



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



## TRABAJO DE FÍN DE GRADO

Grado en Ingeniería Geomática y  
Topografía

# APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE VISIÓN MULTIESPECTRAL EN CIRUGÍA

---

Autor: **María Moncho Santonja**

[monsan@topo.upv.es](mailto:monsan@topo.upv.es)

En colaboración con el Centro de Investigación en  
Tecnologías Gráficas



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍA GEODÉSICA  
CARTOGRÁFICA Y TOPOGRÁFICA

Tutor: **D.Guillermo Peris Fajarnés**

[gperis@upv.es](mailto:gperis@upv.es)

Tutor externo: **D.Juan José Vila Carbo**

[vila\\_jjo@gva.es](mailto:vila_jjo@gva.es)

---

*Valencia, Julio de 2018*



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Centro de Investigación  
en Tecnologías Gráficas



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍA GEODÉSICA  
CARTOGRÁFICA Y TOPOGRÁFICA



*“Al principio, sólo era la nada, la cