y la extracelular con un 20% [1].

De esta forma vemos que las propiedades ópticas de los tejidos en principio, quedan definidas en gran medida por las propiedades ópticas del agua. Estas propiedades son dependientes de la longitud de onda de la radiación electromagnética que interactúa con ella. Por ejemplo en la zona de 400-700 nm, que es el intervalo espectral donde se realizan todas las simulaciones numéricas presentadas en esta tesis, la influencia del agua sobre el coeficiente de absorción del tejido es mínima, ya que éste resulta ser inferior a 0.01 cm^{-1} [3].

Por otra parte los tejidos biológicos se caracterizan generalmente por un alto grado de inhomogeneidad que tiene su origen en la inhomogeneidad intrínseca de la célula que contiene orgánulos de diferentes tamaños y composición, con índices de refracción diferentes al de materia básica (matriz homogénea en la cual las fibras y células del tejido conectivo u otras partículas están embebidas) [4]. Esta inhomogeneidad conjuntamente con las dimensiones de los orgánulos y la estructura de la célula, definen en gran medida el proceso de esparcimiento de la luz por los tejidos.

2.1.1 Esparcimiento

La propagación de la radiación óptica en los medios biológicos generalmente está dominada por el proceso de esparcimiento debido a las inhomogeneidades de la estructura celular, la cual repercute en la existencia de cambios apreciables del índice de refracción entre sus diferentes partes: núcleo, citoplasma, orgánulos, membrana celular, etc. Además influye notablemente el que las dimensiones de las células y sus partes puedan ser comparables o no con el tamaño de la longitud de onda de la radiación que se propaga. El tipo de esparcimiento, que ocurre en el tejido, se puede poner en correspondencia con las dimensiones características de los elementos esparcidores que lo componen según un criterio de jerarquía estructural [5] que ejemplificamos en la Tabla 2.1

TABLA 2.1 Ejemplos de aplicación de criterio de jerarquía que relaciona las dimensiones del elemento esparcidor con el tipo de esparcimiento que se manifiesta.

Elemento esparcidor	Dimensiones típicas l_t (μm)	Tipo de esparcimiento
Células	$l_t \geq 10$	Mie
Eritrocitos	7 x 2	Mie
Núcleo y mitocondria	$1 \leq l_t \leq 10$	Mie
Lisosomas y vesículas	$0.1 \leq l_t \leq 1$	Rayleigh
Melanosomas	0.1 m x 0.7 nm	Rayleigh
Fibras de colágeno Estructura pequeña	$0.01 \leq l_t \leq 0.1$	Rayleigh
Membrana celular	$l_t \leq 0,01$	Rayleigh

Por ejemplo: los eritrocitos, que son las células rojas de la sangre, tienen forma de discos cóncavos de 7 μm de diámetro y 2 μm de espesor en la parte más gruesa del disco [6] por lo que el tipo de esparcimiento presente

es de Mie y queda explicado usando la conocida teoría de Mie. Otro ejemplo son las fibras de colágeno que presentan simultáneamente esparcimiento de Mie y de Rayleigh. A partir de estudios histológicos de las fibras de colágeno en nueve muestras *post mortem* de piel de recién nacidos se encontró una estructura cilíndrica alargada para estas fibras con un diámetro de 2.8±0.8 μm y de estructuras más pequeñas de aproximadamente 70 nm observadas al microscopio electrónico [7].

El coeficiente de esparcimiento, $\mu_s(\lambda)$ [cm^{-1}], se define como el coeficiente de atenuación de un haz colimado de intensidad $I_o(\lambda)$ que incide sobre una muestra no absorbente M de espesor l. Si por $I(\lambda)$ denotamos la intensidad no esparcida transmitida a través de la muestra entonces $\mu_s(\lambda)$, $I_o(\lambda)$ e $I(\lambda)$ se relacionan por:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) * e^{-\mu_s(\lambda)l} \qquad (1)$$

La teoría del esparcimiento incluye el término función de fase o función de esparcimiento [8] que denotamos por el símbolo $p(\mathbf{s},\mathbf{s'})$. Esta función representa la función de densidad de probabilidad del esparcimiento de un fotón que viajando en la dirección ***s*** es esparcido a la dirección ***s'***. Para medios donde el esparcimiento es simétrico respecto a la dirección de la onda incidente, la función esparcimiento depende solamente del ángulo θ entre las direcciones ***s*** y ***s'***, es decir:

$$p(\mathbf{s},\mathbf{s'}) = p(\theta) \qquad (2)$$

Además siempre se le exige a esta función que cumpla con la condición de normalización:

$$\int p(\mathbf{s},\mathbf{s'})d\omega = \int p(\theta)2\pi sen(\theta)d\theta = 1 \qquad (3)$$

La función de esparcimiento que generalmente se ha aplicado para describir la distribución de la luz en los tejidos biológicos ha sido la función de fase de Henyey y Greenstein [9, 10] propuesta en el año 1941 para explicar el esparcimiento de la luz de las estrellas por la materia interestelar:

$$p(\cos\theta) = (1-g^2)/4\pi(1+g^2-2g\cos\theta)^{3/2} \quad (4)$$

donde g es el factor de anisotropía del medio. Si el esparcimiento es isotrópico g = 0 y para esparcimiento dirigido hacia delante g = 1. El factor de anisotropía se calcula a partir de la función de fase como el valor promedio de $\cos\theta$:

$$g = \overline{\cos\theta} = \int \cos\theta\, p(\theta) 2\pi sen(\theta) d\theta \quad (5)$$

El factor de anisotropía también se utiliza para definir el coeficiente de esparcimiento reducido μ'_s (λ) [cm^{-1}] que representa el coeficiente de esparcimiento isotrópico equivalente y se calcula como:

$$\mu'_s = (1-g)\mu_s \quad (6)$$

El estudio detallado del esparcimiento simple por partículas independientes (partículas bien separadas e independientes de modo que se puede estudiar el esparcimiento de una partícula sin referencia a las otras) aparece desarrollado por van de Hulst [11], mientras que en el esparcimiento múltiple (medios difusos) se discute ampliamente por Chandrasekhar [8] y más recientemente por Bohren y Huffman [12]. Ambos tipos de esparcimiento aparecen desarrollados por A. Ishimaru [6] y aplicados a esparcidores en la atmósfera, el océano y los materiales biológicos.

2.1.2 Absorción

La absorción es un proceso que incluye la extracción de energía de un haz de radiación óptica por parte de la materia a través de la cual éste pasa. Desde el punto de vista cuántico el haz es considerado como un conjunto de fotones que portan una cantidad de energía $h\nu$. Este enfoque cuántico involucra conceptos como: nivel energético, transición cuántica entre niveles, etc. Los centros de absorción son los átomos y moléculas que componen el medio. El coeficiente de absorción está relacionado con los estados

energéticos del sistema, mientras que el coeficiente de esparcimiento lo está con la polarizabilidad del mismo. En general podemos distinguir tres tipos de procesos de absorción: electrónico, vibracional, y rotacional.

Un ejemplo de moléculas biológicas que absorben mediante un proceso electrónico son las moléculas de melanina y de bilirrubina.

La molécula de agua absorbe fundamentalmente mediante un proceso de transición vibracional conteniendo varias bandas de absorción en la zona infrarroja del espectro [3].

El proceso de absorción se puede caracterizar utilizando el concepto de sección transversal de absorción, $\sigma_a(\lambda)$ [cm^2], definido como el cociente de la potencia absorbida por la partícula P_{abs} [W] a la irradiancia incidente I_o [W/cm^2] sobre la misma:

$$\sigma_a(\lambda) = P_{abs} / I_0 \tag{7}$$

Suponiendo ahora que tenemos un medio con partículas absorbentes idénticas distribuidas de manera uniforme, siendo ρ [$1/cm^3$] el número de partículas por unidad de volumen, entonces el coeficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$ [cm^{-1}], queda definido en términos de $\sigma_a(\lambda)$ y ρ como:

$$\mu_a = \rho\sigma_a \tag{8}$$

En un medio, como el descrito anteriormente, la irradiancia I se atenúa por efecto de absorción en una cantidad dI al atravesar un espesor dx. Las cantidades involucradas permiten definir alternativamente el coeficiente de absorción por la siguiente expresión:

$$dI = -\mu_a I dx \tag{9}$$

que integrada para un espesor l de la muestra conduce a la conocida ley de Lambert-Beer:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) * e^{-\mu_a(\lambda) l} \tag{10}$$

o equivalentemente utilizando el coeficiente de extinción molar $\varepsilon_a(\lambda)$ de la sustancia absorbente:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) * 10^{-\varepsilon_a(\lambda)Cl} \quad (11)$$

En general los procesos de esparcimiento y absorción están presentes en la interacción de la radiación óptica con los tejidos biológicos y por lo tanto se utiliza el término extinción del haz que incide sobre tal medio, para referirnos a un proceso que unifica a los dos anteriores y que se expresa matemáticamente como:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) * e^{-[\mu_s(\lambda)+\mu_a(\lambda)]l} \quad (12)$$

se define entonces el coeficiente de extinción total $\mu_t(\lambda)$ como:

$$\mu_t(\lambda) = \mu_s(\lambda) + \mu_a(\lambda) \quad (13)$$

Las definiciones de los parámetros ópticos (coeficiente de absorción, coeficiente de esparcimiento, y factor de anisotropía) que se han definido y relacionado mediante las expresiones de este epígrafe, serán utilizadas en el Capítulo 3 de la tesis, aplicadas a la piel humana y con expresiones analíticas concretas.

2.2 ANATOMIA DE LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con una superficie entre 2-3 m^2. Tiene una estructura relativamente compleja que le permite realizar múltiples funciones. La arquitectura de la piel es estratificada y se distinguen tres capas principales, desde la superficie a la profundidad: la epidermis, que es la más superficial; la dermis, que es una capa intermedia y la hipodermis, que es la más profunda. Cada capa contiene diferentes tipos de células que juegan una función diferente. Para este epígrafe utilizamos como bibliografía básicamente las referencias [13] y [14] correspondientes a A.A. Cordero y B. Ackerman, respectivamente.

2.2.1 Epidermis

De acuerdo con A.A. Cordero, la epidermis presenta una estructura estratificada y no vascularizada, que está constantemente en renovación. De la superficie a la profundidad encontramos las siguientes capas de la epidermis: córnea, granulosa, espinosa y basal.

La capa córnea está formada por los corneocitos que son células grandes muy aplanadas y sin núcleo, sin orgánulos citoplasmáticos y muertas. Estas células están íntimamente unidas entre sí formando capas apiladas.

Por debajo de la capa córnea se encuentra la capa granulosa que está formada por células granulares vivas y menos aplanadas que los corneocitos. El citoplasma de éstas células contiene un orgánulo denominado queratinosoma que se adhieren a la membrana celular y vierten su contenido al espacio intercorneocitario de la capa córnea.

La capa espinosa está formada por células con forma de poliedros que están unidas entre sí por puentes celulares que confieren a su superficie un aspecto espinoso. En estos puentes juegan un papel principal los desmosomas. La separación entre éstas células es bastante, constante de aproximadamente 20 nm. El espacio intercelular está constituido por glucoproteínas y lipoproteínas que tienen una consistencia de gel permitiendo la cohesión celular.

La capa basal o germinativa está constituida por una sola fila de células cilíndricas que asientan sobre la membrana basal o unión dermo-epidérmica. En la capa basal coexisten cuatro tipos de células: el queratinocito (90%), el melanocito (5%), la célula de Langerhans (3-5%) y la célula de Merkel (<0.1%).

El melanocito tiene por función fabricar un pigmento de color castaño negro: la melanina, que tiene acción fotoprotectora de los efectos dañinos del sol, al dispersar y absorber los rayos solares que inciden en la piel. La melanina se almacena en un orgánulo citoplasmático oval con estructura filamentosa

denominado melanosoma (100 nm x 0.7 nm). Las variaciones de la pigmentación, incluidas las raciales, se deben a diferencias en la actividad del melanocito, condicionadas por factores genéticos y no por el número de melanocitos. El número de melanocitos de un negro africano y de un blanco escandinavo es el mismo, pero sus melanosomas son dos veces más grandes y aparecen en un número mayor o equivalentemente, en una fracción volumétrica mayor.

Es importante recalcar que la unión epidermis-dermis presenta una estructura ondulada, donde las proyecciones dérmicas (papilas) penetran profundamente en las depresiones de la epidermis. Para los modelos ópticos que trataremos se desprecia dicha estructura y se considera la unión dermo-epidérmica como perfectamente plana.

2.2.2 Dermis

La dermis es una capa altamente vascularizada y nutre a la epidermis. Su espesor es variable de 1-4 mm según las regiones corporales. No tiene estructura de capas de células superpuestas, como en la epidermis, sino de un complicado sistema de fibras entrelazadas embebidas de una sustancia denominada "sustancia fundamental amorfa". Esta sustancia está constituida de un material (agua, electrolitos, proteínas plasmáticas, y muco polisacáridos) que llena los espacios entre las fibras y células de la dermis.

Las células que forman principalmente la dermis se denominan fibroblastos, constituyendo dos tipos de fibras: colágenas y elásticas.

Las fibras elásticas son de 1-3 μm de diámetro, son muy ramificadas, entrelazadas y onduladas.

En la dermis se encuentran también los anexos cutáneos, que son de dos tipos: córneos (pelos y uñas) y glandulares (glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas).

Los vasos sanguíneos también se encuentran en la dermis. La irrigación sanguínea está formada por dos plexos venosos paralelos entre sí: el plexo vascular profundo y el superficial, que están intercomunicados por ramas verticales. El 10% del total de la sangre circula por los vasos de la piel. El sistema de vasos descritos juega un papel primordial en la regulación de la temperatura mediante su dilatación y contracción.

2.2.3 Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo como también se le conoce, es un tejido conjuntivo laxo constituido por grandes lóbulos de tejido graso, limitados por tabiques de fibras colágenas delgadas y escasas fibras elásticas. El adipocito o célula grasa, es el elemento básico de esta capa, siendo una línea especial de células conectivas. Las células grasas están organizadas en lobulillos de aproximadamente 1 cm de diámetro separados por tabiques de tejido conectivo, en su mayoría verticales. Los microlóbulos, que son subdivisiones de los lobulillos, a su vez están rodeados por tabiques más finos de fibras colágenas.

Un aspecto muy importante de la piel humana es la marcada diferenciación regional que presenta tanto a nivel microscópico como macroscópico. Dichas variaciones se correlacionan con la multifuncionalidad de ésta, según refiere B. Ackerman [14]. Por ejemplo: la piel de la palma de la mano y de la planta de los pies histológicamente está tipificada por una capa granular y cornificada gruesa, numerosas terminaciones nerviosas y ausencia de unidades foliculares y sebáceas; la piel de la espalda, con una dermis gruesa, está compuesta principalmente de mazos amplios de colágeno ordenados ortogonalmente, mientras que la piel de los párpados tiene una dermis fina que le permite acomodarse a los rápidos movimientos de parpadeo necesarios para proteger los ojos.

2.3 INTERACCIÓN DE LA RADICIÓN ÓPTICA CON LA PIEL

2.3.1 Teoría del Transporte

Como hemos mencionado anteriormente, el tejido biológico es un medio con alto esparcimiento, lo cual hace que la amplitud y fase de la onda que se propaga varíen aleatoriamente. Además la mayoría de los tejidos presentan una alta densidad de partículas esparcidoras por lo que estamos en presencia de un problema de esparcimiento múltiple. Para estudiar esta situación tradicionalmente se emplean dos teorías diferentes: La Teoría Analítica, cuyo punto de partida son las ecuaciones de Maxwell o la ecuación de onda, y la Teoría del Transporte o Teoría de la Transferencia Radiativa (TTR) como se ha mencionado en el Capítulo 1.

La TTR se inicia por Schuster en 1905 en su estudio de la radiación en atmósferas neblinosas. La ecuación fundamental de esta teoría es la ecuación de la transferencia radiativa (ETR) o ecuación de Boltzmann como también se le conoce.

La TTR se fundamenta en observaciones heurísticas y fenomenológicas de las características del transporte de la intensidad específica [8], que es la magnitud física de partida en esta teoría. Las suposiciones fundamentales de la TTR aplicada a la distribución de la luz en el tejido son:

1. Los campos no están correlacionados.
2. No se incluye el fenómeno de difracción.
3. Se desprecia el fenómeno de polarización, aunque su efecto puede ser incluido mediante la matriz de Stokes.

La ETR es una ecuación íntegro-diferencial que contiene, además de la intensidad específica, los parámetros ópticos del tejido**:** el coeficiente de absorción $\mu_a(\lambda)$, el coeficiente de esparcimiento $\mu_s(\lambda)$ y la función de fase $p(\mathbf{s},\mathbf{s}')$ que se relacionan como sigue:

$$\frac{\partial I(\mathbf{r},\mathbf{s})}{\partial s} = -(\mu_a + \mu_s)I(\mathbf{r},\mathbf{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi}\int p(\mathbf{s},\mathbf{s}')I(\mathbf{r},\mathbf{s}')d\omega' + F(\mathbf{r},\mathbf{s}) \qquad (14)$$

donde:

- $I(\mathbf{r},\mathbf{s})$ Intensidad específica en el punto $\mathbf{r}$ del espacio y en la dirección del vector $\mathbf{s}$.
- $\frac{\partial I(\mathbf{r},\mathbf{s})}{\partial s}$ Gradiente de la intensidad específica en el punto $\mathbf{r}$ del espacio y en la dirección del vector $\mathbf{s}$.
- $-(\mu_a + \mu_s)I(\mathbf{r},\mathbf{s})$ Pérdidas debidas a la absorción y al esparcimiento.
- $\frac{\mu_s}{4\pi}\int p(\mathbf{s},\mathbf{s}')I(\mathbf{r},\mathbf{s}')d\omega'$ Ganancia debido al esparcimiento desde todas las direcciones $\mathbf{s}'$ hacia la dirección $\mathbf{s}$.
- $F(\mathbf{r},\mathbf{s})$ Fuente de potencia generada en el punto $\mathbf{r}$ del espacio y en la dirección del vector $\mathbf{s}$.

2.3.2 Solución de la Ecuación de Transferencia Radiativa por el Método de Monte Carlo

La ecuación (14) tiene un carácter general y mediante su resolución podemos hallar propiedades de interés de la distribución de la luz en el tejido tales como: reflexión especular, reflexión difusa, fracción de radiación absorbida, fracción de radiación transmitida, etc. Nosotros vamos a enfocar nuestra atención en la reflexión difusa de la luz en los tejidos por ser una magnitud que brinda información del estado del mismo y por su fácil medición mediante espectrómetros modernos de fibras ópticas.

Es difícil de obtener una solución analítica de la ETR a menos que se hagan aproximaciones sobre el medio biológico, la geometría de la radiación incidente y las condiciones de frontera. Es por esto que se buscan otras

alternativas como es el método de Monte Carlo, que resulta muy apropiado para obtener una solución numérica de la ETR para medios con geometrías arbitrarias y condiciones de frontera variadas.

Durante la aplicación del método de Monte Carlo en el campo de la óptica biomédica consideramos un modelo de tejido continuo constituido por un medio turbio con variaciones de las propiedades ópticas suficientemente pequeñas como para evitar la absorción localizada [9, 15]. Por otra parte, se hace uso del carácter corpuscular de la luz. Además se emplea el concepto de distribución de probabilidad para los eventos de esparcimiento y absorción.

Algunos autores refieren el inicio del método de Monte Carlo con el “problema de la aguja”, el cual planteó y resolvió en una nota en "Actes de l'Academie des Sciences" en Paris en el año 1733 Georges Louis Leclerc, Conde de Buffon (1707-1788 Francia), y que posteriormente publicó en "Essai d'arithmetique morale" en 1777 [16].

El problema anterior contiene la esencia del método de Monte Carlo, pues a través de la repetición del experimento se proponía hallar el número pi. Sin embargo se considera a Ulam y Nicholas Metrópolis [17] como los iniciadores del método, además de acuñarlo con el nombre: método Monte Carlo, para hacer referencia al carácter estadístico que tiene en común con los juegos del azar que gozaban de amplia atracción popular en Mónaco. Este método se facilitó por la aparición de la primera máquina computadora digital y su aplicación en el proyecto secreto del departamento de defensa de los Estados Unidos durante la creación de la primera bomba atómica (proyecto Manhattan en la década del 40).

La modelación por Monte Carlo se introdujo por primera vez, en el campo de la interacción láser-tejido biológico, por Wilson y Adam en 1983 para determinar la absorción y distribución de la luz en el tejido [18]. Los autores L. H Wang y S. L Jacques han desarrollado dos códigos Monte Carlo muy

útiles para modelar el transporte de fotones en un tejido multi-estratificado [19, 20].

Nosotros vamos a hacer uso del primer código que fue liberado para uso público y es conocido por el acrónimo MCML proveniente de su significado en inglés, Monte Carlo Multi-Layered. Fue impreso por primera vez en agosto de 1992 y actualizado por última vez en enero de 1998.

La simulación computacional del proceso de transferencia de fotones es, en esencia, una simulación de las trayectorias de los fotones de acuerdo con un esquema general [21] que consta de los siguientes pasos:

1. Simulación de la *posición original* por una fuente de distribución conocida
2. Simulación de la *longitud de trayectoria libre*.
3. Evaluación del *escape* del fotón del medio.
4. Cálculo de las coordenadas de la nueva colisión.
5. Simulación del *tipo de colisión* (absorción o esparcimiento).
6. Simulación del coseno del ángulo de esparcimiento.
7. Cálculo de los *cosenos directores* de la nueva dirección.
8. Regresar al punto 2.

Si ocurre un escape en el paso 3 o una absorción en el paso 5 entonces se almacena un uno y se inicia la simulación de una nueva trayectoria.

Durante la simulación computacional una parte fundamental del método es la obtención de números aleatorios (pseudoaleatorios) que se emplean durante el proceso. Ellos son en general extraídos vía una regla matemática conveniente en la computadora, tal que pasa la mayoría de pruebas estadísticas para considerarlos aletarorios. Esto ha sido estudiado y desarrollado durante muchos años por matemáticos y computólogos, y una referencia de rigor son los libros modernizados de D. Knuth [22].

El código MCML.exe trata acerca del transporte de un haz de fotones infinitamente estrecho que incide perpendicularmente sobre un tejido multi-estratificado. Una de las magnitudes físicas de salida que simula este código es la reflectancia difusa.

2.3.3 Especificaciones del código MCML.exe aplicado a la piel

La piel es un órgano naturalmente multi-estratificado e inhomogéneo según hemos descrito en el epígrafe 2.2 de este Capítulo. Un aspecto importante, al aplicar el código MCML.exe a la piel, es que debemos despreciar su carácter rugoso en la superficie así como las ondulaciones en las interfases epidermis/dermis (lámina basal) y dermis/tejido subcutáneo. Se debe definir los parámetros ópticos, así como el índice de refracción y el espesor de cada capa. Por último debemos precisar el índice de refracción del medio superior e inferior que acotan el conjunto de capas que forman el modelo óptico propuesto para la piel.

2.4 IMPLEMENTACIÓN DE ESTUDIOS ESPECTRALES CON MCML.exe

De forma particular si deseamos emplear el código MCML.exe para simular la dependencia espectral, de alguna magnitud física de salida que proporciona este código, debemos expresar la dependencia de los parámetros ópticos en cada capa con la longitud de onda, establecer la expresión analítica de cada uno de ellos y conformar un archivo de entrada con extensión *.mci* con corridas múltiples definidas. En este caso cada corrida la hacemos corresponder con los datos estructurados para cada longitud de onda de interés. Es importante puntualizar que el programa MCML.exe no está concebido para esta aplicación, sin embargo debido a la flexibilidad que brinda al permitir incluir en el archivo de entrada múltiples corridas fue posible implementar el estudio espectral de la reflectancia difusa. A continuación se describen los dos códigos en MATLAB®, que como parte de esta tesis se desarrollaron para facilitar notablemente los estudios del espectro de la reflectancia difusa de la piel humana. Vale aclarar que estos códigos se usan de manera conjunta con el código ejecutable MCML.exe; sin embargo el código MCMLinput.m brinda además la información del valor de los parámetros ópticos de la piel en cada capa, y de la influencia de los

parámetros biológicos sobre los parámetros ópticos a través de la visualización grafica de las curvas de absorción por capa del modelo óptico usado.

2.4.1 Desarrollo de los códigos MCMLinput y MCMLoutput en MATLAB®.

El código MCMLinput.m fue desarrollado para generar un archivo de datos de entrada para el código ejecutable MCML.exe. La extensión del archivo de entrada debe ser *.mci* y estar escrito en un formato de datos y comentarios donde se especifican los siguientes parámetros del formato y la simulación:

1. Versión del archivo: 1.0
2. Número de corridas: variable
3. Nombre del archivo de salida: debe ser con extensión .mco y de tipo ascii.
4. Número de fotones Nf: 5000 o más para estudios de la reflectancia difusa.
5. Dimensiones dz y dr de la celda espacial.
6. Número de celdas Nz y Nr en las variables z y r, respectivamente.
7. Número de capas que representan el tejido.
8. Índice de refracción, coeficiente de absorción, coeficiente de esparcimiento, factor de anisotropía y espesor para cada capa.
9. Índice de refracción de los medios superior e inferior al conjunto de capas.

El usuario introduce la longitud de onda inicial y final del intervalo espectral donde quiere realizar la simulación y además un paso de 10 nm para la generación de longitudes de ondas intermedias. Estos datos son utilizados para generar el número de corridas y el nombre de archivos de salida. Estos archivos para un intervalo de 400 a 700 nm resultan ser 31 y se nombraron como sigue: 400.mco, 410.mco,...700.mco.

Los parámetros del archivo de entrada, descritos en los puntos 4-9 son introducidos por el usuario de acuerdo con el modelo óptico del tejido en estudio. Los parámetros ópticos: coeficiente de absorción, coeficiente de esparcimiento y factor de anisotropía mencionados en el punto 8, en general,

son dependientes de la longitud de onda. Las expresiones analíticas para los parámetros ópticos han sido tomadas de trabajos de investigación de otros autores, y se refieren y comentan detalladamente en el Capítulo 3 de este trabajo. En principio, los parámetros ópticos pueden ser obtenidos por medio de cálculos *ab initio* [23].

Estos parámetros ópticos quedan a la vez relacionados con parámetros biológicos de los tejidos tales como: fracción volumétrica de melanosomas fme, fracción volumétrica de sangre fbl, etc, los cuales son introducidos por el usuario durante la confección del archivo de entrada mediante el código MCMLinput.m

En el apéndice A de esta tesis se incluye a modo de ilustración un archivo típico de los que se pueden generar con el código MCMLinput.m para el intervalo espectral 400-700 nm y un paso de 100 nm.

Una vez generado el archivo de entradas múltiples con extensión .mci el próximo paso es abrir el código ejecutable MCML.exe e introducir el nombre del archivo de entrada para que sea corrido con estos datos. Una vez ejecutado MCML.exe, éste produce 31 archivos de salida con extensión .mco, según se describió anteriormente.

Estos archivos de salida tienen un formato que reproduce en parte los datos del archivo de entrada y además incluye el valor de las magnitudes físicas simuladas (reflectancia difusa, reflexión especular, fracción absorbida y transmisión) con la dependencia radial (r), angular (θ) y en profundidad (z).

El código MCMLoutput.m fue desarrollado para leer, de cada uno de los 31 archivos de salida, la reflectancia difusa correspondiente a cada longitud de onda del intervalo escogido. Los valores leídos se guardan en un archivo de texto auxiliar *.txt*. En otra instrucción, del mismo código MCMLoutput.m, se carga este archivo para generar el grafico de la reflectancia difusa Rd en función de la longitud de onda λ.

2.5 CONCLUSIONES

La estructura, dimensiones y composición variada del tejido biológico dan origen a un alto nivel de esparcimiento de la radiación electromagnética en este medio, fenómeno que generalmente supera al proceso de absorción que también experimenta dicha radiación.

Se ha descrito la estructura y composición de la piel humana, resaltándose su arquitectura intrínsecamente estratificada, así como los centros de absorción y esparcimientos fundamentales por cada capa.

Se presentó la Teoría de la Transferencia Radiativa como el marco teórico que utilizamos para explicar la interacción luz–piel. La solución de la ecuación de la transferencia radiativa se encuentra utilizando el método de Monte Carlo, específicamente mediante el código MCML.exe, de dominio público.

Se desarrollaron en esta tesis dos códigos (MCMLinput.m y MCMLoutput.m) en el lenguaje de programación MATLAB® que permiten implementar una herramienta para la simulación espectral de la reflectancia difusa conjuntamente con el programa MCML.exe.

REFERENCIAS

[1] http://es.geocities.com/bonidavi/nueva/nutri5.html

[2] B. Alberts et al, “Chapter 19 Cell Juctions, Cell Adhesion, and The Extracellular Matrix” En Molecular Biology of The Cell , publicado por Garland Science, New York, 2002, pp. 1065-1126.

[3] http://omlc.ogi.edu/spectra/water/index.html Scott Prahl, “Optical Absorption of Water Compendium”, accesado 25 de Febrero de 2006.

[4] V.V. Tuchin, “Chapter 1 Optical Properties Tissues with Strong (Multiple) Scattering” En Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, publicado por SPIE, Washington, 2000, pp. 3-108.

[5] http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/scatterers.html Scott Prahl y S.L. Jacques “Some Biological Scatterers”, accesado 25 de Febrero de 2006.

[6] A. Ishimaru, “Chapter 3 Characteristics of Discrete Scatterers in the Atmosphere, Ocean, and Biological Material” En Wave Propagation and Scattering in Random Media. Parte I The IEEE/OUP Series on Electromagnetic Wave Theory. Reimpresión por Academic Press y Oxford University 1997. Editor Donald G.Dudley. pp. 41-68.

[7] http:/www.omlc.ogi.edu/news/jan98/skinoptics.html S.L Jacques, “Skin Optics,”(1998), accesado Enero 5, 2006.

[8] S. Chandrasekhar, “Radiative Transfer”, publicado por Dover Publications, Inc, New York.1960, pp. 1-393.

[9] S.A. Prahl, “Light Transport in Tissue”. Tesis doctoral, University of Texas at Austin, Diciembre 1988.

[10] I.G. Henyey y J.L. Greenstein, “Diffuse Radiation in the Galaxy”. American Astronomical Society. Provided by the Nasa Astrophysics Data System.

[11] H.C van de Hults, “Light Scattering by Small Particles”. Publicado por Dover Publications, Inc, New York.1957,pp. 1-470.

[12] C.F Bohren y D.R.Huffman, “Absorption and Scattering of Light by Small Particles”. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1983

[13] A.A. Cordero. “Biología de la Piel. Estructura y Funciones”. Editorial Médica Panamericana. Reimpresión de la primera edición, marzo de 1997.pp 1-110.

[14] http://www.derm101.com/public/freeinflam.aspx B. Ackerman. “Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases” (2003), accesado December 15, 2005.

[15] V.V. Tuchin, “Chapter 1 Introduction to Light Scattering by Biological Objects.” En Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Parte I. Una publicación de SPIE, Bellingham, Washing USA (2002). Editor Valery V Tuchin. pp. 31-167.

[16] http://es.wikipedia.org/wiki/Aguja_de_Buffon accesado 20 Octubre de 2006.

[17] B. Lapeyre and E. Pardoux, “Introduction to Mont-Carlo Methods for Tranport and Difusión Equations”. English edition © Oxford university press 2003.

[18] B.C, Wilson y G. Adam. “A Monte Carlo Model for the Absorption and Flux distributions of Light in Tissues.” Medical Physics. Vol.10, No 6, 824-830 (1983).

[19] Wang.L, Jacques.S.L, Zheng L, “MCML-Monte Carlo Modeling of Light Transport in Multi-layered Tissues”. Computers Methods and Programs in Biomedicine 47 (1995) 131-146.

[20] Wang.L, Jacques.S.L, Zheng L, “CONV-Convolution for Responses to a Finite Diameter Photon Beam Incident on Multi-layered tissues”. Computers Methods and Programs in Biomedicine 54 (1997) 141-150.

[21] G.I. Marchuk et al, ”The Monte Carlo Methods in Atmospheric Optics”. English edition © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1980. Original Russian Edition 1974.

[22] D. Knuth “The Art of Computer programming” Vols. 1,2 y 3 (Addison-Wesley, 2005).
[23] J.F. Rivas “Estudio Químico Cuántico de Polímeros Orgánicos de la Piel Humana”. Programa y resúmenes del XLVII Congreso Nacional de Física, México, 2004.

Capítulo 3

Simulaciones Numéricas

''First you guess. Don't laugh, this is the most important step.
Then you compute the consequences. Compare the consequences to experience. If it desagrees with experience, the guess is wrong.
In that simple statement is the key to science. It doesn't matter how beautiful your guess is or how smart you are or what your name is. If it disagrees with experience, it is wrong. That's all there is to it ''

Richard Feynman

En este Capítulo se realiza la simulación numérica del espectro de reflexión de la piel humana para varios casos de interés en el diagnóstico clínico de enfermedades dermatológicas por el método óptico del análisis de espectros de reflexión difusa. Se hace uso de la estructura estratificada de la piel presentada en el Capítulo 2 para simular la reflexión espectral de la piel humana de adultos y neonatos. Se considera una primera simulación para la piel de adultos que contempla la reflexión espectral de la piel normal para diferentes grados de pigmentación. La segunda simulación para este mismo grupo abarca un posible estado de piel eritematosa a partir de la hipótesis de que considerando a la sangre uniformemente distribuida en la epidermis se tendrá tal estado o condición médica para una fracción volumétrica de sangre del 1%. Posteriormente se consideran varias simulaciones numéricas relacionadas con la piel de neonatos con diferentes valores de sus parámetros biológicos principales, incluyendo la concentración elevada de bilirrubina que puede conducir a un cierto grado de ictericia. La incidencia de

este estado de salud es bastante frecuente en los hospitales maternos y de ahí la importancia de considerar una simulación numérica que prediga el espectro de reflexión difusa de tal afectación con vista a evaluar las peculiaridades que tendría la determinación de la concentración de la bilirrubina sérica por métodos ópticos no invasivos. Por último se realiza la simulación numérica de una lámina de piel rodeada de aire. Esta simulación es útil para la medición *in-vitro* de los parámetros ópticos de muestras de piel.

3.1 EXPRESIONES ANALÍTICAS DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS.

Como ya hemos visto en el epígrafe 2.3.3 del Capítulo 2, para poder realizar la simulación numérica de la interacción de la radiación óptica con un tejido multiestratificado como la piel, es necesario conocer los parámetros ópticos en cada capa además de su espesor e índice de refracción. En este epígrafe resumimos las expresiones y términos concernientes a los parámetros ópticos, específicamente para la piel de adultos y neonatos. Estas expresiones son la base de las simulaciones que realizaremos en los epígrafes 3.2 y 3.3 de este Capítulo. Las unidades de longitud o inverso de longitud, como por ejemplo para el espesor de una capa o el valor de los coeficientes de absorción y esparcimiento, se expresan siempre en cm durante toda la tesis de acuerdo con las definiciones establecidas en el epígrafe 2.1 del Capítulo 2.

3.1.1 La piel de adultos

Absorción

El coeficiente de absorción total de la epidermis μ_{aE} (λ) queda definido por el coeficiente de absorción promedio μ_{ame} (λ) del interior de un melanosoma y por el coeficiente de absorción básico μ_{abase} (λ) de la epidermis. El coeficiente

de absorción básico μ_{abase} (λ) es muy similar para la epidermis y la dermis y se refiere a la absorción de estas capas consideradas en ausencia total de melanina y sangre respectivamente. La expresión analítica para ambos coeficientes aparece reportada y ampliamente discutida por Jacques [1]:

$$\mu_{ame}(\lambda) = 6.6 * 10^{11} / \lambda^{3.33} \quad (1)$$

$$\mu_{abase}(\lambda) = 0.244 + 85.3 * e^{-(\lambda-154)/66.2} \quad (2)$$

La expresión analítica para μ_{abase} (λ) se fundamenta en mediciones de la piel de ratas sin sangre, utilizando una esfera integradora calibrada adecuadamente con modelos sintéticos de tejidos (phantoms) de propiedades ópticas conocidas. Su expresión analítica es válida para el rango espectral de 350-1100 nm.

La expresión analítica para el coeficiente de absorción de los melanosomas μ_{ame} (λ) se basa en varios estudios publicados acerca de la exposición umbral para la vaporización explosiva de los melanosomas mediante el uso láseres pulsados de diferentes longitudes de onda [2].

El elemento absorbente principal en la dermis de la piel sana es la sangre (específicamente la oxihemoglobina, de color rojo intenso característico propio de la sangre arterial, y la hemoglobina reducida, de color rojo oscuro típico de la sangre venosa). El coeficiente de extinción molar ε(λ) para ambas formas de moléculas aparece reportado en la bibliografía especializada por Prahl [3] y que incluimos de forma reducida en el apéndice B de esta tesis .

La relación entre el coeficiente de absorción μ_a (λ) de estas moléculas, su coeficiente de extinción molar ε(λ) y la concentración molar C_m es la siguiente:

$$\mu_a(\lambda) = \ln(10) * \varepsilon(\lambda) * C_m \quad (3)$$

Las unidades de estas magnitudes son respectivamente:

$$\mu_a(\lambda)\left[\mathrm{cm}^{-1}\right], \quad \varepsilon(\lambda)\left[\mathrm{cm}^{-1} * \mathrm{M}^{-1}\right], \quad \mathrm{C_m}\left[\mathrm{M}^{-1}\right]$$

A su vez la concentración molar C_m se obtiene a partir de la concentración volumétrica C_v [g/L] y el peso molecular P_m [g/L/M] según la relación:

$$C_m = C_v / P_m \quad (4)$$

El peso molecular para la hemoglobina es de 64500.00 g/L/M.

El coeficiente de absorción de la sangre se representa por μ_{abl} (λ) y se calcula según la expresión (3).

Esparcimiento

El proceso de esparcimiento en la piel está gobernado por la presencia de fibras cilíndricas de colágeno, grandes y pequeñas, y por otras estructuras como por ejemplo las membranas celulares. El coeficiente de esparcimiento reducido μ'_{sM} (λ) debido a las fibras de colágeno grandes, aplicando la teoría de Mie para cilindros [4] se expresa como:

$$\mu'_{sM}(\lambda) = 2.0 * 10^5 / \lambda^{1.5} \quad (5)$$

Las fibras de colágeno pequeñas contribuyen al esparcimiento en la dermis con un término que se calcula aplicando la teoría de Mie para esferas de 100 nm de diámetro y este constituye lo que se denomina límite de Rayleigh [4]. Esta contribución se calcula como:

$$\mu'_{sR}(\lambda) = 2.0 * 10^{12} / \lambda^4 \quad (6)$$

El coeficiente de esparcimiento de la dermis se obtiene por la expresión:

$$\mu_{sE}(\lambda) = [\mu'_{sM}(\lambda) + \mu'_{sR}(\lambda)]/[1 - g(\lambda)] \quad (7)$$

Donde g(λ) es el factor de anisotropía de la dermis, que relaciona al coeficiente de esparcimiento μ_s(λ) y al coeficiente de esparcimiento reducido μ'_s(λ) según la expresión (6) del Capítulo 2.

3.1.2 La piel de neonatos

Una de las diferencias fundamentales entre la piel de un adulto y la de un neonato, radica en que el coeficiente de esparcimiento de la piel del neonato depende de su madurez o edad de gestación. De acuerdo con estudios presentados por Saidi [5] se obtiene que el coeficiente de esparcimiento

reducido μ'_{sn} (λ) de la piel de neonatos se incrementa directamente con la madurez m del infante. Sin embargo su coeficiente de absorción μ_{anpiel} (λ) es independiente de dicha variable. La fórmula empírica que relaciona μ'_{sn} (λ) [cm^{-1}] con la madurez m [semanas] en el rango espectral 450-750 nm es:

$$\mu'_{sn}(\lambda) = y_{\text{int}}(\lambda) + p(\lambda) * m \quad (8)$$

donde:

$$y_{\text{int}}(\lambda) = 22.5 - 0.1427 * \lambda + 0.0001294 * \lambda^2 \quad (9)$$

y

$$p(\lambda) = 2.978 - 0.002999 * \lambda \quad (10)$$

Por otra parte el ajuste para el coeficiente de absorción de la piel μ_{anpiel} (λ) para λ> 620 nm se calcula según:

$$\mu_{anpiel}(\lambda) = 27 * e^{-0.006*\lambda} \quad (11)$$

Otros dos parámetros biológicos también notablemente diferentes para la piel de un adulto y de un neonato son su espesor y grado de hidratación. Por ejemplo se reporta que el espesor de la piel de un recién nacido está en el orden de 888±301 μm (valor promedio ± desviación estándar, n=20), especificándose para la epidermis un espesor de 50 μm [6].

Una vez comentados los parámetros ópticos y biológicos principales que caracterizan la piel de adultos y neonatos pasamos a realizar las simulaciones numéricas correspondientes a cada grupo de ellos.

3.2 SIMULACIÓN DE SITUACIONES CLÍNICAS EN LAS ESPECIALIDADES DE DERMATOLOGÍA Y NEONATOLOGÍA.

Las transformaciones estructurales de la piel en sus capas internas pueden inspeccionarse de forma no invasiva utilizando diferentes técnicas ópticas modernas. Una de estas técnicas es la espectroscopía de reflexión difusa [7] que por su relativa facilidad de implementación ha alcanzado una gran popularidad en la comunidad de investigadores que se dedican a la óptica

biomédica. Específicamente las transformaciones de la piel durante la aparición y desarrollo de varias enfermedades dermatológicas nos indican la posibilidad de hacer un diagnóstico acertado utilizando la medición del espectro de reflexión difusa de la piel. Por ejemplo, histológicamente existen diferencias bien marcadas entre la dermatitis perivascular superficial y la profunda; y la dermatitis nodular y la difusa [8]. En estos casos la diferencia médica principal consiste en la localización de los indicios de la dermatitis y en su extensión. Otros dos ejemplos de diferencias bien marcadas es en la dermatitis vesicular intraepidérmica y la subepidérmica donde nuevamente la localización de la vesícula en cada caso es diferente además de contener un material biológico ligeramente distinto al del tejido sano circundante.

Como un paso previo, a llevar a cabo protocolos de ensayos clínicos en unidades médicas y hospitales, hemos considerado oportuno realizar la simulación numérica del espectro de reflexión difusa de la piel humana para situaciones de interés en el diagnóstico clínico en las especialidades de dermatología y neonatología.

3.2.1 Piel sana de adultos con diferente grado de pigmentación

Modelo óptico de dos capas

La piel es un órgano multiestratificado e inhomogéneo como ya hemos referido en el epígrafe 2.2 Capítulo 2. En una primera aproximación consideramos un modelo simplificado de dos capas para la piel compuesto por la epidermis y la dermis en el sentido de la superficie a la profundidad. Las dos capas anteriores las suponemos entre el aire y el tejido subcutáneo como se puede apreciar en la Figura 3.1.

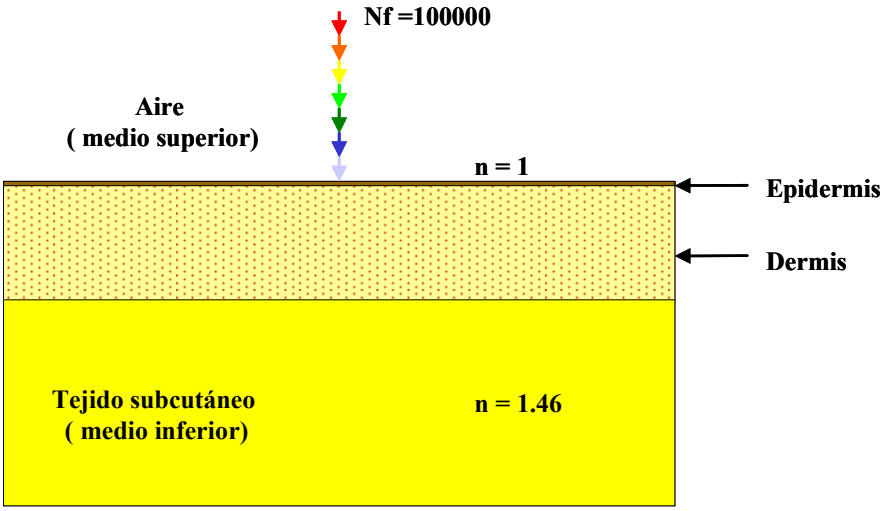


Figura 3.1. Modelo óptico de dos capas para la piel de adultos. El medio superior y el inferior son el aire y el tejido subcutáneo respectivamente. Se lanzan 100000 fotones para la simulación en cada longitud de onda de interés.

En la epidermis consideramos a la melanina como el único elemento absorbente, y lo suponemos además distribuido uniformemente en todo el espesor de esta capa (60 μm). Por otra parte en la dermis consideramos como único elemento absorbente a la sangre que también suponemos uniformemente distribuida en todo el espesor de dicha capa (1500 μm).

Para las capas anteriores consideramos las fibras de colágeno como el principal elemento de esparcimiento, influyendo además de forma muy similar, en el valor del coeficiente de esparcimiento de ambas capas [1].

La primera situación que simulamos es para el caso de la piel sana de adultos con diferentes grados de pigmentación. En este caso establecemos un valor típico de la fracción volumétrica de sangre fbl igual a 0.2%. Para representar los diferentes grados de pigmentación tomamos la fracción volumétrica de melanosomas como un parámetro variable con los siguientes los valores: 4%, 14% y 30%, representando así la piel con un grado de pigmentación ligero, moderado y fuerte, respectivamente. La simulación de la situación anterior se considera útil en dermatología, donde por ejemplo

puede ayudar a entender los diferentes tonos o sombras de rojo que presenta una misma lesión en personas con un color diferente de la piel [8].

En la Tabla 3.1 resumimos las expresiones utilizadas para calcular el coeficiente de absorción de cada capa de la piel atendiendo al epígrafe 3.1.1 de este Capítulo.

TABLA 3.1. Parámetros ópticos y geométricos del modelo utilizados en la simulación. El espesor de la capa se denota por d y su índice de refracción n.

Capa	d (cm)	n	μ_a (cm^{-1})	g
Aire		1		
Epidermis	$60x10^{-4}$	1.4	$fme*\mu_{ame}+ (1-fme)* \mu_{abase\ (1)}$	$0.62 + (0.29x10^{-3})*\lambda$
Dermis	$1500x10^{-4}$	1.4	$fbl*\mu_{abl}+ (1-fbl)* \mu_{abase\ (2)}$	$0.62 + (0.29x10^{-3})*\lambda$
Tejido Subcutáneo		1.46		

La fracción volumétrica de melanosomas en la epidermis y de sangre en la dermis se representa por fme y fbl respectivamente. El coeficiente de esparcimiento total en ambas capas se calcula de acuerdo con las expresiones (5)-(7) de este Capítulo. En la expresión (7) el factor de anisotropía g se calcula de acuerdo con la formula presentada por van Gemert [9], la cual indica una dependencia lineal creciente de este factor con la longitud de onda.

Los parámetros ópticos y biológicos, anteriormente discutidos, se introdujeron al programa de MATLAB® nombrado MCMLinput.m y que fue presentado en el epígrafe 2.4.1 del Capítulo 2. El resultado de esta simulación utilizando el código ejecutable MCML.exe se muestra en la Figura 3.2 y aparece comentado con más detalles en la referencia [10].

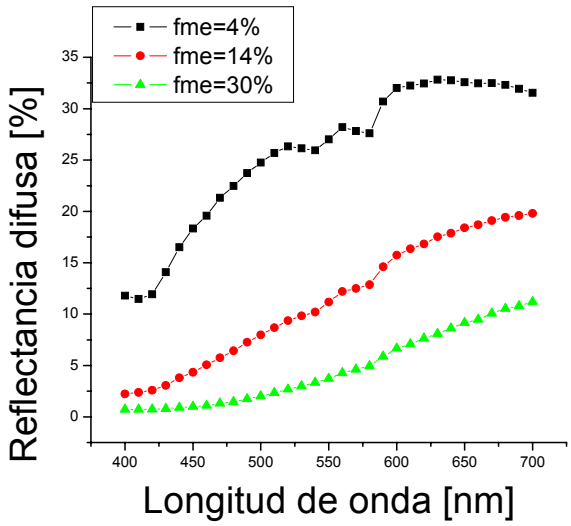


Figura 3.2. Reflexión difusa de la piel sana de un adulto para diferentes grados de pigmentación, manteniendo constante el valor de la fracción volumétrica de sangre. La fracción volumétrica de melanosomas establecida fue de 4%,14% y 30%; mientras que fbl = 0.2%.

En la figura anterior se muestra que las curvas de reflectancia difusa Rd (λ) para fme = 4% y 14% exhiben el patrón "W" característico asociado con la presencia de la hemoglobina oxigenada. Sin embargo para fme = 30% este patrón prácticamente está ausente o es muy débil. Las curvas de reflectancia están cualitativamente en correspondencia con la idea común de que la piel más clara refleja más cantidad de luz que la piel más oscura.

3.2.2 Enfermedad inflamatoria

Para esta segunda situación también hacemos uso del modelo óptico de dos capas presentado en el epígrafe anterior. En este caso la simulación se realiza para un adulto con piel ligeramente pigmentada (fme = 4%) con diferente grado de perfusión de la sangre. En este caso consideramos que el parámetro fbl en la ecuación (2) de la Tabla 3.1 es variable y toma dos

valores: 0.2% y 1%. El primer valor es para un contenido típico de sangre considerada como uniformemente distribuida en la dermis. El segundo valor es cuando la dermis está altamente irrigada por la sangre y por lo tanto dicho valor aparece incrementado con respecto al valor promedio. Asumimos que el valor de la fracción volumétrica de sangre fbl = 1% puede ser representativo de un proceso inflamatorio de la piel. La hipótesis se apoya parcialmente en hechos biológicos que relacionan el volumen de los capilares con la apariencia visual de la piel [8].

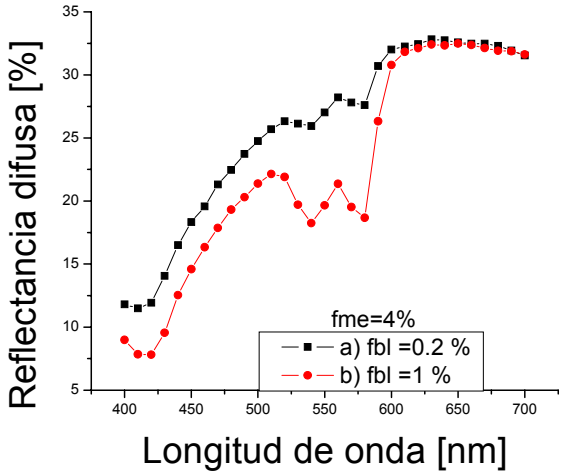


Figura 3.3. Reflexión difusa de la piel de un adulto con diferente estado de irrigación sanguínea. a) Para una fracción volumétrica de sangre promedio con un valor típico de 0.2%. b) Para una fracción volumétrica de sangre promedio incrementada hasta un valor de 1% representativo de una posible afectación de la piel relacionada principalmente con un proceso inflamatorio.

En la Figura 3.3 se aprecia que las dos curvas exhiben el patrón “W” característico asociado a la presencia de la sangre. Notemos que para fbl = 1% este patrón aparece realzado, indicando una dependencia directa entre la profundidad de este patrón en la curva de reflectancia y el parámetro fbl [10].

3.2.3 Hiperbilirrubinemia neonatal

La ictericia neonatal es una condición médica que ocurre comúnmente en los recién nacidos como resultado de un desbalance entre la producción y la eliminación de la bilirrubina. Por lo regular el 50% de los recién nacidos a término y algo más del 60% de los pretérminos se pondrán ictéricos dentro de la primera semana de vida [11].

La ictericia o hiperbilirrubinemia puede tener su origen en la acumulación de la bilirrubina en el suero de la sangre ya que el hígado aún no ha desarrollado totalmente las enzimas para oxidar la bilirrubina que posteriormente será excretada por los riñones.

Este exceso de bilirrubina en la sangre se manifiesta en la piel, los ojos y las mucosas como una coloración amarilla característica que puede apreciarse a simple vista, pero que en algunos casos puede resultar difícil de apreciar debido a la pigmentación elevada en determinados grupos raciales.

La hiperbilirrubinemia (nivel total de bilirrubina sérica TSB > 1.0 mg/dL) se presenta en casi todos los recién nacidos, mientras que la hiperbilirrubinemia significativa (TSB > 12.9 mg/dL) se presenta en sólo un 5-6% de la población de recién nacidos sanos [12]. Para un nivel excesivo de bilirrubina en sangre (29.2 mg/dL < TSB < 47.5 mg/dL) [13] ésta se puede precipitar en el cerebro, produciendo daños permanentes. El riesgo principal de la hiperbilirrubinemia neonatal en el cerebro es su potencial neurotóxico, conocido como kernicterus.

Tradicionalmente el tratamiento de la ictericia neonatal se basa en la determinación del nivel total de bilirrubina en sangre TSB. Este método sigue vigente hasta la fecha y es el procedimiento estandarizado en las unidades hospitalarias maternas. Sin embargo se han incluido nuevos métodos, como por ejemplo la bilirrubinometría óptica transcutánea BOT, que ha sido evaluada clínicamente mediante análisis de regresión lineal contra la

medición de TSB, resultando un alto grado de correlación entre ambos métodos (r = 0.938) [12, 14].

Por otra parte S. L Jacques et al. [15] han desarrollado un espectrómetro de reflexión de fibra óptica que combinado con la teoría de la difusión garantiza monitorear el nivel de bilirrubina en neonatos a partir directamente de primeros principios de interacción de la luz con los tejidos biológicos.

Nuestro estudio teórico en el caso de piel neonatal se realizó empleando un marco diferente al utilizado por Jacques et al, siendo en nuestro caso el método de Monte Carlo la técnica utilizada para la simulación del espectro de reflexión difusa de piel neonatal. Este estudio está motivado por la posibilidad de evaluar por anticipado las características espectrales de la reflexión de la piel de recién nacidos. Los resultados de esta simulación puden ser de utilidad para la planeación experimental de la medición de la concentración de la bilirrubina por métodos ópticos.

A continuación realizamos varias simulaciones numéricas del espectro de reflexión de la piel de neonatos para diferentes valores de los parámetros biológicos y ópticos que la caracterizan.

Modelo óptico de tres capas para la piel de neonatos

La medición transcutánea (TcB) de bilirrubina por métodos ópticos generalmente se realiza en la frente del infante. En el modelo óptico propuesto para dicha situación consideramos la piel como un tejido formado por tres capas planas e infinitas que yacen sobre el hueso frontal del cráneo del infante. La capa más externa es la epidermis y en ella consideramos a la melanina como el único elemento absorbente distribuido uniformemente en todo su espesor (40 μm). La fracción volumétrica de melanosomas la designamos por fme. La segunda capa, en sentido de la superficie a la profundidad, es la dermis. Consideramos en esta capa dos elementos absorbentes: la sangre y la bilirrubina, que suponemos se encuentran

uniformemente distribuidos en todo el espesor de la dermis (900 μm). Los valores del coeficiente de extinción molar para la bilirrubina aparecen en el apéndice B de esta tesis. La fracción volumétrica de la sangre y el coeficiente de proporción para la bilirrubina en la dermis los denotamos por fbl y fbi respectivamente [16]. Para las capas anteriores consideramos las fibras de colágeno como principal elemento de esparcimiento. Por otra parte el coeficiente de absorción básico es el mismo para la epidermis y la dermis [1]. La tercera capa que incluimos es el tejido subcutáneo, que está constituido principalmente por células de grasa (adipocitos). En este caso consideramos este tejido como altamente esparcidor y de absorción baja [17]. El modelo se presenta a continuación en la Figura 3.4.

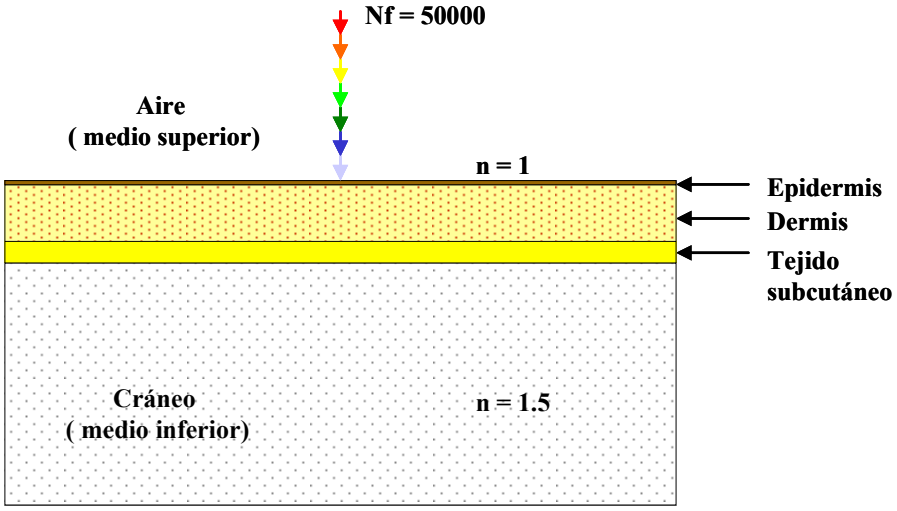


Figura 3.4. Modelo óptico de tres capas para la piel de neonatos. El sitio corporal modelado es la frente del infante. Consideramos el hueso frontal como el medio inferior al usar el código MCML.exe. Se lanzan 50000 fotones para la simulación en cada longitud de onda de interés.

Situaciones consideradas

La primera simulación está dedicada a investigar la dependencia de la reflectancia difusa espectral con la concentración Cbi de la bilirrubina. Se

establecieron como constante los valores fme = 2%, fbl = 0.2% y fbi = 20% para los melanosomas, la sangre y la bilirrubina, respectivamente. Los valores de concentración de la bilirrubina se escogieron como: 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 g/L para cubrir un intervalo desde valores fisiológicos permitidos hasta dañinos (por su proximidad a valores de alto efecto neurotóxico).

La segunda simulación está dirigida a estudiar la influencia del grado de pigmentación sobre la reflectancia espectral de un neonato con (Cbi = 0.10 g/L) y contenido de sangre fbl = 0.2%. Aquí se varió el contenido de melanina fme según los valores: 0% (piel amelanótica), 2% y 4% (todos los neonatos de piel ligeramente pigmentada). La tercera y última simulación de este conjunto considera la dependencia de la reflectancia espectral con el contenido de sangre. Se estableció para la fracción volumétrica de sangre fbl los valores siguientes: 0.1%, 0.2% y 1%. Para la fracción volumétrica de melanosomas se escogió el valor fme = 2% y al igual que en la simulación anterior se consideró Cbi = 0.10 g/L para representar un caso típico de hiperbilirrubinemia.

En las tres situaciones anteriores se asumió una madurez de la piel de 39 semanas. La expresión para el coeficiente de esparcimiento reducido de la piel de recién nacidos para esta madurez aparece citada por L.L.Randeberg en su tesis doctoral [18] con relación al trabajo de tesis de Saidi, del cual no tenemos copia . La expresión en cuestión es la que usaremos y presentamos a continuación:

$$\mu'_{sn}(\lambda) = C_{Mie}(1 - 1.745 * 10^{-3} * \lambda + 9.8443 * 10^{-7} * \lambda^2) + C_{Rayleigh} / \lambda^4 \qquad (12)$$

Donde $C_{Mie} = 6800\left[m^{-1}\right]$ y $C_{Rayleigh} = 9.5 * 10^{13}\left[nm^4 m^{-1}\right]$ son la constante de Mie y Rayleigh respectivamente para 39 semanas de madurez de la piel.

Los resultados de las tres simulaciones descritas se presentan a continuación:

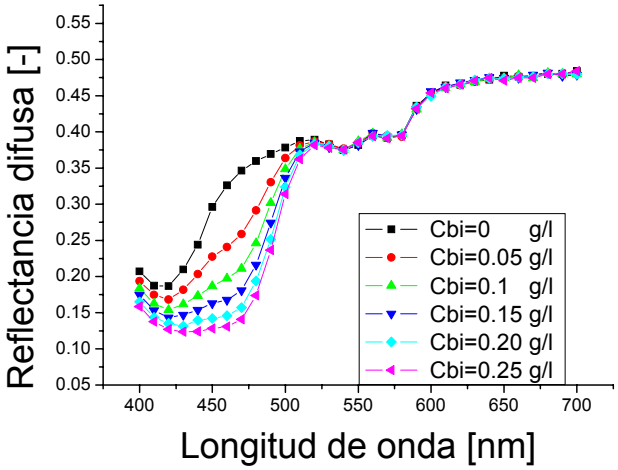


Figura 3.5. Reflexión difusa espectral de la piel de un neonato con una madurez de la piel de 39 semanas. Se utiliza la concentración de bilirrubina Cbi como parámetro variable en la simulación y se mantiene constante los siguientes parámetros: fme = 2%, fbl = 0.2% y fbi = 20%.

Para la primera simulación las curvas de reflexión difusa se muestran en la Figura 3.5. En esta figura podemos apreciar que la curva de reflectancia difusa Rd (λ) muestra un cambio de forma, fundamentalmente en el intervalo espectral de 400-520 nm. Se observa que el efecto del pico de absorción de la sangre (420 nm) en este intervalo deja de ser predominante en la medida que se incrementa la concentración Cbi de la bilirrubina. Se alcanza a apreciar también que el decremento de la reflectancia con el incremento de Cbi en general no es lineal en el intervalo mencionado anteriormente, siendo más evidente a la longitud de onda de 460 nm.

El resultado de la comparación de la reflectancia cuando se varía el grado de pigmentación de la piel (segunda simulación) se presenta en la Figura 3.6. En este caso podemos apreciar que para un mismo valor de la concentración de bilirrubina (0.1 g/L, hiperbilirrubinemia típica) y del contenido de sangre

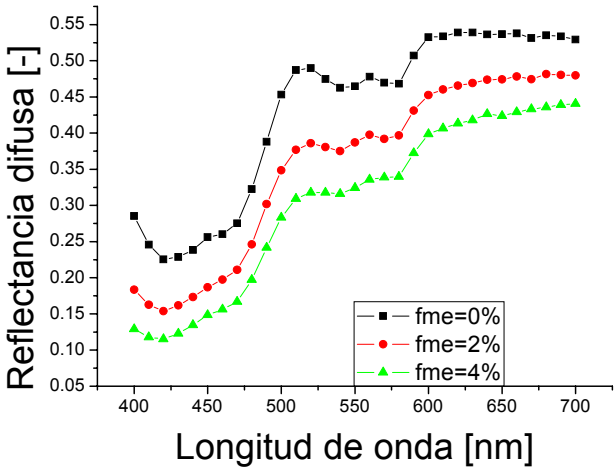


Figura 3.6. Reflectancia difusa espectral de la piel de neonato con un nivel de hiperbilirrubinemia típico (0.10 g/L). Se toma la fracción volumétrica de melanosomas fme como el parámetro variable en la modelación.

fbl = 0.2% se tiene un cambio apreciable del valor de la reflectancia. Este resultado debe ser analizado con detalle para poder aplicar la medición del espectro de reflexión a la determinación *in vivo* de la concentración de bilirrubina en neonatos, ya que evidencia claramente el efecto de enmascaramiento que juega la pigmentación de la piel en la determinación del nivel de la bilirrubina.

Por último en la Figura 3.7 se muestra la influencia del contenido de sangre sobre el espectro de reflexión cuando el primero se cambia mediante la fracción volumétrica de sangre fbl. Se aprecia que para cambios relativamente pequeños de este parámetro (de 0.2% a 0.1%) la influencia más notable está centrada en las longitudes de onda siguientes: 420, 540 y 580 nm. Para un cambio mayor de la fracción volumétrica (de 0.2% a 1%) la reflectancia cambia notablemente, en la llamada zona “W” del espectro y en la longitud de onda de 420 nm. Para longitudes de onda superior a 620 nm el cambio espectral de la reflexión difusa a estos valores de fbl es despreciable.

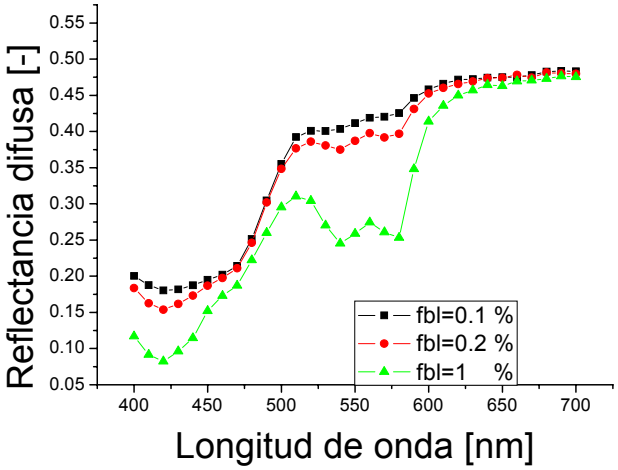


Figura 3.7. Reflexión difusa espectral de la piel de un neonato con un nivel de hiperbilirrubinemia típico (0.10 g/L). El contenido de sangre es el parámetro variable en la simulación. Una fracción volumétrica de sangre del 1% la consideramos como un valor relativamente atípico pero posible.

3.3 SIMULACIÓN DE UNA SITUACIÓN ASOCIADA A LA MEDICIÓN DE PARÁMETROS ÓPTICOS

En la óptica de tejidos biológicos un campo de investigación importante lo constituye la medición de los llamados parámetros ópticos del tejido, parámetros que hasta ahora hemos tomado de la literatura publica. Existen varias técnicas de medición de estos parámetros [19, 20]. Una de las más populares es el uso de esferas integradoras conjuntamente con un modelo óptico apropiado para el tejido, por ejemplo la teoría de Kubelka–Munk, permitiendo así el cálculo de dichos parámetros. Durante el uso de la técnica de esferas integradoras se coloca una capa fina de la muestra entre dos vidrios delgados y a la vez todo el conjunto enfrente de los puertos ópticos de las esferas. Una vez colocada la muestra se procede a medir el flujo total transmitido que es colimado, el flujo difusamente reflejado y el flujo difusamente transmitido.

3.3.1 Reflexión difusa Rd(λ) para orientación natural e inversa de la piel

En esta simulación estudiamos la diferencia de la reflectancia difusa cuando la muestra se coloca en una orientación natural y en orientación inversa frente a un haz de fotones que inciden normalmente sobre ella. En la Figura 3.8 se describe esta situación.

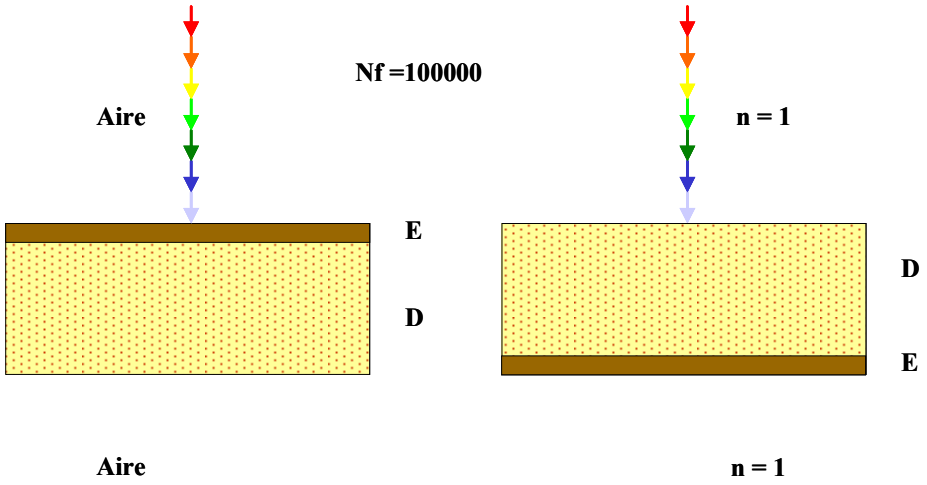


Figura 3.8. Representación esquemática de la orientación natural e inversa de la piel. La orientación natural de la piel es aquella en que la primera capa con la cual se encuentra el haz incidente es la epidermis. La orientación inversa se tiene cuando la primera capa expuesta al haz de incidencia es la dermis.

En esta simulación se investiga para qué valor de la fracción volumétrica de melanosomas (fme), la reflexión difusa de la piel orientada naturalmente Rdn(λ) y de la piel orientada inversamente Rdi(λ) se diferencian en menos de un 15 %. Este valor de fme se denomina en lo adelante como fme* y será un valor característico importante pues para muestras de piel con una fracción volumétrica de melanosomas inferiores a fme* la medición de sus parámetros ópticos en orientación natural e inversa será prácticamente la misma; esto define un tipo de muestras específicas que podemos considerar como no-

pigmentadas o amelanóticas. Parte de los parámetros ópticos de entrada para la simulación se presentan en la Tabla 3.2.

TABLA. 3.2. Parámetros ópticos de entrada usados en esta simulación para el programa MCML.exe. d es el espesor de cada capa de la muestra

Capas	d (cm)	n	μ_a (cm^{-1})	g
Aire		1		
Epidermis	$60x10^{-4}$	1.37	$fme*\mu_{ame}+ (1-fme)* \mu_{abase}$ (1)	$0.62 + (0.29x10^{-3})*\lambda$
Dermis	$1500x10^{-4}$	1.37	$fbl*\mu_{abl}+ (1-fbl)* \mu_{abase}$ (2)	$0.62 + (0.29x10^{-3})*\lambda$
Aire		1		

El modelo óptico es el de una lámina de piel formada por dos capas, la más fina es la epidermis con 60 μm de espesor, mientras que la dermis es de 1500 μm. En este caso consideramos que a la muestra de piel se le ha separado cuidadosamente el tejido subcutáneo. En la epidermis asumimos como único elemento absorbente a la melanina. En la dermis tomamos como elemento absorbente principal a la sangre que además la suponemos uniformemente distribuida por toda la dermis con una fracción volumétrica fbl de 0.2%. Como parámetro variable de la simulación escogemos en este caso a la fracción volumétrica de melanosomas y le asignamos inicialmente los valores de 0.5, 2%, 4% y 6% que son representativos de una muestra de piel ligeramente pigmentada. Estas dos capas de piel están acotadas superior e inferiormente por el aire.

En la Figura 3.9 se muestra el resultado de aplicar el código MCML.exe al modelo óptico descrito anteriormente.

El resultado de la simulación para la orientación natural se aprecia en la Figura 3.9a donde las curvas de reflexión difusa Rdn (λ) expresan un comportamiento que cualitativamente es el esperado con relación a la idea común de que a mayor grado de pigmentación o contendido de melanina menor será la reflexión de la piel.

El comportamiento de la reflexión difusa es totalmente diferente al anterior para la orientación inversa, tal y como se aprecia en la Figura 3.9b, donde las curvas de reflexión difusa Rdi (λ) coinciden prácticamente en todo el intervalo espectral para los cuatro valores de la fracción volumétrica estudiados. Además se aprecia en esta misma figura, una ligera diferencia entre las curvas espectrales solamente para las longitudes de ondas mayores a, 575 nm. Esta diferencia entre las curvas se puede interpretar a partir del hecho de que a longitudes de onda mayores, la profundidad de penetración óptica de la luz $\delta(\lambda)$ [21] se incrementa, dándose así la posibilidad de una mayor interacción de estos fotones con la parte más profunda del tejido, en este caso con la epidermis. Como la epidermis contiene la melanina, se explica entonces que los fotones de $\lambda > 600$ nm interactúen con este pigmento y por lo tanto se registre una reflexión difusa menor en la medida que el contenido de melanina aumente como se muestra en la citada figura.

Es importante notar que tanto en la reflexión natural como en la inversa todas las curvas de reflexión exhiben el patrón W característico de la sangre.

En las Figuras 3.9 b-f se presenta el resultado de la simulación cuando se compara la reflexión difusa para orientación natural e inversa de la piel a diferentes valores de la fracción volumétrica de melanosomas. Podemos apreciar como con la disminución de la fracción volumétrica de melanosomas las curvas normal e inversa se aproximan. Cuando fme es de 0.5% se tiene una diferencia entre la reflexión difusa de ambas curvas inferior al 15%. Finalmente es importante comentar que la diferencia entre las dos curvas de la Figura 3.9 f es dependiente de la longitud de onda, siendo notable en el intervalo de 440 a 520 nm.

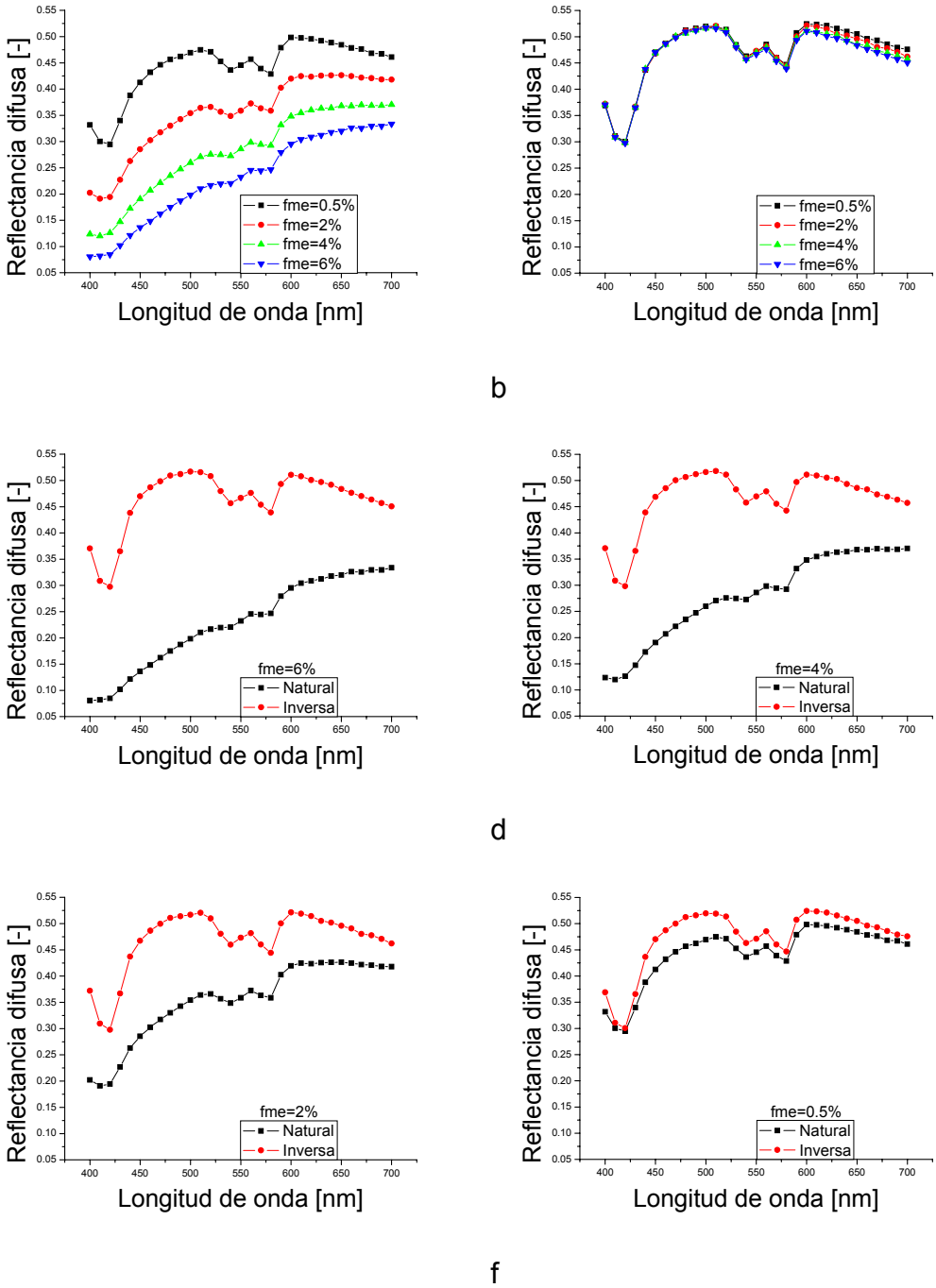


Figura 3.9. a) Resultado de las curvas de reflexión difusa para orientación natural de la piel. Nótese el incremento de la reflexión según disminuye la fracción volumétrica de melanosomas. b) Resultado de las curvas de reflexión difusa para orientación inversa de la piel. Se aprecia un cambio notable de la reflexión con el incremento del contenido de melanina o fracción volumétrica de melanosomas. Las Figuras c-f) representan el resultado de la comparación de la reflectancia natural e inversa para cuatro valores diferentes de la fracción volumétrica de melanosomas.

3.4 CONCLUSIONES

Respecto a las simulaciones de los epígrafes 3.2.1 y 3.2.2 podemos concluir que las características principales del espectro de reflexión difusa de la piel de adultos se pueden obtener con el modelo simplificado de dos capas en combinación con el uso del código MCML.exe. Específicamente estas curvas para individuos de diferente grado de pigmentación se corresponden cualitativamente con los resultados esperados y reportados por otros autores. En el caso de un incremento de la fracción volumétrica hasta un valor de 1%, el resultado de la simulación nos permite hablar de la posible existencia de cierta correlación entre las dimensiones o métrica del llamado patrón W y el valor del parámetro biológico fbl que caracteriza el contenido de sangre en la dermis. Este hecho pudiera explotarse como fundamento de un algoritmo para el diagnóstico y monitoreo de lesiones de la piel.

En lo concerniente a las simulaciones del epígrafe 3.2.3 llamamos la atención con respecto al hecho de la alta dependencia que tiene la reflexión espectral con los parámetros biológicos del tejido tales como: fracción volumétrica de melanosomas y la fracción volumétrica de sangre. Ambos parámetros son los que en la clínica práctica presentan variación de acuerdo al grupo racial y a la individualidad de cada neonato.

Respecto a la dependencia de la reflexión espectral con la concentración de bilirrubina encontramos que la forma del espectro cambia notablemente en el intervalo de 400-500 nm y sería es ese intervalo donde nos concentraríamos, en principio, para establecer un algoritmo de medición de la concentración a partir de la medición del espectro de reflexión.

El modelo utilizado de tres capas, reproduce cualitativamente los resultados reportados en la literatura para simulaciones numéricas utilizando la teoría de la difusión, aunque la comparación se hace difícil pues no se reportan ni los parámetros biológicos ni los archivos de datos para realizar una comparación cuantitativa. Por lo tanto sugerimos pasar a realizar estudios experimentales

con control de las variables aquí trabajadas y comprobar la validez de este modelo.

La simulación del epígrafe 3.3.1 con un modelo simple de dos capas para una película de piel nos permitió hacer predicciones del valor de la fracción volumétrica de melanosomas para la cual se puede encontrar propiedades ópticas del tejido independiente de la orientación de la muestra. Consideramos muy útil apoyar o justificar estas predicciones con trabajo experimental por lo menos en un número discreto de longitudes de onda. Esto requerirá del trabajo conjunto con personal médico especializado en el manejo y caracterización de muestras de tejido.

Por último y no menos importante queremos puntualizar que todas las simulaciones presentadas en este Capítulo tienen un carácter más bien orientador que definitivo o acabado con respecto a los aspectos estudiados. En la medida que se pueda contar con los parámetros biológicos usados para poblaciones específicas de interés, entonces se podrán mejorar los modelos aquí propuestos.

REFERENCIAS

[1] http:/www.omlc.ogi.edu/news/jan98/skinoptics.html S.L Jacques, “Skin Optics,”(1998), accesado Enero 5, 2006.

[2] S.L Jacques, D.J McAuliffe. The Melanosome: Threshold Temperature for Explosive Vaporization and Internal Absorption Coefficient during Pulsed Laser Irradiation. Photochem. Photobiol. 53:769-775, 1991.

[3] http://omlc.ogi.edu/ spectra/hemoglobin/index.html Prah, S.I., “Optical Absorption of Hemoglobin,” (1999), accesado 25 de Enero de 2006.

[4] S.L. Jacques, "Origins of Tissue Optical Properties in the UVA, Visible, and NIR Regions," OSA TOPS on Advances in Optical Imaging and Photon Migration, Vol. 2, pp. 364-369, eds. RR Alfano, JG Fujimoto, publ. Optical Society of America, 1996.

[5] I.S. Saidi, et al. "Mie and Rayleigh Modeling of Visisble-Light Scattering in Neonatal Skin". Applied Optics/Vol. 34, No. 31/ 1995.

[6] S.L. Jacques et al. "Method and Apparatus for Optical Measurement of Bilirubin in Tissue". United State Patent, Number:5,353,790. Oct. 11, 1994.

[7] V.V. Tuchin, “Chapter 13 Reflectance and Fluorescence Spectroscopy of Human Skin *In Vivo*.” En Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Parte III. Una publicación de SPIE, Bellingham, Washing USA (2002). Editor Valery V Tuchin. pp. 727.

[8] http:// www.derm101.com/public/freeinflam.asp B. Ackerman. “Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases” (2003), , accesado 15 de Diciembre de 2005.

[9] M.J.C Van Gemert et al. "Skin Optics". IEEE Transactions on Biomedical Engineering 36**,** 1146-1154 1989.

[10] J.A. Delgado et al. "Modeling of Ligth Reflection from Human Skin". IX Mexican Symposium on Medical Physics, 2006.

[11] M.N Mesquita.”Hiperbilirrubinemia Neonatal”. Vol. 27, No. 2, Julio-diciembre. http://www.spp.org.py/revistas/ed_2000/hiper_julio_dic_2000.htm.

[12] V.K. Bhutani."Noninvasive Measurement of Total Serum Bilirubin in a Multiracial Predischarge Newborn Population to Assess the Risk of Severe Hyperbilirubinemia". PEDIATRIC Vol. 106 No. 2 August 2000.

[13] Groenendaal.F, van der Grond. J, S. de Vries.L. "Cerebral Metabolism in Severe Neonatal Hiperbilirrubinemia". PEDIATRICS VOL. 114, pp 291-294 2004.

[14] H.K. Delcher et al."Transcutaneous Bilirubin Measurement in a Mixed Population: Clinical Evaluation of a New Device".

[15] S.L. Jacques et al. "Developing an optical fiber reflectance spectrometer to monitor bilirubinemia in neonates". En Laser Tissue Interaction-1996, editado por S.L. Jacques., SPIE proceeding Vol.2975, San José, CA, 1997, pp. 115-124.

[16] P. Rodrigues "Optical Measurements for Quality Control in Photodynamic Therapy". Tesis, Julio 2003.

[17] N. Tsumura. "Mapping Pigmentation in Human Skin by Multi-visible-Spectral Imaging by Inverse Optical Scattering Technique". En The Eight Color Imaging Conference : Color Science and Engineering Systems, Technologies, Applications 2000.

[18] L.L. Randeberg. "Diagnostic Applications of Diffuse Reflectance Spectroscopy". Tesis, Junio 2005.

[19] V.V. Tuchin. "Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis". Tutorial texts in optical engineering. Part I. An Introduction to tissue optics. 1 Optical Properties Of Tissues with Strong (Multiple) Scattering, pp 15-44. (2000).

[20] M.Cunill et al " Experimental Determination of Local Diffuse Reflectance in Highly Scattering Media" IX Mexican Symposium on Medical Physics, 2006.

[21] S.Stolik et al "Measurement of the Penetration Depths of Red and Near Infrared Light in Human ''ex vivo'' Tissues". Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 57 (2000) 90–93.

Capítulo 4

Implementación de un Espectrómetro de Reflexión Difusa

''Imagination is more important than knowledge''

Albert Einstein

En este Capítulo presentamos la concepción e implementación de un espectrofotómetro para estudiar la reflexión difusa de la piel humana. El espectrofotómetro está basado en la combinación de un monocromador de prisma y una cámara CCD monocromática colocada en el plano de salida del monocromador. La característica principal de este arreglo es permitir el registro instantáneo del espectro de la señal óptica que se estudia, sin necesidad de movimiento mecánico del elemento dispersor. Se presenta un estudio experimental de este arreglo atendiendo a los siguientes parámetros: intervalo espectral de trabajo, calibración por longitudes de onda y resolución espectral. Además se evalúa la funcionalidad de este arreglo para la determinación del perfil de emisión espectral de fuentes de luz de características espectrales conocidas. Por último, se prueba el espectrómetro implementado en la adquisición del espectro de reflexión difusa de diferentes sitios corporales en voluntarios sanos.

4.1 INTRODUCCIÓN

Para medir la reflexión difusa de la piel humana se utilizan varias tipos de instalaciones experimentales. La medición más precisa se logra utilizando la técnica de esfera integradora [1], sin embargo determinados sitios corporales de interés no son accesibles por este medio dadas las dimensiones y la geometría de la esfera. Es por esto que para un ambiente clínico se prefiere usar una instalación más flexible basada en el uso de fibras ópticas configuradas en un arreglo en forma de "Y" para llevar la luz de iluminación y recoger una fracción de la reflexión difusa total [2, 3]. En ambos métodos para obtener el espectro de reflexión se requiere del empleo de un espectrómetro. Los diseños actuales de espectrómetros tienden a ser compactos y en extremo miniaturizados debido a la alta escala de integración que se ha logrado en las disciplinas de la electrónica y la óptica integrada. Los detectores que se emplean generalmente son arreglos lineales que atendiendo a la tecnología de fabricación y sus propiedades se clasifican en tres tipos: CCD, de fotodiodos y CMOS [4]. Un ejemplo de espectrofotómetro con arreglo lineal CCD es el modelo USB 4000 Miniature Fiber Optic Spectrometer de la empresa Ocean Optics que utiliza el detector Toshiba TCD1304AP de 3648 píxeles [5]. Los arreglos lineales CCD se caracterizan por tener una sensibilidad relativamente mayor que los arreglos lineales de fotodiodos.

Los arreglos bidimensionales CCD tienen un principio de funcionamiento análogo a los lineales y han sido utilizados con fines de metrología, por ejemplo para la determinación del perfil tanto de haces no ópticos [6] como ópticos [7]. En estos casos se hace necesario hacer un proceso de obtención del promedio y suavizado de los datos obtenidos. Son pocas las referencias donde se utilizan estos dispositivos con aplicaciones en la espectrometría [8]. En este Capítulo se aborda la implementación de un espectrómetro de

reflexión difusa utilizando como detector una cámara CCD analógica monocromática convencionalmente usada para aplicaciones de imagen y video.

4.2 ARREGLO EXPERIMENTAL PROPUESTO

El arreglo experimental propuesto se muestra en la Figura 4.1. El mismo está constituido por el conjunto monocromador- cámara CCD (1) que es el núcleo del espectrofotómetro, la fuente de iluminación (2), la sonda de fibra óptica (3) y el computador (4) que incluye la tarjeta de adquisición de imágenes y los programas de computo necesarios para el trabajo del sistema.

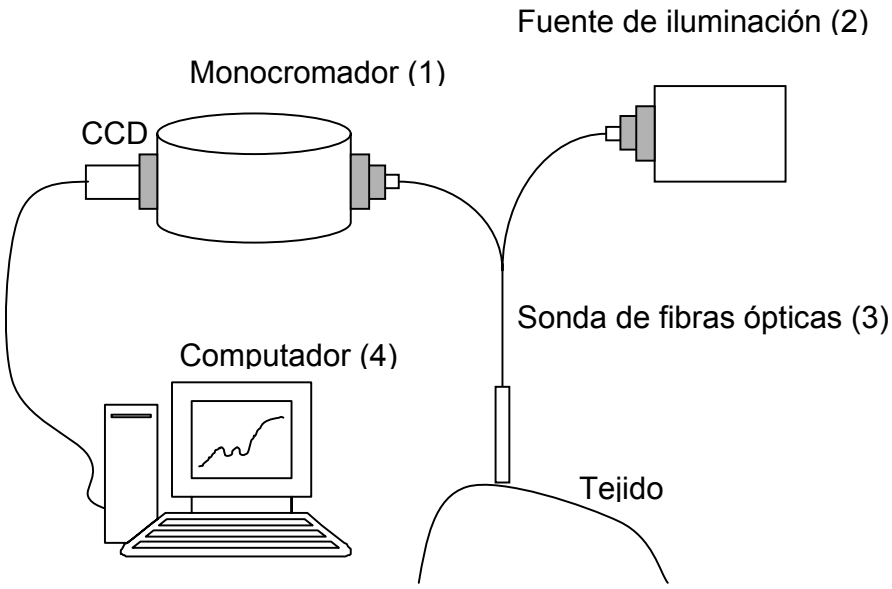


Figura 4.1. Representación esquemática del arreglo experimental implementado. Se aprecia la sonda de fibras ópticas acoplada a la fuente de iluminación 2 y a la ranura de entrada del monocromador 1 respectivamente. La salida de la cámara CCD se conecta al computador. El extremo izquierdo de la sonda es de una sola fibra, mientras que el extremo derecho tiene 6 fibras para la iluminación del tejido en estudio.

Como monocromador hemos utilizado el modelo SPM-1 (Carl Zeiss) que usa como elemento dispersor un prisma de base 6.3 cm y altura 5 cm. A la salida de este monocromador hemos colocado la cámara CCD monocromo (Sony XC-ST70). El esquema óptico de este arreglo se presenta en la Figura 4.2. La radiación óptica que incide en el plano de la rendija de entrada S del monocromador se colima por medio del espejo esférico M_1 y se dirige hacia el espejo plano M_p donde vuelve a reflejarse incidiendo sobre una cara del prisma P. Éste dispersa la radiación en sus componentes espectrales disponiéndose así de múltiples haces paralelos y monocromáticos que inciden sobre el espejo esférico M_2 el cual enfoca cada uno de estos haces en el plano de salida del monocromador. Precisamente en este plano es donde se coloca el detector de la cámara CCD de manera que existirá una correspondencia única entre la longitud de onda incidente y el número del píxel del CCD donde se alcanza el máximo del nivel de intensidad. Este es el principio básico de calibración y toma de espectros del sistema propuesto.

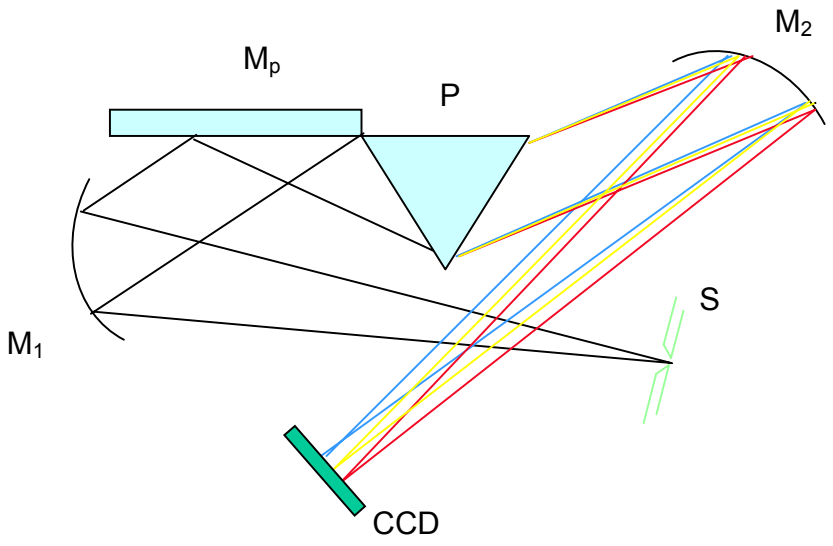


Figura 4.2. Esquema óptico del monocromador y su acoplamiento con la cámara CCD. La cámara CCD se coloca en el plano de enfoque del espejo M_2. Esto permite un registro instantáneo del espectro de la fuente luminosa que se analiza.

En la Figura 4.3 se muestra una fotografía digital del arreglo experimental propuesto en su primera versión.

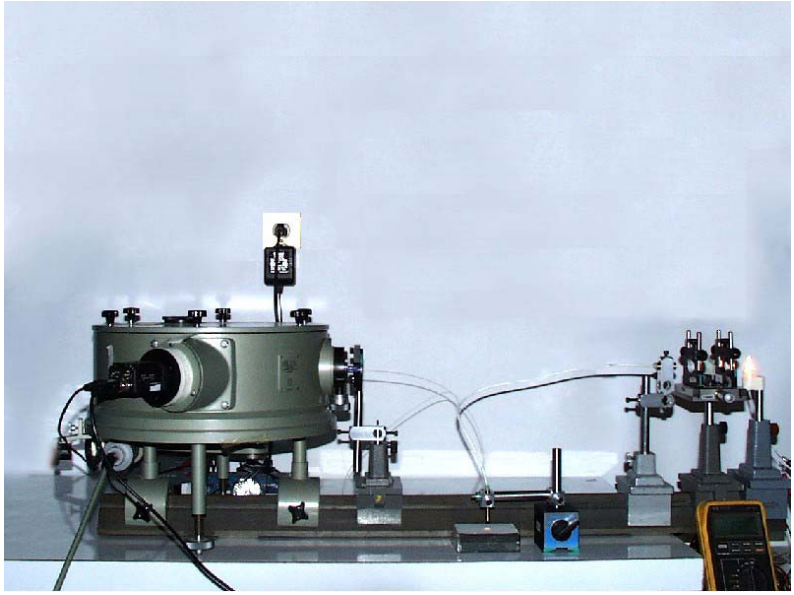


Figura 4.3. Fotografía digital del arreglo experimental propuesto. Esta es la primera versión del arreglo propuesto. Nótese la diferencia del arreglo de fibras ópticas en esta foto con respecto al arreglo final de fibras ópticas que se presenta en la Figura 4.4.

4.2.1 Fuente de Iluminación

La fuente de iluminación fue diseñada y construida específicamente para esta aplicación. Está constituida por una lámpara halógeno de 50 W, un sistema de lentes relay y un filtro para eliminar la componente espectral de la radiación en la zona infrarroja del espectro (por encima de los 800 nm). Las lentes plano convexas del sistema relay se construyeron con vidrio BK7, con un diámetro y una distancia focal 25.0 y 30.0 mm, respectivamente. El filtro fue diseñado con nueve capas de MgF_2 y ZnS para dejar pasar la banda espectral de 400 a 700 nm con una transmitancia del 85% aproximadamente. Este filtro se coloca en la trayectoria de los haces paralelos en el sistema de lentes. Todo el sistema óptico está contenido dentro de un mueble metálico

que lo aísla y protege del exterior a la vez que minimiza los inconvenientes de la luz esparcida. La energía luminosa del filamento de la lámpara se acopla al extremo de iluminación de la sonda de reflexión mediante un puerto óptico de acoplamiento que esta integrado a una de las paredes del mueble metálico.

4.2.2 Sonda de Fibras Ópticas

Se diseñó y construyó un prototipo de sonda óptica para la medición de la reflexión difusa de la piel. Esta sonda esta formada por 7 fibras ópticas plásticas de 1mm de diámetro cada una, que se disponen en forma de un arreglo bifurcado (Eska® Acrylic, unjacket communication grade fiber strand, U02-544, Edmund Scientific). En un extremo común coexisten las 7 fibras de modo que la fibra central recolecta la luz difusa reflejada por el tejido, mientras que la luz de iluminación se suministra mediante las restantes 6 fibras dispuestas circularmente alrededor de la fibra central. Los otros dos extremos contienen 1 y 6 fibras respectivamente. El extremo con una sola fibra se acopla a la ranura de entrada del monocromador y el extremo de 6 fibras se acopla al puerto óptico de la fuente de iluminación. En este puerto se desplaza el casquillo de la fibra óptica buscando el punto de enfoque hasta que sea máxima la potencia de salida en el extremo común de la sonda. En la Figura 4.4 se muestra una fotografía digital de la versión final de la sonda de fibras ópticas descrita anteriormente.

.

Figura 4.4. Fotografía digital de la versión final de la sonda de fibras ópticas diseñada y construida para el espectrómetro implementado.

4.2.3 Calibración Espectral, Resolución y Medición

Para la automatización del espectrómetro se desarrollaron tres programas en Mathcad professional 2001 que se nombran a continuación:

***Cal-Lambda*.mcd** que se utiliza para realizar la calibración espectral por Longitudes de onda,

***Resol-Espectral*.mcd** que se emplea para la visualización gráfica de la resolución del instrumento y

***Espectro Reflexión-Relativo*.mcd** muestra el espectro de reflexión de la piel relativo a un patrón de reflexión.

A continuación se explica como trabaja cada uno de estos programas y se presentan los resultados obtenidos durante su aplicación.

Calibración espectral por longitudes de onda

La calibración por longitudes de onda es un procedimiento obligatorio para la utilización adecuada del espectrómetro [9]. Este proceso tiene como objetivo asignarle a cada píxel de la cámara CCD una longitud de onda específica. Para su realización utilizamos como fuente de calibración una lámpara halógeno filtrada mediante un monocromador de red de difracción (modelo 77400, Oriel, Co). La longitud de onda de la radiación óptica que incide sobre el arreglo de CCD se establece por medio de un tornillo micrométrico incorporado al monocromador para este fin. La calibración se realizó para el intervalo espectral de 520 a 700 nm con incrementos de 10 nm en la longitud de onda (19 puntos experimentales). La radiación óptica se lleva hasta la ranura de entrada del espectrómetro colocando el extremo común de la sonda a la salida del monocromador de calibración y manteniendo el extremo izquierdo de la sonda en su posición normal de trabajo como en la Figura 4.1. Para la calibración se estableció un ancho de la ranura de entrada del espectrofotómetro de 100 μm.

A través de la tarjeta de interfase IMAQ PCI-1411 y mediante el programa NI-IMAQ (National Instruments) se registra la imagen de la ranura formada sobre el CCD en un archivo que se nombra en correspondencia con la longitud de onda establecida en el monocromador. Posteriormente mediante el software ***Cal-Lambda*.mcd** desarrollado en MathCad 2001 se lee cada una de las 19 imágenes de calibración para obtener el número del píxel **p** en el cual se obtiene el máximo de la distribución de intensidad producido por la radiación monocromática de longitud de onda **λ**. En una segunda etapa de este programa se realiza el ajuste de los pares de valores experimentales número del píxel y longitud de onda mediante un polinomio de grado tres. La finalidad de este ajuste es escribir una expresión para la longitud de onda en términos del número del píxel **p** que será utilizada posteriormente para todo los registros de espectros. La expresión así hallada es asignada al eje

horizontal en cada gráfico espectral mostrado en el ambiente del programa desarrollado. Además se muestra una tabla resumen que incluye los siguientes parámetros: longitud de onda establecida, número del píxel donde se alcanza el máximo de intensidad, longitud de onda calculada según el polinomio de ajuste y diferencia entre la longitud de onda calculada y la establecida, para ver una tabla de una calibración típica véase el apéndice C. Los resultados de la calibración atendiendo al procedimiento descrito anteriormente se presentan a continuación. En la Figura 4.5 se muestra la dependencia funcional entre la longitud de onda y el número del píxel de la cámara CCD. Como se aprecia esta dependencia no es lineal, obteniéndose un ajuste aceptable con un polinomio de orden tres para la aplicación que nos interesa resolver. La diferencia mayor entre la longitud de onda establecida y la calculada mediante el ajuste es de –1.30 nm y se obtuvo para **λ** = 640 nm. Los resultados estadísticos del ajuste **λ** vs **p** se presentan en la Tabla 4.1.

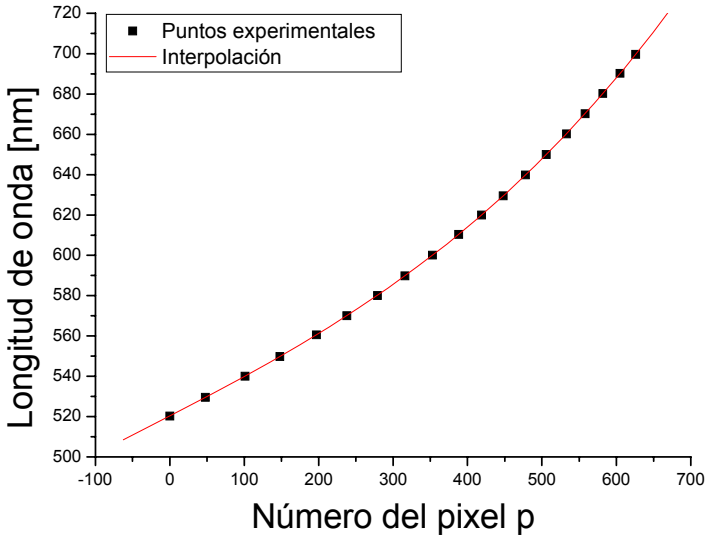


Figura 4.5. Resultado típico de la dependencia de la longitud de onda λ y el número del píxel del arreglo CCD durante el proceso de calibración espectral del espectrómetro. Note que la dependencia es apreciablemente no lineal.

TABLA 4.1. Valores típicos de los parámetros para la regresión polinómica de grado tres de la dependencia de la longitud de onda λ y el número del píxel p. Es importante notar que el coeficiente R^2 es igual a la unidad para esta calibración.

Regresión polinómica para la interpolación: λ = a + a1*p + a2*p^2 + a3*p^3			
Parámetros	**Valor**	**Error**	
a	519.14737	0.38551	
a1	0.18421	0.00511	
a2	4.73536E-5	1.84116E-5	
a3	1.80533E-7	1.86685E-8	
R^2	**SD**	**N**	**P**
0.99995	0.43816	19	<0.0001

Visualización gráfica de la resolución del instrumento.

Para esta parte se emplea el programa ***Resol-Espectral*.mcd ,** que hace uso del programa ***Cal-Lambda*.mcd** en la primera parte de sus cálculos para asignar al eje horizontal de los gráficos los valores de la longitud de onda calculada según el ajuste por el polinomio de orden tres.

***Resol-Espectral*.mcd** grafica el perfil de intensidad para longitudes de ondas próximas entre si. El perfil de intensidades se obtiene por este programa al leer de ficheros con extensión *.bmp* la distribución de intensidades correspondiente a la imagen tomada para una longitud de onda específica establecida en el monocromador de calibración. Para explorar como es la resolución en el intervalo espectral completo del instrumento se establecieron tres longitudes de onda representativas para el inicio, parte media y final del intervalo de trabajo. Las longitudes de onda seleccionadas fueron: 532 nm, 602 nm, 692 nm. Para cada una de las longitudes ondas anteriores se escogieron dos longitudes de ondas próximas, una menor y otra mayor en la cantidad de 2 nm y 3 nm respectivamente. Así, resultan los siguientes grupos de líneas espectrales: 530, 532, 535 nm ; 600, 602, 605nm; y 690, 692, 695 nm. Utilizando el monocromador de calibración mencionado en el epígrafe

anterior se establecieron cada una de estas líneas y simultáneamente se capturó la imagen correspondiente mediante el sistema de adquisición de imágenes. Por medio del programa ***Resol-Espectral.*****mcd** se procesa la distribución espectral de cada grupo de líneas y se presenta en tres gráficos por separado, cada uno correspondiente al grupo de líneas definido anteriormente.

En la Figura 4.6 se muestran los resultados del perfil de intensidad para los tres grupos de líneas espectrales definidos anteriormente.

Se aprecia un solapamiento de los perfiles espectrales en la medida que la longitud de onda central aumenta, por lo que la resolución disminuye según se avanza de la Figura 4.6 (a) a la Figura 4.6 (c). Como se puede observar en la Figura 4.6 (a) todas las líneas espectrales están fácilmente resueltas y no se aprecia solapamiento. En la Figura 4.6 (c) sin embargo los perfiles para las líneas que se diferencian 2 nm se solapan parcialmente a diferencia del resultado anterior. Se puede apreciar que para una diferencia de 3 nm (perfiles para 692 nm y 695 nm) las curvas también pueden resolverse.

De forma general se aprecia una disminución del poder de resolución del instrumento con el aumento de la longitud de onda. Esto está dado por la forma en que se determina el poder de resolución de un monocromador de prisma, que resulta ser proporcional a la derivada del índice de refracción respecto a la longitud de onda y esta derivada generalmente disminuye con el aumento de la longitud de onda.

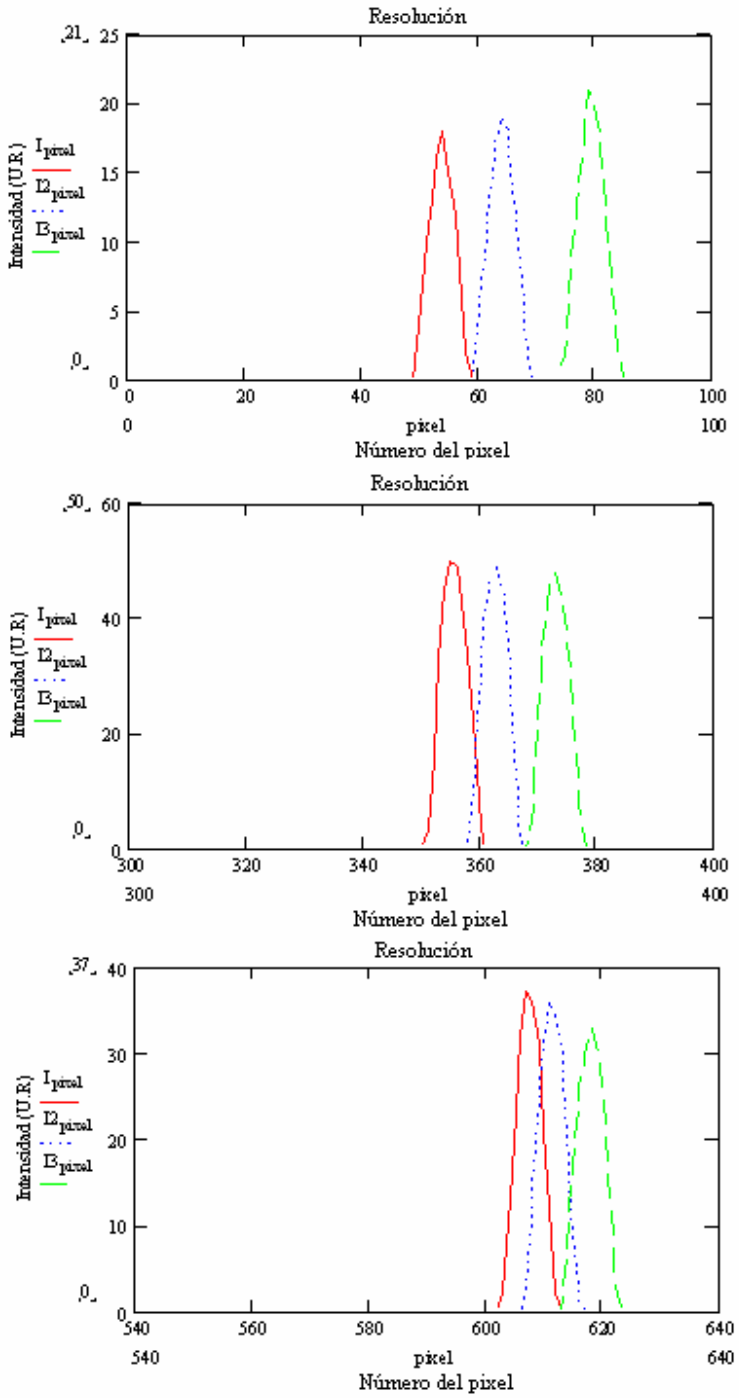


Figura 4.6. a, b y c. Perfil de intensidades para grupos de líneas espectrales centradas en 532 nm, 602 nm y 692 nm respectivamente. Se aprecia la disminución del poder de resolución con el aumento de la longitud de onda.

Espectro de reflexión difusa

Aquí se utiliza el programa ***Espectro Reflexión-Relativo*.mcd.** Se realiza la captura de la imagen correspondiente a la reflexión de la luz sobre un patrón de reflexión difusa y se guarda en un archivo con extensión *.bmp* con el nombre patrón blanco. De igual manera se procede para el patrón negro y los sitios de interés de la piel en estudio. De manera que se cuenta por ejemplo con los archivos siguientes: *patrón blanco, patrón negro, pielsitio1* y, *pielsitio2.* Una vez capturadas estas imágenes son leídas y procesadas por el programa ***Espectro Reflexión-Relativo*.mcd** que muestra un gráfico donde en el eje vertical aparece la reflectancia difusa de la muestra relativa al patrón y en eje horizontal la longitud de onda.

4.3 PRUEBAS AL ESPECTRÓMETRO

4.3.1 Medición de una Fuente Halógena Filtrada

Con el objetivo de hacer algunas comprobaciones del funcionamiento correcto del espectrómetro se procedió a determinar la salida espectral que producía el instrumento cuando era analizada una fuente de luz con espectro de emisión relativamente conocido. Para esto se utilizó el espectro de una lámpara de halógeno de 50 W de consumo eléctrico modificado mediante un filtro de interferencia. Para simular fuentes con emisión en sectores específicos del intervalo espectral se emplearon varios filtros de interferencia que se listan a continuación atendiendo a la longitud de onda de máxima transmisión: 546 nm, 550 nm, 589 nm, 610 nm, 632 nm, 640 nm, 671 nm y 680 nm. En la Figura 4.7 se muestra el resultado de los espectros registrados para la situación descrita anteriormente.

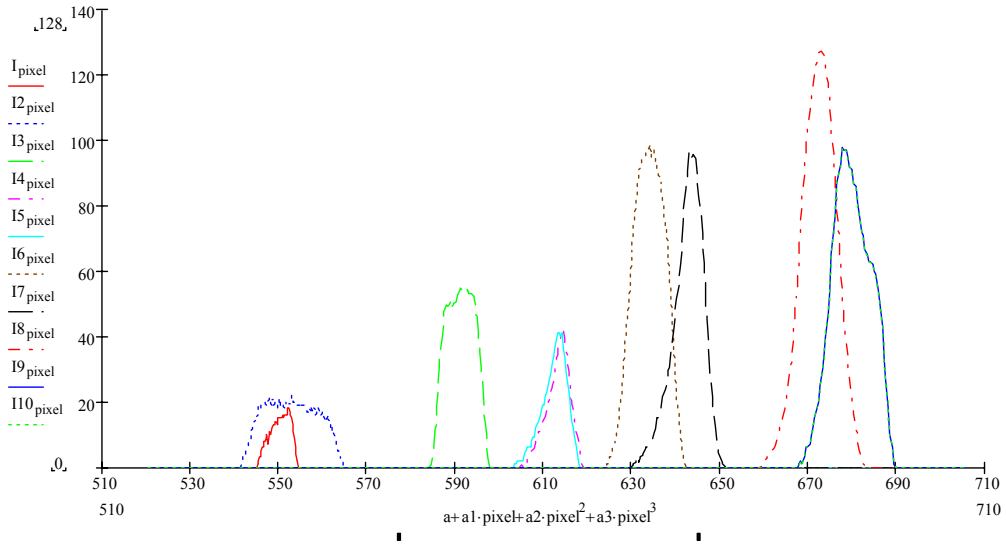


Figura 4.7. Espectros registrados por el espectrómetro cuando se modifica la salida espectral de una lámpara de halógeno mediante 8 filtros de interferencia diferentes que son colocados independientemente para cubrir el intervalo espectral del instrumento.

4.3.2 Medición de la piel de voluntarios sanos

Para examinar el desempeño del espectrómetro implementado se pidió la colaboración voluntaria a tres estudiantes del INAOE para realizar la medición del espectro de reflexión en dos sitios corporales diferentes. Los sitios escogidos, por su diferente grado de pigmentación, fueron la cara interna y externa de la parte superior del brazo izquierdo. Además, entre dos de los voluntarios, se comparó el espectro de reflexión en la palma de la mano izquierda. El resultado de esta última medición se muestra en la Figura 4.8.

En la Figura 4.8 (superior) se muestra las curvas de los espectros adquiridos para el patrón de referencia, la palma de la mano del voluntario 1 y del voluntario 2. Los dos voluntarios son de piel blanca, aunque el voluntario 1 es de piel ligeramente más clara que el voluntario 2. En la Figura 4.8 (inferior) se muestran los espectros de reflexión difusa una vez procesados mediante el programa ***Espectro Reflexión-Relativo*.mcd**. Se aprecia que el

espectrómetro es capaz de determinar la característica espectral correspondiente a la presencia de la sangre, pues claramente se muestra el llamado patrón ”W” asociado con los dos picos de absorción de la oxihemoglobina. Además, de acuerdo con el sentido común, la piel más clara tiene un espectro de reflexión más alto que la piel menos clara.

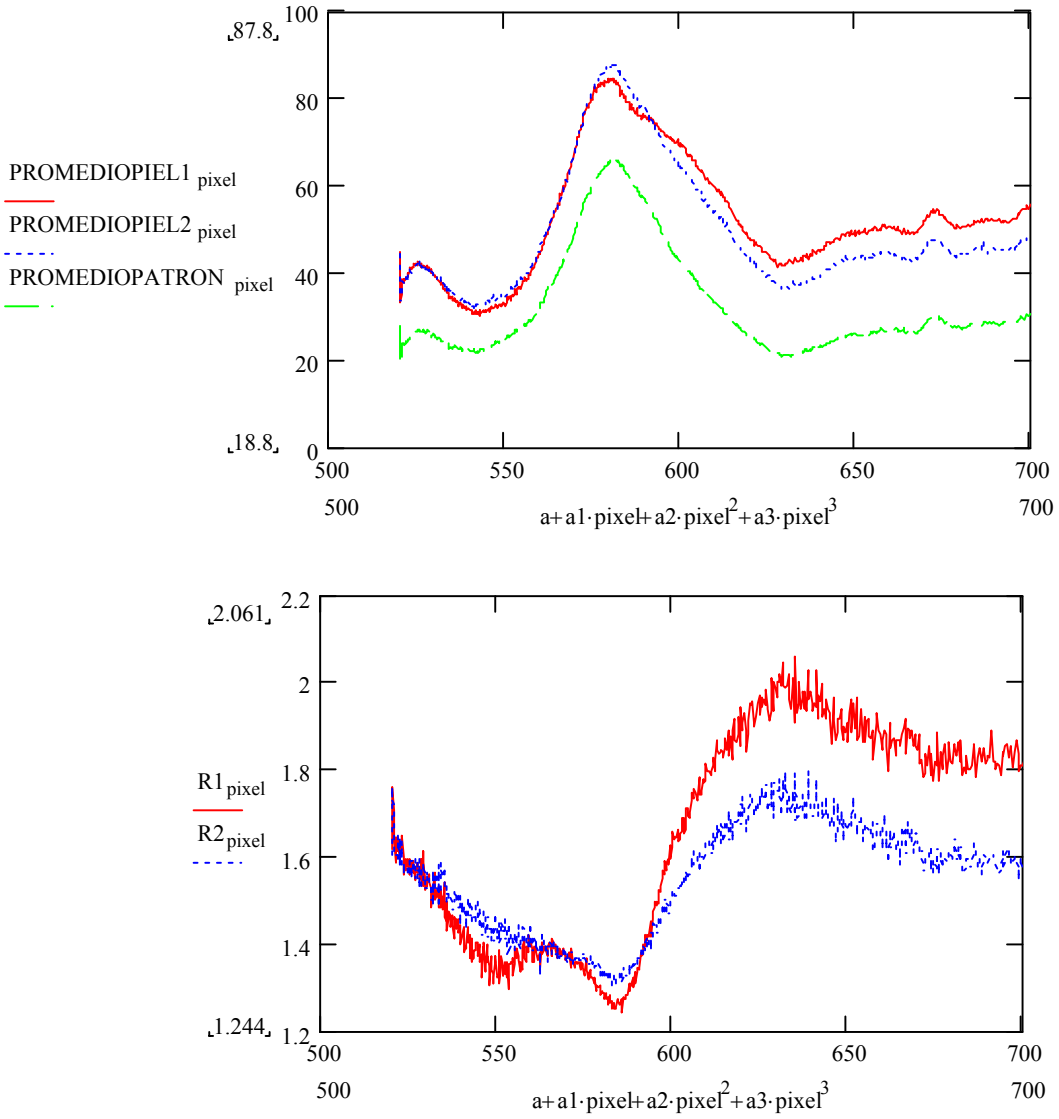


Figura 4.8. Espectro de reflexión tomado en la palma de la mano de dos voluntarios de piel blanca: **Superior**, espectros sin procesar; **Inferior**, espectros procesados donde R1 y R2 son los espectros correspondientes a los voluntarios 1 y 2, respectivamente.

En la Figura 4.9 se muestra la comparación del espectro de reflexión difusa de un voluntario de piel morena para los dos sitios corporales descritos anteriormente. De esta figura se aprecia que el espectrómetro diferencia adecuadamente la cara interna del brazo de la cara externa. Además se observa ligeramente la presencia de valles en el espectro de reflexión correspondientes a los picos de absorción de la oxihemoglobina de la sangre. En el apéndice C se presentan los gráficos correspondientes a los otros dos voluntarios que son de piel blanca.

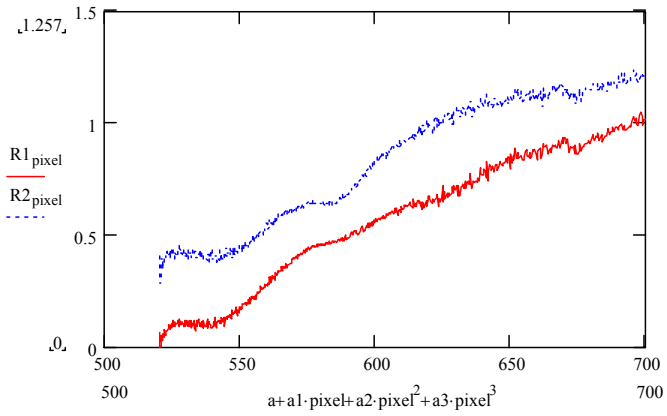


Figura 4.9. Espectro de reflexión para dos sitios corporales diferentes de un voluntario de piel morena. R1 y R2 representan la cara interna y externa del brazo respectivamente.

4.4 CONCLUSIONES

Es importante comentar que el procedimiento de calibración empleado resulta en cierta forma tedioso, pues requiere de manipular el tornillo micrométrico del monocromador de calibración tantas veces como longitudes de onda de calibración se utilizan en el intervalo espectral establecido. Además, lo anterior está acompañado de la captura de la imagen correspondiente en el CCD. Este proceso sería prácticamente instantáneo si

dispusiéramos de una lámpara de calibración espectral, con la cual se obtendría una sola imagen de calibración.

Se desarrolló una sonda de fibras ópticas para llevar a cabo la medición del de la reflexión difusa, así como la fuente de iluminación del espectrómetro

La automatización se soporta en dos programas: a) el propio de la cámara CCD para la adquisición de imágenes y b) uno desarrollado en Mathcad Professional 2001 para la calibración espectral por longitud de onda y para la adquisición de espectros de reflexión difusa.

La resolución alcanzada es aceptable para la aplicación que tratamos: medición del espectro de reflexión difusa de la piel humana.

Se ha implementado un espectrómetro calibrado por longitud de onda que cubre un intervalo espectral de 180 nm.

REFERENCIAS

[1] L.T. Norvan et al, “Comparison Between Reflectance Spectra Obtained with an Integrating Sphere and a Fiber-Optic Collection System.” *SPIE* Vol 2624, 155-164 (1996).

[2] Utzinger,U y R.R. Richards-Kortum, “Fiber Optic Probes for Biomedical Optical Spectroscopy.” Journal of Biomedical Optics Vol.8, No. 1, 121-147 (2003).

[3] P.R. Bargo, “Collection Efficiency of a Single Optical fiber in Turbid Media for Reflectance Spectroscopy.” Applied Optics Vol.42, 3187-3197 (2003).

[4] http://www.jeti.com/down/basics/basics2.pdf. “Chapter 2 Line Arrays for Miniaturized Spectrometers.” Accesado el 5 de Julio de 2006.

[5] http://www.oceanoptics.com/products/usb4000.asp USB4000 Miniature Fiber Optic Spectrometer. Accesado el 5 de Julio de 2006.

[6] S.H. Hans et al “Beam Profile Measurement with CCD Camera at PEFP.” del Proceedings of APAC 2004, Gyeongju, Korea.

[7] Y.A. Alsultanny “Laser Beam Analysis Using Image Processing” Journal of Computer Science Vol.8, No. 1, 109-113 (2006).

[8] K.H. Elliott et al “The use of commercial CCD cameras as linear detectors in the physics undergraduate teaching laboratory.” Resumen del artículo publicado en : Eur. J. Phys Vol.19 No, Y 107-117 (1998).

[9] http://www.coseti.org/pc2000_2.htm “Calibrating the Wavelength of the Spectrometer.”. Ocean Optics, Inc accesado 10 marzo 2004.

Capítulo 5

Estudios Experimentales

''...absence of evidence is not evidence of absence ''

Carl Sagan

En este Capítulo se describen dos estudios experimentales llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis, los cuales se realizaron con objetivos complementarios, utilizando dos variantes experimentales diferentes. El primero se enfoca al análisis de la factibilidad del empleo del espectrofotómetro comercial CM2S (Color Savvy, Color Mouse Too! Instrumentation) para realizar mediciones comparativas *in-vivo* del espectro de reflexión difusa de lesiones de la piel y zonas sanas circundantes en pacientes y personal voluntario. El segundo estudio se lleva a cabo utilizando un espectrómetro comercial de fibra óptica (USB 4000, Ocean Optics) que opera en la zona visible e infrarroja cercana del espectro electromagnético. El objetivo aquí es evaluar este espectrómetro y sus aditamentos en la medición *in-vivo* del espectro de reflexión difusa de la piel en sitios corporales diferentes de voluntarios de nuestra institución. Este estudio servirá de referencia para uno más completo que se realizará en pacientes que asisten al servicio de consulta externa de cáncer de piel del Hospital Universitario de Puebla.

5.1 DESEMPEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO CM2S EN LA MEDICIÓN DE LA REFLEXIÓN DIFUSA ESPECTRAL DE LA PIEL HUMANA.

5.1.1 Introducción

Aproximadamente del 5 al 7% de la luz que incide sobre la piel humana se refleja de forma especular [1]. La luz que entra a la piel sufre múltiples eventos de esparcimiento y absorción debido a la presencia de varios centros de esparcimiento y pigmentos en las capas que forman a este órgano. Los fotones que finalmente escapan por la frontera aire-piel contribuyen al espectro de reflexión difusa.

Para medir la reflexión difusa de la luz por la piel humana se han empleado varios esquemas de instalaciones experimentales. Para aplicación en ambiente clínico la más cómoda por su facilidad de empleo es la basada en el uso de fibras ópticas, donde generalmente una sonda de fibras ópticas con forma de ‘’Y’’ transporta la luz de iluminación hasta la muestra o tejido *in-vivo* y a la vez recoge una fracción de la reflectancia difusa verdadera [2, 3]. Otra aproximación menos flexible pero muy precisa se obtiene empleando la técnica de esfera integradora [4].

En el momento de iniciar los estudios experimentales de medición de la reflexión difusa de la piel humana no contábamos con ninguna de las aproximaciones instrumentales anteriores sino con el espectrofotómetro comercial CM2S [5]. Este espectrofotómetro está destinado originalmente para satisfacer los requerimientos crecientes del control del color en el campo de aplicación de imágenes digitales, y para su correcta aplicación se requiere que las muestras sean completamente planas y estén colocadas sobre un revestimiento negro. Esta condición es difícil de garantizar durante la medición *in-vivo* de la piel humana. Es por esta razón que iniciamos este estudio para evaluar la factibilidad de empleo del espectrofotómetro

comercial CM2S para medir la reflexión difusa espectral de la piel humana o su uso para comparaciones en tejidos sanos y enfermos

El método utilizado en esta investigación radica en el uso de la aproximación analítica que es utilizada con frecuencia en la óptica biomédica para extraer información de los tejidos a partir de los espectros medidos [6]. Empleamos en este caso una variante simplificada de esta aproximación, que consiste en conocer cuáles de las características principales del tejido explican la diferencia entre los espectros tomados en los dos sitios de interés seleccionados o en sitios corporales con diferente exposición a agentes externos o internos. Se aplicó este método a tres situaciones de interés práctico:

1) Reflectancia para diferentes tipos de piel.

2) Reflectancia de sitios corporales sanos con diferente grado de exposición a la radiación solar.

3) Reflectancia de un tipo de lesión (queratosis seborreica) y de la piel sana circundante.

Además verificamos inicialmente el espectrofotómetro con muestras que cumplen con los requerimientos de la aplicación original del equipo, así como en voluntarios sanos con un grado de pigmentación ligeramente diferente.

5.1.2 Materiales y Métodos

Mediciones de la reflectancia espectral

Las mediciones espectrales se realizaron con un espectrofotómetro CM2S (serie Color Mouse Too!™ Instrumentation, basado en una patente de la firma Color Savvy) que garantiza las mediciones de reflectancia espectral difusa en el intervalo 400-700 nm con incrementos de 10 nm en la longitud de onda [5]. Este espectrofotómetro es un instrumento de doble haz; un fotodetector mide la luz de los LEDs y el otro mide la luz difusa reflejada

sobre la muestra que se analiza [7].

En la Figura 5.1 se muestra una fotografía digital del arreglo experimental utilizado con el espectrómetro CMS2 para los estudios de reflectancia en voluntarios y pacientes. La salida del espectrofotómetro se acopló a una computadora laptop con un software comercial instalado que garantiza la calibración del instrumento y la posterior medición de las muestras patrones y tejidos. Los datos se transfirieron durante la medición a una hoja de trabajo de Microcal Origin 6.0 para ser almacenados, procesados y graficados. Las mediciones se llevaron a cabo en un ambiente luminoso controlado de manera que su influencia fuera despreciable. La medición en cada zona corporal se realizó 3 veces para propósitos estadísticos, limitándonos a este número, ya que preferimos minimizar el tiempo extra del paciente en la consulta debido a nuestro estudio.

Figura 5.1. Arreglo experimental típico empleado para realizar los estudios de la reflectancia con el espectrómetro CM2S.

Muestras

Para evaluar el comportamiento del espectrofotómetro con muestras que cumplen los requerimientos de su designación original se midió el espectro

de reflexión difusa de dos cuadros patrones de la piel (dark skin y light skin), que forman parte del cuadro de patrones de color ColorCheker® (Edmund Scientific), el cual está destinado para comparar, medir y analizar diferencias en la reproducción del color en varios procesos. En este caso se colocó el área de medición del instrumento directamente sobre cada cuadro patrón y se oprimió suavemente el botón de medición.

Voluntarios y pacientes

Las mediciones *in-vivo* se realizaron sobre la piel de dos grupos de personas reclutadas voluntariamente para el estudio. Estas personas fueron informadas del propósito del estudio y de la inocuidad de la radiación óptica a la cual estaban expuestos y finalmente accedieron a participar en el mismo. El primer grupo estuvo formado por 4 voluntarios sanos del Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE). Para ellos la zona corporal medida fue la parte media de la cara interna del antebrazo izquierdo. En este caso también se colocó el área de medición del instrumento directamente sobre la zona de la piel referida y se oprimió suavemente el botón de medición garantizando además una mínima presión aplicada a la piel.

El segundo grupo incluyó los pacientes del Hospital Oncológico Nacional (INOR) de Cuba que asistían al servicio médico de la consulta de tumores periféricos para una visita de seguimiento. Se colocó una lámina de vidrio cubre objeto (espesor de 130 a 170μm) entre el área de la piel a medir y la punta detectora del espectrofotómetro. Similarmente se colocó la zona de medición en contacto con el vidrio y se oprimió suavemente el botón de medición a la vez que se garantizaba que la presión aplicada fuera mínima.

La clasificación de la piel de los pacientes se realizó por un médico especialista en dermatología de acuerdo al esquema de tipos de piel establecido por Fitzpatrick [8] que contempla seis tipos de piel (I, II, III, IV, V, VI).

5.1.3 Resultados y discusiones

La reflexión espectral medida a los patrones dark skin y light skin se muestra en la Figura 5.2. El patrón de piel oscura presenta dos depresiones en el espectro de reflectancia mientras que el patrón de piel clara sólo presenta una sola. Los valores de la reflectancia cambiaron en el intervalo de 12.20 %-17.49 % y de 44.65 %-66.85 % para los patrones ‘‘dark skin’’ y ‘‘white skin’’, respectivamente.

Es importante comentar que contrario a lo esperado, el espectro de reflexión del patrón de piel clara de la Figura 5.2 b no muestra los dos valles representativos de la presencia de sangre, lo cual implica que la muestra dark skin proporcionada por la firma Edmund Scientific no representa adecuadamente la piel humana clara, o que el espectrómetro no resuelve el llamado patrón W de la sangre. Para este patrón se encontró un valle amplio

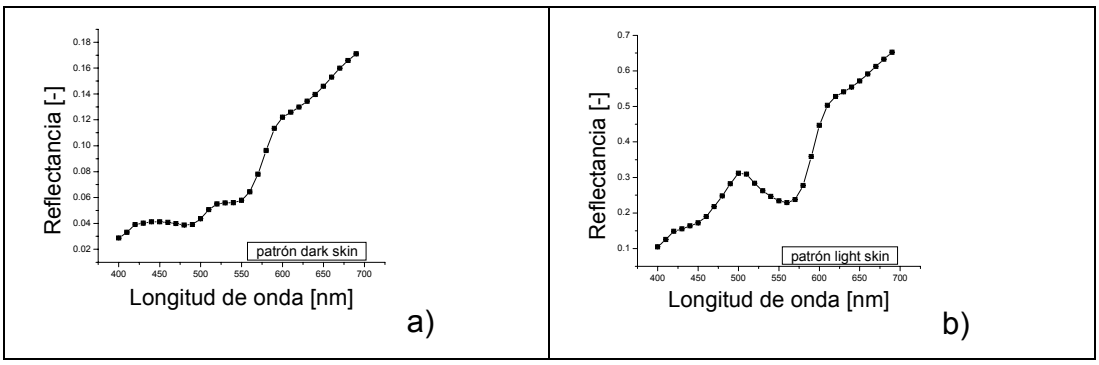


Figura 5.2. Espectros de reflectancia espectral de los dos patrones de piel humana del cuadro de patrones Color Checker a) patrón dark skin, b) patrón light skin.

en el espectro de reflexión centrado en la longitud de onda de 560 nm.

El espectro de reflexión de la piel oscura, mostrado en la Figura 5.2 a, presenta dos valles pronunciados a las longitudes de onda de 490 nm y 550 nm que tampoco se corresponden con el patrón W de la sangre.

Los resultados de la medición *in-vivo* de la reflexión difusa de la piel de los voluntarios sanos se muestran en la Figura 5.3 en el grafico de la izquierda. El tipo de piel de los voluntarios se clasificó en clara y moderadamente

pigmentada. Todos los espectros presentaron un sólo valle o depresión, centrado aproximadamente en 550 nm. El cambio del comportamiento espectral de estos espectros, respecto a la curva del patrón de piel clara a longitudes de onda superiores a 620 nm, se pudiera explicar considerando que una fracción relativamente grande de luz roja escapa del área de medición cuando la muestra es piel real, mientras que en el patrón de piel clara esto no ocurre. El mismo argumento se aplica para explicar la disminución en todos los valores de la reflectancia a lo largo del intervalo espectral medido, si tenemos en cuenta las dimensiones reducidas del área de medición del instrumento (4 mm de diámetro).

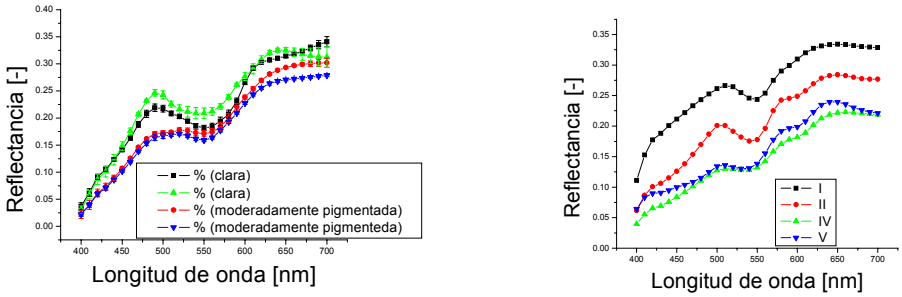
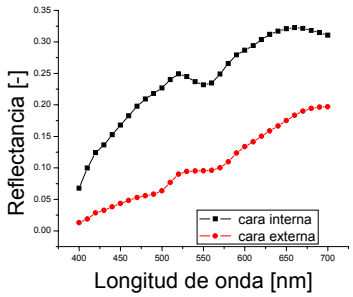


Figura 5.3. Espectros de reflectancia para zonas corporales sana en voluntarios y pacientes, izquierda) parte media del antebrazo izquierdo de voluntarios del INAOE derecha) Cara interior de la parte superior del brazo de pacientes del INOR.

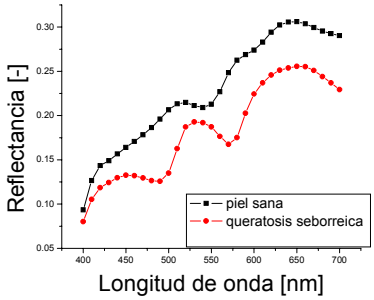
En el gráfico de la derecha en la Figura 5.3 se muestra el espectro de reflexión difusa en una zona sana (brazo: cara superior interna) para cuatro pacientes del INOR con diferentes tipos de piel (I, II, IV, V). El valor de la reflectancia decrece con el incremento del número de la clasificación de la piel. Esto es esperado pues un número mayor en la clasificación de la piel nos indica una piel más oscura. Ninguno de los resultados de la medición *in-vivo* de la reflexión difusa espectral muestra el patrón ‘’W’’ típico en el intervalo 520-600 nm asociado con la banda de absorción secundaria de la sangre, específicamente de la oxi-hemoglobina.

En la Figura 5.4 a aparece un espectro de reflexión típico para dos zonas sanas de la piel con diferente grado de exposición solar: cara interna y externa del de la parte superior del brazo. Se puede apreciar una diferencia significativa de la reflectancia difusa en toda el intervalo espectral, siendo mayor la reflectancia para la cara interna del brazo. Esto es de esperar pues generalmente existe una menor exposición a la radiación solar y con ello una menor actividad del melanocito y consiguientemente una menor producción de melanina.

En la Figura 5.4 b se muestra una comparación de la reflectancia difusa en una zona con queratosis seborreica y la piel sana adyacente.



a



b

Figura 5.4. Comparación del espectro de reflectancia en pacientes del INOR a) Zonas sanas con diferente grado de exposición solar b) Piel sana y lesión (queratosis seborreica).

5.1.4 Conclusiones

Las mediciones *in-vivo* de la reflectancia espectral presentan, en general, valores inferiores con relación al espectro de reflexión del patrón ‘‘white skin’’ en todo el intervalo espectral. Esto es consecuencia de que la piel real no cumple las condiciones de las muestras a utilizar con este espectrofotómetro. Además contribuye a este efecto las dimensiones reducidas de la zona de medición del espectrofotómetro en comparación con la profundidad de penetración óptica de la luz, especialmente para la longitud de onda del rojo donde se enfatiza más el efecto de disminución de la reflectancia medida.

Es espectrofotómetro no reproduce el patrón característico ‘’W’’ relacionado con la absorción de la sangre, por lo que para estudios del contenido de esta no es apropiado. Sin embargo, los estudios entre zonas con diferente grado de pigmentación (incluido los diferentes tipos de piel) y zonas lesionadas y sanas nos permiten concluir que puede ser utilizado para estudios comparativos de la reflexión difusa.

5.2 EVALUACIÓN DEL ESPECTRÓMETRO COMERCIAL USB 4000 EN LA MEDICIÓN DEL ESPECTRO DE REFLEXIÓN DIFUSA EN HUMANOS

5.2.1 Introducción

Este estudio tiene por objetivo evaluar el desempeño del espectrómetro comercial de fibra óptica USB4000 y su software SpectraSuite en la medición *in-vivo* del espectro de reflexión difusa de la piel humana. Sus resultados servirán de referencia para una investigación más completa que se realizará en pacientes que asisten al servicio de consulta externa de cáncer de piel del Hospital Universitario de Puebla. Las personas que participaron en este estudio lo hicieron de forma voluntaria, luego de leer cuidadosamente y firmar la forma: “Permiso de Participación en el Estudio de la Reflectancia Difusa de la Piel Humana” (ver apéndice D) elaborada para informar a los posibles participantes el objetivo y el alcance del estudio del cual podrían formar parte.

5.2.2 Materiales y Métodos

Medición del espectro de reflexión difusa

La medición del espectro de reflexión difusa se realizó con un mini espectrómetro de fibra óptica USB4000 (Ocean Optics, inc, E.U). Este

espectrómetro tiene incorporado un detector Toshiba de 3648 elementos (arreglo lineal CCD TCD1304AP). La resolución de este instrumento es de 2 nm y está determinada por la red de difracción instalada (Red de difracción #3, intervalo espectral de 650 nm), el número de elementos detectores (3648) y la resolución en pixeles (que depende de la rendija instalada) [9].

El espectrómetro Ocean Optics se seleccionó para el trabajo en el modo de barrido consecutivo, y de forma estandarizada se promediaron 20 capturas de espectros por sitio corporal. Las mediciones se repitieron cinco veces en cada sitio. El tiempo de adquisición típico fue de 6 ms. Los espectros se registraron en el intervalo espectral de 345 a 1037 nm utilizando el software SpectraSuite.

Una fotografía digital de la instalación experimental utilizada con el espectrómetro USB 4000 se muestra en la Figura 5.5.

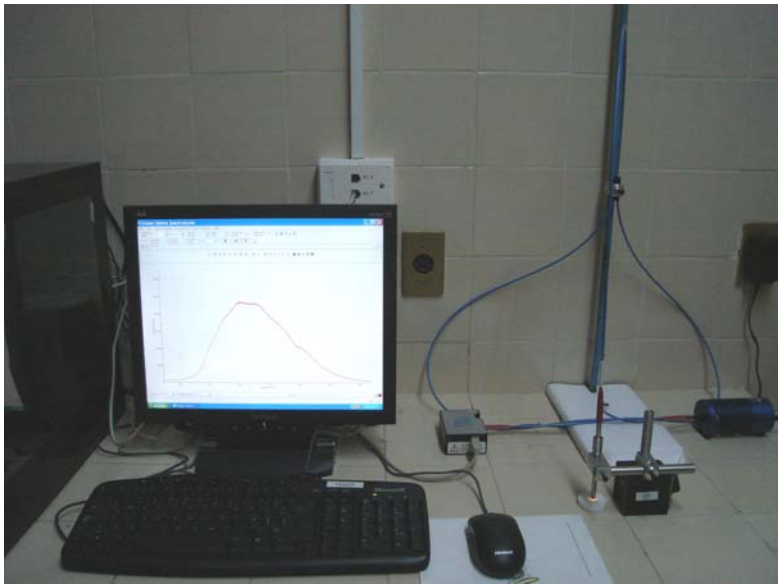


Figura 5.5. Arreglo experimental del mini espectrómetro de fibra óptica USB 4000 configurado para realizar mediciones de reflexión difusa en la piel humana.

Durante la medición se procuró colocar la sonda de fibra óptica en el mismo punto y aproximadamente con igual presión. Siempre se colocó la sonda perpendicularmente al área de medición. Todas las mediciones se realizaron

referidas a un disco de teflón de 38.2 mm de diámetro y 13.3 mm de espesor. La fuente de iluminación utilizada fue de luz blanca basada en la tecnología halógeno tungsteno (HL-2000, Ocean Optics, E.U). Las mediciones con este espectrómetro se realizaron con una sonda de reflexión de fibra óptica (R600-7-VIS/125F, Ocean Optics, E.U) constituida por 7 fibras de cuarzo fundido de 600 μm dispuestas en forma de "Y". El haz común de estas fibras esta destinado para la iluminación/detección del tejido y las dos ramas restantes se utilizan para la iluminación (6 fibras) y la detección (1 fibra) respectivamente. Se desarrolló un aditamento para colocarlo en el extremo común de las 7 fibras con vista a proteger las fibras. Este aditamento es un cilindro de acero inoxidable con un canal interior para la sonda que termina en una ventana transparente de vidrio de 150 μm de espesor.

Voluntarios

Para este estudio se reclutaron once voluntarios que hicieron patente su permiso al firmar la forma referida en la introducción de este epígrafe. Las mediciones a cada voluntario se le realizaron en dos sitios corporales aparentemente sanos: el antebrazo derecho y la frente.

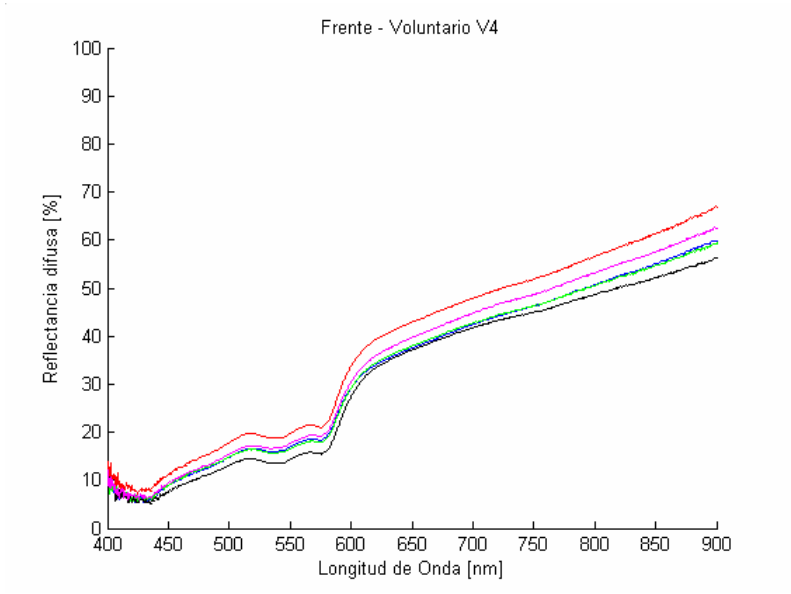
Análisis de las mediciones

Por cuestiones de simplicidad y del objetivo de este estudio, los datos espectrales se analizan mediante una variante simplificada de la conocida aproximación analítica [6] que consiste en conocer cual de las características principales del tejido explican la diferencia entre los espectros tomados en los dos sitios de interés seleccionados. La medición de los parámetros de esta característica del tejido a partir del espectro medido no es objeto de este estudio.

5.2.3 Resultados y discusiones

Una característica común, observada en las mediciones del espectro de reflexión, es la notable influencia que tiene el posicionado de la sonda en la repetibilidad de las curvas obtenidas para un mismo sitio corporal. El no control de la presión aplicada ni del ángulo entre el plano de la sonda y la piel son las causas principales de la falta de repetibilidad referida. En dos voluntarios se observó que estas diferencias se podían agudizar por la variada topología de la piel de su frente, en un caso debido a pliegues profundos y abundantes, y en el otro a una fuerte erosión de la piel en forma de acne juvenil. En general se logró una mejor repetibilidad del espectro cuando se media el antebrazo. En la Figura 5.6 se muestran los espectros que presentaron la mayor dispersión en las mediciones.

Para evitar este tipo de errores en las mediciones del espectro de reflexión difusa proponemos que para trabajos futuros se desarrollen una serie de aditamentos de posicionado de la fibra óptica sobre el tejido en estudio. Estos aditamentos están supeditados a cumplir con los requisitos que imponen el ambiente clínico y la ética médica, siempre acompañados de principios ergonómicos de diseños.



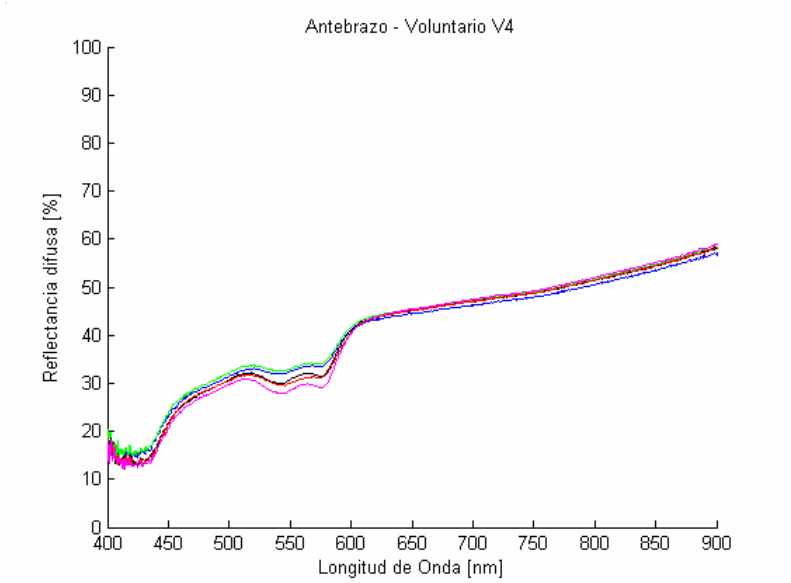


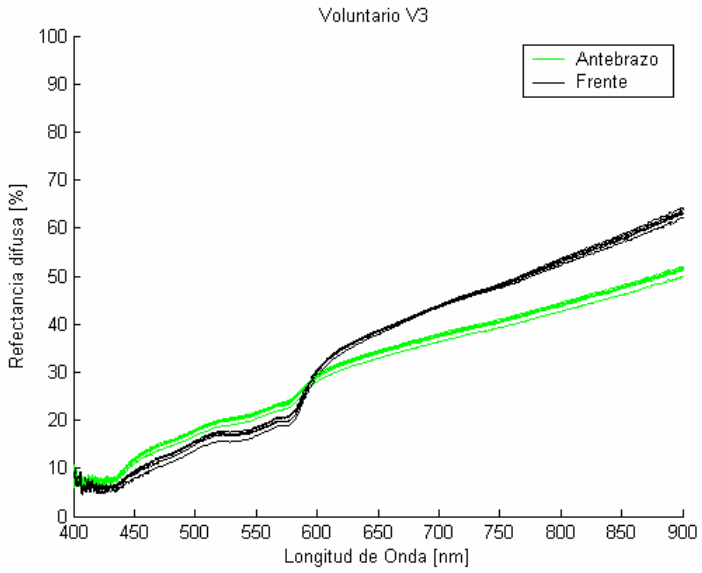
Figura 5.6. Espectros de reflexión difusa que presentaron la mayor dispersión en las mediciones **superior**) frente e **inferior**) antebrazo. Estas mediciones fueron tomadas en el voluntario V4.

Otra característica común del resultado de las mediciones es que existen diferencias bien marcadas entre los espectros correspondientes al antebrazo y la frente. Solamente en uno de once de los voluntarios esto no ocurrió así. En general las curvas espectrales, correspondientes a los dos sitios, se cruzan entre sí a una longitud de onda λc que está contenida en el intervalo de 590 a 770 nm para los once casos estudiados.

Para longitudes de onda $\lambda < \lambda c$ el espectro de reflexión difusa de la frente toma valores inferiores al del espectro en el antebrazo. La situación anterior se muestra en la Figura 5.7 para los voluntarios V3 y V7, respectivamente. Este comportamiento se pude explicar considerando que en la frente la irrigación sanguínea es superior a la del antebrazo y se produce una disminución de la luz re-emitida en toda la banda espectral de 400 a 600 nm Para longitudes de onda $\lambda > \lambda c$ se invierte la situación y el espectro de reflexión de la frente toma valores mayores que el espectro del antebrazo Esto se pudiera explicar considerando que a longitudes de onda superiores a 600 nm la influencia de la sangre sobre el espectro de reflexión es despreciable en comparación con la influencia del contenido de melanina o a la presencia del hueso frontal del cráneo.

Los resultados mostrados en la Figura 5.7 nos imponen realizar estos estudios con más precisión para determinar si el punto de cruce λc es independiente o no de los parámetros biológicos tales como: el grado de pigmentación y el contenido de sangre.

En la Figura 5.8, se presenta en el gráfico superior la reflectancia espectral del antebrazo de los voluntarios V9 (piel muy blanca), V10 (piel blanca) y V11 (piel morena), mientras que en el gráfico inferior aparecen las curvas espectrales correspondientes a la frente. Nótese que en ambos sitios corporales con el incremento del contenido de melanina se incrementa la pendiente de la curva espectral, para $\lambda > \lambda c$.



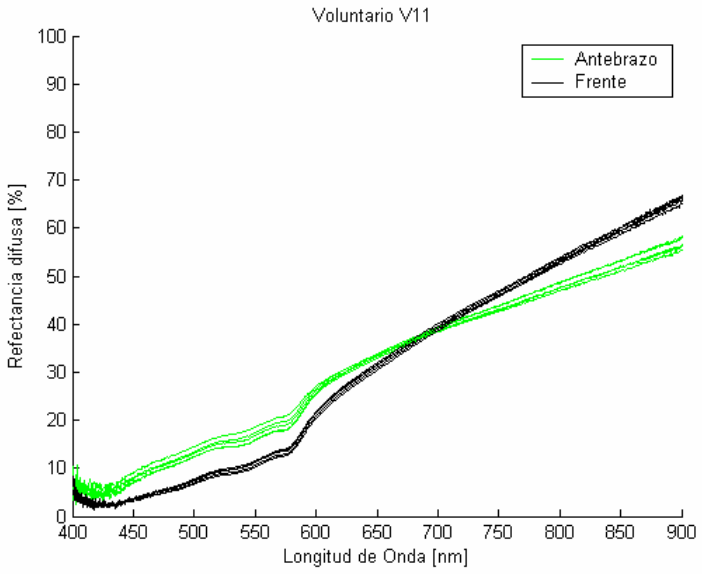
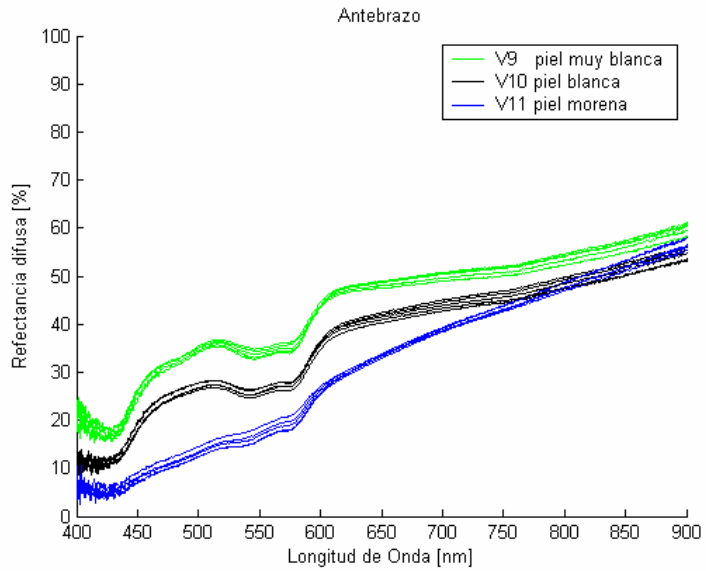


Figura 5.7. Espectros comparativos del antebrazo y la frente para dos voluntarios del estudio (V3 y V11). Se muestra la existencia de una longitud de onda de cruce λc donde se intercambia el predominio del valor de un espectro sobre el otro.



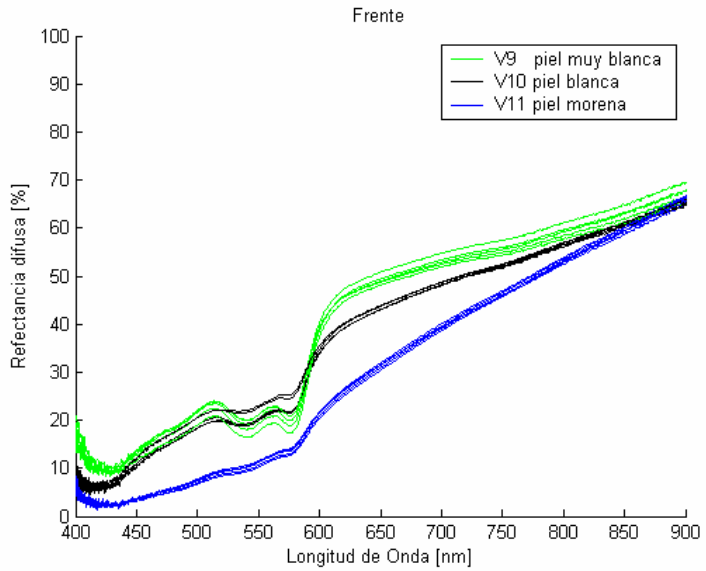


Figura 5.8. Espectros comparativos del antebrazo y la frente para tres voluntarios del estudio (V9, V10 y V11). Se muestra la existencia de una longitud de onda de cruce λc donde se intercambia el predominio del valor de un espectro sobre el otro.

5.3 CONCLUSIONES

Los estudios realizados con el espectrómetro CM2S demuestran que este instrumento no registra las características espectrales más notables de la piel humana, por lo que a partir de los espectros registrados por éste, se hace muy difícil extraer información útil (por ejemplo extraer información del contenido de sangre). Sin embargo, se verificó su factibilidad para realizar estudios comparativos de la reflexión espectral de la piel con diferente grado de pigmentación y en tejidos sanos y enfermos.

El estudio realizado con el espectrómetro USB 4000, en los once voluntarios, nos permitió adquirir información de como debe ser perfeccionado el proceso de medición para situaciones reales en un ambiente clínico. Se encontró una dependencia entre la pendiente (en el intervalo 600 nm $< \lambda <$ 900 nm) del espectro registrado y el grado de pigmentación, que cualitativamente indica que a mayor pigmentación mayor pendiente del espectro. Esta relación se cumple tanto para la frente como para el antebrazo, aunque la pendiente del espectro en el antebrazo es inferior a la pendiente del espectro en la frente, para un mismo individuo. Se elaboraron los programas de graficado de espectro usando el ambiente MATLAB® y se adquirió conocimiento del uso y manejo del espectrómetro y su software para esta aplicación.

REFERENCIAS

[1] Y.P. Sinichkin et al, En “Chapter 13 Reflectance and fluorescence Spectroscopy of Human Skin”, *in Handbook of Optical and Biomedical Diagnosis*, editado por V.V. Tuchin, SPIE Bellingham, Washinton, 2002, pp. 725-785.

[2] Utzinger,U y R.R. Richards-Kortum, “Fiber Optic Probes for Biomedical Optical Spectroscopy.” Journal of Biomedical Optics Vol.8, No. 1, 121-147 (2003).

[3] P.R. Bargo, “Collection Efficiency of a Single Optical fiber in Turbid Media for Reflectance Spectroscopy.” Applied Optics Vol.42, 3187-3197 (2003).

[4] L.T. Norvan et al, “Comparison Between Reflectance Spectra Obtained with an Integrating Sphere and a Fiber-Optic Collection System.” *SPIE* Vol 2624, 155-164 (1996)

[5] http://www.colorsavvy.com/Support/TechSupport.html “ColorMouseToo!, Manual”, (1999), accesado 15 Enero de 2006.

[6] L.T. Perelman y V. Backman, “Chapter 12 Light Scattering Spectroscopy of Epithelial Tissues: Principles and Applications”, En *Handbook of Optical Biomedical Diagnosis*, editado por V.V. Tuchin, SPIE Bellingham, Washinton, 2002, pp. 675-724.

[7] M.J,. Vrhel, “An LED based spectrophotometric instrument.”

[8] Wagner, J.K. et al “Comparing Quantitative Measures of Erythema, Pigmentation and Skin Response using Reflectometry.” Pigment Cell Res 15 379-384 (2003).

[9] http://www.oceanoptics.com/technical/opticalresolution.asp “Optical Resolution”, accesado 28 Febrero de 2007.

Capítulo 6

Conclusiones

''Día llegará en que pueda llevar consigo el hombre, como hoy el tiempo en un reloj, la luz, el calor y la fuerza en algún aparato diminuto''

José Martí

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

La óptica médica es un campo de investigación-desarrollo relativamente joven y de una actividad, en la investigación, creciente. En este sentido, en el proyecto de tesis hemos realizado un estudio teórico y experimental de la propagación de la luz en la piel humana enfocado a una mejor comprensión del espectro de reflexión difusa de la piel y su dependencia con los parámetros biológicos de interés.

En primer lugar hemos presentado una panorámica general de los procesos ópticos que tiene lugar en un órgano de la complejidad de la piel. Hemos revisado además la anatomía de la piel y resumido la dependencia espectral de sus parámetros ópticos con vista a utilizarlos como datos de entrada en simulaciones numéricas del espectro de reflexión.

Dada la naturaleza estratificada y compleja de la piel hemos decidido utilizar el método de Monte Carlo para realizar las simulaciones numéricas del espectro de reflexión difusa de la piel humana. Al respecto, se utiliza el

código Monte Carlo MCML en combinación con dos códigos en MATLAB® para realizar la simulación espectral de la reflectancia difusa. Esto constituye una herramienta computacional que facilita notablemente el análisis teórico del espectro de reflexión para varios parámetros y amplios intervalos espectrales.

Utilizando la herramienta computacional anterior se llevaron a cabo varias simulaciones de interés. Hemos demostrado que con el modelo simplificado de dos capas propuesto se pueden obtener las características principales del espectro de reflexión difusa de la piel de adultos. Específicamente estas curvas, para individuos de diferente grado de pigmentación, se corresponden cualitativamente con los resultados esperados y reportados por otros autores. Además se propuso un modelo de tres capas para la piel neonatal, que hasta donde sabemos no se encuentra reportado en la literatura. Se encontró una alta dependencia de la reflexión espectral con los parámetros biológicos del tejido tales como: fracción volumétrica de melanosomas y la fracción volumétrica de sangre. Respecto a la dependencia de la reflexión espectral con la concentración de bilirrubina encontramos que la forma del espectro cambia notablemente en el intervalo 400-500 nm. Este modelo de tres capada, reproduce cualitativamente los resultados reportados en la literatura por otros autores que basan su simulación en la teoría de la difusión, aunque la comparación se hace difícil pues no se reportan ni los parámetros biológicos ni los archivos de datos para realizar una comparación cuantitativa. Por lo tanto sugerimos pasar a realizar estudios experimentales con control de las variables aquí trabajadas y comprobar la validez de este modelo.

Es importante señalar que todas las simulaciones presentadas en este trabajo de tesis tienen un carácter más bien orientador que definitivo o acabado con respecto a los aspectos estudiados. En la medida que se pueda contar con los parámetros biológicos usados para poblaciones específicas de interés, entonces se podrán mejorar los modelos aquí propuestos.

Concerniente a la parte instrumental de la espectroscopía de reflexión difusa, en este trabajo se ha implementado un arreglo experimental de espectrómetro de fibra óptica calibrado por longitud de onda que cubre un intervalo espectral de 180 nm. La automatización se soporta en dos programas: a) el propio de la cámara CCD para la adquisición de imágenes y b) uno desarrollado en Mathcad Professional 2001 para la calibración espectral por longitud de onda y para la adquisición de espectros de reflexión difusa. La resolución alcanzada es aceptable para la medición del espectro de reflexión difusa de la piel humana. Esto se probó midiendo el espectro en voluntarios y reproduciéndose las características espectrales principales esperadas en el intervalo de 520 a 700 nm. Para este espectrómetro se diseñó y construyó una sonda de fibras ópticas en los talleres de nuestra institución.

Por último, los estudios de la reflexión difusa espectral en voluntarios y pacientes se realizaron mediante dos aproximaciones experimentales. La primera fue con el espectrómetro comercial CM2. Los resultados demuestran que este instrumento no registra las características espectrales más notables de la piel humana, por lo que a partir de los espectros registrados por éste, se hace muy difícil extraer información útil (por ejemplo extraer información del contenido de sangre). Sin embargo, se verificó su factibilidad para realizar estudios comparativos de la reflexión espectral de la piel con diferente grado de pigmentación y en tejidos sanos y enfermos.

La segunda aproximación experimental usada fue con el espectrómetro USB 4000. El estudio con este espectrómetro nos permitió adquirir información acerca de cómo perfeccionar el proceso de medición para situaciones reales en un ambiente clínico. Se encontró una dependencia entre la pendiente (en el intervalo 600 nm $< \lambda <$ 900 nm) del espectro registrado y el grado de pigmentación, que cualitativamente indica que a mayor pigmentación mayor pendiente del espectro. Esta relación se cumple tanto para la frente como para el antebrazo, aunque la pendiente del espectro en el antebrazo es

inferior a la pendiente del espectro en la frente, para un mismo individuo. Se elaboraron los programas de graficado de espectro usando el ambiente MATLAB® y se adquirió conocimiento del uso y manejo del espectrómetro y su software para esta aplicación. Este espectrómetro registra adecuadamente el patrón "W" típico de la presencia de sangre.

6.2 TRABAJO FUTURO

En otras aplicaciones diagnósticas y terapéuticas es de interés la simulación de las restantes magnitudes de salida del código MCML.exe, como son: el ritmo de fluencia, la transmitancia difusa y la fracción absorbida. La modificación de los dos códigos de MATLAB® desarrollados en la tesis para facilitar la simulación de las anteriores magnitudes con respecto a diferentes parámetros geométricos y biológicos brindaría una herramienta más completa para realizar estudios posteriores de la interacción de la luz con los tejidos biológicos.

El desarrollo de un código Monte Carlo que considere las ondulaciones dérmicas y epidérmicas de la estructura de la piel contribuirá a mejorar el código MCML utilizado en esta tesis.

En todas las simulaciones realizadas en esta tesis se consideró que la sangre estaba uniformemente distribuida en la epidermis. Algunos autores proponen coeficientes de corrección para tener en cuenta que la sangre está contenida en los capilares. El incluir esta corrección en nuestros modelos puede ser también un objetivo futuro para continuar este tipo de estudios.

El intervalo de los parámetros biológicos utilizados en las simulaciones fue tomado de la literatura pública y son de carácter orientador más que definitivo. Por esto, una parte del esfuerzo futuro debe dirigirse a realizar estudios encaminados a obtener los valores de estos parámetros para grupos raciales de interés en muestras de tejido sano y lesiones.

Apéndice A

Archivo típico generado con el código MCMLinput.m

A continuación se presenta un archivo de entrada típico como los que genera el código MCMLinput.m. El intervalo espectral es de 400 a 700 nm con paso de 10 nm, por lo que se tiene un número de cuatro corridas. Este ejemplo es para un tejido estratificado de tres capas donde el aire es el medio superior al tejido y el medio inferior tiene un índice de refracción n = 1.50.

```
####
#  Template of input files for Monte Carlo simulation (mcml).
#  Anything in a line after "#" is ignored as comments.
#  Space lines are also ignored.
#  Lengths are in cm, mua and mus are in 1/cm.
####

1.0                                     # file version
4                                       # number of runs

### Specify data for run  1
400.mco             A                           # output filename, ASCII/Binary
50000                                   # No. of photons
0.0020 0.0020                           # dz, dr
62      200     1                       # No. of dz, dr & da.

3                                       # No. of layers
# n     mua     mus     g       d       # One line for each layer
1.00                                    # n for medium above.
1.37    30.830 258.924          0.7360 0.0040           # layer 1
1.37    17.690 258.924          0.7360 0.0900           # layer 2
1.44    1.000   600.000         0.8000 0.0300           # layer 2
1.50                                    # n for medium below.
```

```
### Specify data for run  2
500.mco                 A                               # output filename, ASCII/Binary
50000                                           # No. of photons
0.0020 0.0020                                   # dz, dr
62      200     1                               # No. of dz, dr & da.

3                                               # No. of layers
# n     mua     mus     g       d               # One line for each layer
1.00                                            # n for medium above.
1.37    14.271 172.789          0.7650 0.0040           # layer 1
1.37    2.190   172.789         0.7650 0.0900           # layer 2
1.44    1.000   600.000         0.8000 0.0300           # layer 2
1.50                                            # n for medium below.


### Specify data for run  3
600.mco                 A                               # output filename, ASCII/Binary
50000                                           # No. of photons
0.0020 0.0020                                   # dz, dr
62      200     1                               # No. of dz, dr & da.

3                                               # No. of layers
# n     mua     mus     g       d               # One line for each layer
1.00                                            # n for medium above.
1.37    7.740   137.054         0.7940 0.0040           # layer 1
1.37    0.702   137.054         0.7940 0.0900           # layer 2
1.44    1.000   600.000         0.8000 0.0300           # layer 2
1.50                                            # n for medium below.


### Specify data for run  4
700.mco                 A                               # output filename, ASCII/Binary
50000                                           # No. of photons
0.0020 0.0020                                   # dz, dr
62      200     1                               # No. of dz, dr & da.

3                                               # No. of layers
# n     mua     mus     g       d               # One line for each layer
1.00                                            # n for medium above.
1.37    4.691   122.576         0.8230 0.0040           # layer 1
1.37    0.311   122.576         0.8230 0.0900           # layer 2
1.44    1.000   600.000         0.8000 0.0300           # layer 2
1.50                                            # n for medium below.
```

Apéndice B

Coeficientes de extinción molar para la hemoglobina y la bilirrubina

A continuación se presenta una tabla con la tabulación del coeficiente de extinción molar [cm^{-1}/(moles/litros)] de la hemoglobina y la bilirrubina en el intervalo espectral de 400 a 700 nm. Estos valores se extrajeron de los compilados por Scott Prahl utilizando datos de otros autores. La hemoglobina se midió disuelta en agua mientras que la bilirrubina lo estaba en cloroformo.

Los valores tabulados han sido utilizados en este proyecto de tesis para obtener el coeficiente de absorción de la hemoglobina y la bilirrubina respectivamente.

En la tabla HbO_2 representa la oxihemoglobina y Hb a la hemoglobina reducida. Se ha utilizado el símbolo Bi para representar a la bilirrubina.

λ (nm)	ε(λ) cm^{-1}/(moles/litros)		
	HbO_2	Hb	Bi
400.00	266232.00	223296.00	23214.00
410.00	466840.00	303956.00	30818.00
420.00	480360.00	407560.00	39276.00
430.00	246072.00	528600.00	46781.00
440.00	102580.00	413280.00	52087.00
450.00	62816.00	103292.00	54865.00
460.00	44480.00	23388.80	53846.00
470.00	33209.20	16156.40	46168.00
480.00	26629.20	14550.00	29624.00
490.00	23684.40	16684.00	14019.00
500.00	20932.80	20862.00	4766.00
510.00	20035.20	25773.60	1299.00
520.00	24202.40	31589.60	340.00
530.00	39956.80	39036.40	129.00
540.00	53236.00	46592.00	67.00
550.00	43016.00	53412.00	62.00
560.00	32613.20	53788.00	53.00
570.00	44496.00	45072.00	46.00
580.00	50104.00	37020.00	2.00
590.00	14400.80	28324.40	57.00
600.00	3200.00	14677.20	59.00
610.00	1506.00	9443.60	54.00
620.00	942.00	6509.60	0.00
630.00	610.00	5148.80	28.00
640.00	442.00	4345.20	5.00
650.00	368.00	3750.12	86.00
660.00	319.60	3226.56	30.00
670.00	294.00	2795.12	87.00
680.00	277.60	2407.92	0.00
690.00	276.00	2051.96	35.00
700.00	290.00	1794.28	103.00

Apéndice C

Espectrómetro Implementado

C.1

Calibración espectral característica

Durante el proceso de calibración del espectrómetro desarrollado en el Capítulo 4 de esta tesis se genera una tabla como la que se muestra a continuación. En esta tabla se registra el número del ***píxel*** que tiene la intensidad luminosa máxima cuando se ilumina la rendija de entrada del monocromador con la longitud de onda conocida, que hemos denominado en la tabla como λ ***establecida***. Para dicho píxel se registra, además el valor de intensidad en niveles de grises denotándolo en la tabla como ***nivel de gris***. También se muestra en la tabla la longitud de onda calculada λ ***calculada*** mediante el ajuste lineal y la diferencia entre ésta y la longitud de onda establecida.

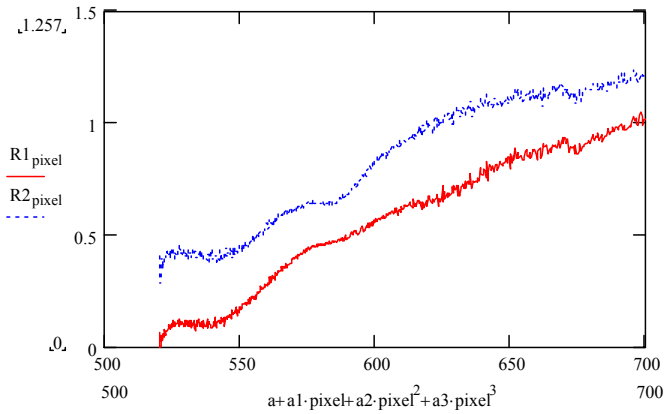
pixel	nivel gris	λ establecida (nm)	λ calculada (nm)	diferencia (nm)
3	19	520	519.7004	0.2996
59	31	530	530.2177	-0.2177
110	44	540	540.2237	-0.2237
158	58	550	550.1468	-0.1468
203	71	560	560.0036	-0.0036
247	93	570	570.2567	-0.2567
285	104	580	579.6727	0.3273
323	118	590	589.6712	0.3288
359	137	600	599.7347	0.2653
394	145	610	610.1190	-0.1190
425	162	620	619.8486	0.1514
454	168	630	629.4327	0.5673
488	177	640	641.2993	-1.2993
511	170	650	649.7327	0.2673
538	168	660	660.0713	-0.0713
563	154	670	670.0840	-0.0840
587	149	680	680.1102	-0.1102
610	131	690	690.1133	-0.1133
631	115	700	699.5953	0.4047

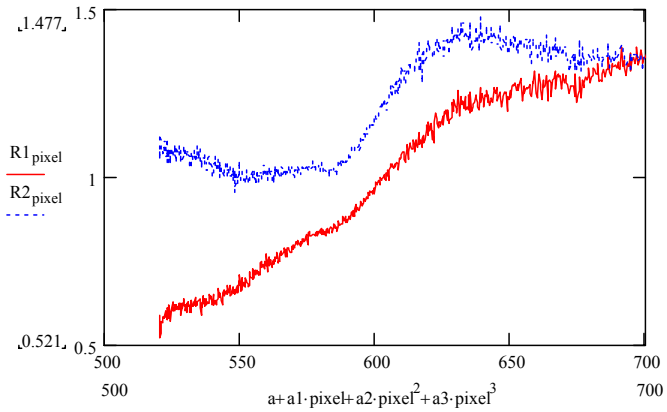
C.2

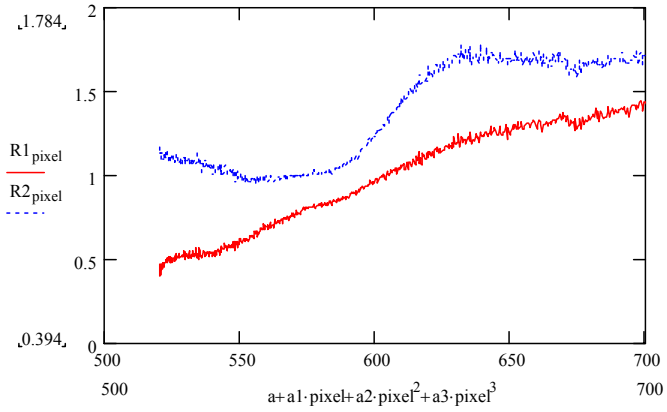
Espectros de reflexión de voluntarios

En este apéndice se vuelve a presentar el espectro de reflexión mostrado en el Capítulo 4 que corresponde a un voluntario de piel morena, pero además se incluyen dos espectros que corresponden a dos voluntarios de piel blanca. El gráfico superior corresponde a la piel morena y los dos restantes, de arriba hacia abajo, responden a la piel cada vez más blanca.

La curva en rojo representa la reflexión medida en la cara externa del brazo y la curva azul la reflexión en la cara interna. Nótese como para los tres voluntarios el espectrómetro diferencia adecuadamente los dos sitios medidos.


1.257
1.5
1
0.5
0
R1pixel
R2pixel
500
550
600
650
700
500
a+a1·pixel+a2·pixel2+a3·pixel3
700


1.477
1.5
1
0.521
0.5
R1pixel
R2pixel
500
550
600
650
700
500
a+a1·pixel+a2·pixel2+a3·pixel3
700


1.784
2
1.5
1
0.5
0.394
0
R1pixel
R2pixel
500
550
600
650
700
500
a+a1·pixel+a2·pixel2+a3·pixel3
700

Apéndice D

Forma del permiso de participación

En este apéndice incluimos una copia textual de la forma de permiso elaborada para reclutar voluntarios para el estudio que se presentó en el Capítulo 5 concerniente al espectrómetro comercial USB 4000.

Permiso de Participación en el Estudio

Medición de la Reflexión Difusa de la piel Humana

Responsable del estudio: José Alberto Delgado Atencio.

Introducción

Hemos considerado oportuno invitarle a participar voluntariamente en este estudio de investigación y que tenga la oportunidad de contribuir a que adquiramos experiencia en el procedimiento de adquisición y procesamiento de espectros de reflexión con el espectrómetro comercial USB4000. Esperamos que los resultados y las observaciones durante el mismo nos permitan tomar en consideración elementos y detalles de utilidad para establecer métodos de diagnóstico aplicables a pacientes en el futuro

Objetivo: Evaluación preliminar del espectrómetro comercial USB4000 en la medición del espectro de reflexión difusa de la piel humana.

Procedimiento de medición

La medición se realizará colocando la sonda de fibra óptica en contacto con 2 zonas de interés de su piel.

1. La frente
2. La superficie interna del antebrazo

La medición del espectro se realiza haciendo pasar la luz de una lámpara de halógeno a través de la sonda de fibra óptica bifurcada. La potencia luminosa que incide sobre su piel no es suficiente para producir molestias o calentamiento. La fracción de la luz que se refleja en la piel es recolectada por la fibra óptica y conducida al espectrómetro donde ésta es convertida en una señal eléctrica débil que se registra y almacena mediante un programa en el ordenador o computadora personal.

Información general

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene derecho a rechazar la invitación de tomar parte en el estudio o incluso dejar de participar en el mismo en cualquier momento.

Confidencialidad

La información recabada en este estudio será protegida hasta el punto permitido por la ley. Su nombre no será revelado aunque los resultados del estudio sean publicados.

Preguntas

Todas las preguntas que usted tenga sobre este estudio de investigación serán respondidas por José Alberto Delgado Atencio

Consentimiento del voluntario

He tenido la oportunidad de realizar preguntas sobre este estudio de investigación. Además he leído esta planilla de consentimiento y mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente por el responsable del estudio.

Mediante mi firma más abajo expreso mi consentimiento para ser parte de este estudio y que las condiciones establecidas en esta planilla de consentimiento son aceptadas por mí.

Firma del voluntario_____

Nombre del voluntario _____

Fecha _____

Apéndice E

Publicaciones y Participación en Congresos

E.1

Lista de publicaciones

1. **J.A. Delgado** Atencio, A. Cornejo Rodríguez, J.F. Rivas Silva, E.E. Rodríguez, *"Modeling of Light Reflection from Human Skin". In AIP Conference Proceedings* ***2006,*** *Vol. 854, 72-74.*
2. **J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, M. Cunill Rodríguez, J.J. Baez, R. Matos, L. Anasagasti, C. Santiago, *"In-vivo Reflectance Measurements from Human Skin". In AIP Conference Proceedings* ***2006,*** *Vol. 854,114-115.*
3. M. Cunill Rodríguez, J.C Ramos, **J.A. Delgado Atencio**, S. Vázquez y Montiel, M. Alcaraz Rivera, *"Experimental Determination of Local Diffuse Reflectance in Highly Scattering Media". In AIP Conference Proceedings* ***2006,*** *Vol. 854, 145-147.*
4. **J.A. Delgado Atencio**, I.Quesada, L.M. Montaño, L.Anasagasti, *"Safety of UV radiation for autofluorescence diagnosis of skin cancer". Revista Mexicana de Física E (1) 78-83* ***2006****.*
5. M. Ibañez-Porras, J.J. Báez-Rojas y **J.A. Delgado-Atencio**, J.C. Conde-Acevedo, *"Medición de la transmitancia espectral de filtros de gelatina". Revista Mexicana de Física E (1) 47-50* ***2006.***

E.2

Lista de participación en congresos

- XLVII Congreso Nacional de Física. Hermosillo, Sonora, México. Del 25 al 29 de octubre de 2004:

- **J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, J.J. Báez, M. Cunill Rodríguez, L. Anasagasti. "*Medición in-vivo de la reflectividad de la piel humana utilizando el espectrofotómetro comercial color mouse too!*". Presentación Póster

- D. García-Toral, J.F. Rivas Silva, **J.A. Delgado Atencio**. "*Estudio químico cuántico de polímeros orgánicos de la piel humana*". Presentación Póster

- J.J. Báez Rojas, **J.A. Delgado Atencio**, M. Ibañez Porras, J.C Conde Acevedo; A. Padilla Vivanco, G. Urcid Serrano. "*Medición de la transmitancia espectral por retroreflexión difusa".* Presentación Póster

- Quinto encuentro de investigación, Tonantzintla, Puebla, México. Del 9 al 10 de noviembre de 2004. **J.A. Delgado**, A. Cornejo, J.J. Báez, C. Santiago, M. Cunill, A.Matos, L. Anasagasti. "*Medición in-vivo de la reflectancia de la piel humana* ". Presentación Oral
- Tecnoláser 2005. Ciudad de la Habana, Cuba. Del 21 al 22 de julio de 2005. **J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, J. Castro Ramos, M. Cunill Rodríguez, F. Rivas Silva "Implementación de un Espectrofotómetro para el Estudio de la fluorescencia de la Piel Humana". Presentación Oral.
- XLVIII Congreso Nacional de Física, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Del 17 al 21 de octubre de 2005. **J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, J. Castro Ramos, M. Cunill Rodríguez "*Implementación de un Espectrofotómetro para el Estudio de la Reflectancia Difusa y la Fluorescencia de la Piel Humana*".

Presentación Oral.

- Sexto encuentro de investigación, Tonantzintla, Puebla, México. Del 27 al 28 de octubre de 2005**. J.A. Delgado**, A. Cornejo, F. Rivas "*Simulation of Diffuse Reflectance of Human Skin Using the MCML code"*. Presentación Oral.
- Ninth Mexican Symposium on Medical Physics, Guadalajara, Jal., México. Del 18 al 21 de marzo de 2006:

-**J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, J.F. Rivas Silva, E.E. Rodríguez. "*Modeling of Light Reflection from Human Skin"*. Presentación Oral.

-**J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, M. Cunill Rodríguez, J.J. Baez, R. Matos, L. Anasagasti, C. Santiago. "*In-vivo Reflectance Measurements from Human Skin"*. Presentación Póster.

-M. Cunill Rodríguez, J.C Ramos, **J.A. Delgado Atencio**, S. Vázquez y Montiel, M. Alcaraz Rivera, *"Experimental Determination of Local Diffuse Reflectance in Highly Scattering Media"*. Presentación Póster.

- XLIX Congreso Nacional de Física, Universidad autónoma de San Luis Potosí, México. Del 16 al 20 de octubre de 2006:

-**J.A. Delgado Atencio**, E. Eloy Rodríguez, J.F Rivas Silva. "*Simulación numérica de la Reflexión Difusa de la piel de neonatos*". Presentación Póster.

-M. Cunill Rodríguez, J.Castro Ramos, **J.A. Delgado Atencio**, S. Vázquez y Montiel, M. Alcaraz Rivera. "*Medición de la reflexion difusa local de muestras ex vivo de tejidos animales*". Presentación Póster.

- Biophotonic School 2007, Suecia. Del 9 al 16 de junio de 2007. **J.A. Delgado Atencio**, E.E Rodríguez, A. Cornejo Rodríguez, J.F Rivas Silva, S.L Jacques "*Monte Carlo Simulation of Diffuse Reflectance in Neonatal Skin*". Presentación Póster.
- 6th Ibero-American Conference on Optics (RIAO))/OPTILAS´07. Campinas, Sao Paulo, Brasil. Del 21 al 26 de octubre de 2007:

-**J.A. Delgado Atencio**, E.E Rodríguez, A. Cornejo Rodríguez, J.F Rivas Silva "*Monte Carlo Simulation of Visible Light Diffuse Reflection in*

Neonatal Skin". Presentación Póster.

-M. Cunill Rodríguez, J.Castro Ramos, S. Vázquez y Montiel **J.A. Delgado Atencio.** "*Implementing and Characterizing a Video Reflectometry Set-up*". Presentación Póster.

- L Congreso Nacional de Física, Veracruz, México. Del 29 de octubre al 2 de noviembre de 2007. **J.A. Delgado Atencio**, A. Cornejo Rodríguez, J.F Rivas Silva. "*Simulación Numérica de la Reflexión Difusa de la Luz en Muestras de Piel Humana*". Presentación Póster.

Lista de Figuras

Figura 3.1. *Modelo óptico de dos capas para la piel de adultos. Los medio superior e inferior son el aire y el tejido subcutáneo respectivamente. Se lanzan 100000 fotones para la simulación en cada longitud de onda de interés.* 45

Figura 3.2. *Reflexión difusa de la piel sana de un adulto para diferente grado de pigmentación manteniendo constante el valor de la fracción volumétrica de sangre. La fracción volumétrica de melanosomas establecida fue de 4%,14% y 30%; mientras que fbl = 0.2%.* 47

Figura 3.3. *Reflexión difusa de la piel de un adulto con diferente estado de irrigación sanguínea. a) Para una fracción volumétrica de sangre promedio con un valor típico de 0.2%. b) Para una fracción volumétrica de sangre promedio incrementada hasta un valor de 1% representativo de una posible afectación de la piel relacionada principalmente con un proceso inflamatorio.* 48

Figura 3.4. *Modelo óptico de tres capas para la piel de neonatos. El sitio corporal modelado es la frente del infante. Consideramos el hueso frontal como el medio inferior al usar el código MCML.exe. Se lanzan 50000 fotones para la simulación en cada longitud de onda de interés.* 51

Figura 3.5. *Reflexión difusa espectral de la piel de un neonato con una madurez de la piel de 39 semanas. Se utiliza la concentración de bilirrubina Cbi como parámetro variable en la simulación y se mantiene constante los siguientes parámetros: fme = 2%, fbl = 0.2% y fbi = 20%.* 53

Figura 3.6. *Reflectancia difusa espectral de la piel de neonato con un nivel de hiperbilirrubinemia típico (0.10 g/L). Se toma la fracción volumétrica de melanosomas fme como el parámetro variable en la modelación.* 54

Figura 3.7. *Reflexión difusa espectral de la piel de un neonato con un nivel de hiperbilirrubinemia típico (0.10 g/L). El contenido de sangre es el parámetro*

variable en la simulación. Una fracción volumétrica de sangre del 1% la consideramos como un valor relativamente atípico pero posible...... 55
Figura 3.8. *Representación esquemática de la orientación natural e inversa de la piel. La orientación natural de la piel es aquella en que la primera capa con la cual se encuentra el haz incidente es la epidermis. La orientación inversa se tiene cuando la primera capa expuesta al haz de incidencia es la dermis.*..... 56
Figura 3.9. *a) Resultado de las curvas de reflexión difusa para orientación natural de la piel. Nótese el incremento de la reflexión según disminuye la fracción volumétrica de melanosomas. b) Resultado de las curvas de reflexión difusa para orientación inversa de la piel. Se aprecia un cambio notable de la reflexión con el incremento del contenido de melanina o fracción volumétrica de melanosomas. Las Figuras c-f) representan el resultado de la comparación de la reflectancia natural e inversa para cuatro valores diferentes de la fracción volumétrica de melanosomas.*..... 59
Figura 4.1. *Representación esquemática del arreglo experimental implementado. Se aprecia la sonda de fibras ópticas acoplada a la fuente de iluminación 2 y a la ranura de entrada del monocromador 1 respectivamente. La salida de la cámara CCD se conecta al computador. El extremo izquierdo de la sonda es de una sola fibra, mientras que el extremo derecho tiene 6 fibras para la iluminación del tejido en estudio*..... . 67
Figura 4.2. *Esquema óptico del monocromador y su acoplamiento con la cámara CCD. La cámara CCD se coloca en el plano de enfoque del espejo M2. Esto permite un registro instantáneo del espectro de la fuente luminosa que se analiza*..... . 68
Figura 4.3. *Fotografía digital del arreglo experimental propuesto. Esta es la primera versión del arreglo propuesto. Nótese la diferencia del arreglo de fibras ópticas en esta foto con respecto al arreglo final de fibras ópticas que se presenta en la Figura 4.4* 69

Figura 4.4. *Fotografía digital de la versión final de la sonda de fibras ópticas diseñada y construida para el espectrómetro implementado*..... . 71
Figura 4.5. *Resultado típico de la dependencia de la longitud de onda λ y el número del píxel del arreglo CCD durante el proceso de calibración espectral del espectrómetro. Note que la dependencia es apreciablemente no lineal.* 73
Figura 4.6. *a, b y c. Perfil de intensidades para grupos de líneas espectrales centradas en 532 nm, 602 nm y 692 nm respectivamente. Se aprecia la disminución del poder de resolución con el aumento de la longitud de onda.* 76
Figura 4.7. *Espectros registrados por el espectrómetro cuando se modifica la salida espectral de una lámpara de halógeno mediante 8 filtros de interferencia diferentes que son colocados independientemente para cubrir el intervalo espectral del instrumento*..... 78
Figura 4.8. *Espectro de reflexión tomado en la palma de la mano de dos voluntarios de piel blanca: Superior, espectros sin procesar; Inferior, espectros procesados donde R1 y R2 son los espectros correspondientes a los voluntarios 1 y 2, respectivamente* 79
Figura 4.9. *Espectro de reflexión para dos sitios corporales diferentes de un voluntario de piel morena. R1 y R2 representan la cara interna y externa del brazo respectivamente*..... . 80
Figura 5.1. *Arreglo experimental típico empleado para realizar los estudios de la reflectancia con el espectrómetro CM2S* 86
Figura 5.2. *Espectros de reflectancia espectral de los dos patrones de piel humana del cuadro de patrones Color Checker a) patrón dark skin, b) patrón light skin.* 88
Figura 5.3. *Espectros de reflectancia para zonas corporales sana en voluntarios y pacientes, izquierda) parte media del antebrazo izquierdo de voluntarios del INAOE derecha) Cara interior de la parte superior del brazo de pacientes del INOR.* 89

Figura 5.4. *Comparación del espectro de reflectancia en pacientes del INOR a) Zonas sanas con diferente grado de exposición solar b) Piel sana y lesión (queratosis seborreica).* 90
Figura 5.5. *Arreglo experimental del mini espectrómetro de fibra óptica USB 4000 configurado para realizar mediciones de reflexión difusa en la piel humana.* 92
Figura 5.6. *Espectros de reflexión difusa que presentaron la mayor dispersión en las mediciones superior) frente e inferior) antebrazo. Estas mediciones fueron tomadas en el voluntario V4.* 95
Figura 5.7. *Espectros comparativos del antebrazo y la frente para dos voluntarios del estudio (V3 y V11). Se muestra la existencia de una longitud de onda de cruce λc donde se intercambia el predominio del valor de un espectro sobre el otro.* 97
Figura 5.8. *Espectros comparativos del antebrazo y la frente para tres voluntarios del estudio (V9, V10 y V11). Se muestra la existencia de una longitud de onda de cruce λc donde se intercambia el predominio del valor de un espectro sobre el otro.* 98

Lista de Tablas

TABLA 2.1. *Ejemplos de aplicación de criterio de jerarquía que relaciona las dimensiones del elemento esparcidor con el tipo de esparcimiento que se manifiesta.* 19

TABLA 3.1. *Parámetros ópticos y geométricos del modelo utilizados en la simulación. El espesor de la capa se denota por d y su índice de refracción n.* 46

TABLA. 3.2. *Parámetros ópticos de entrada usados en esta simulación para el programa MCML.exe. d es el espesor de cada capa de la muestra* 57

TABLA 4.1. *Valores típicos de los parámetros para la regresión polinómica de grado tres de la dependencia de la longitud de onda λ y el número del píxel p. Es importante notar que el coeficiente R2 es igual a la unidad para esta calibración.* 74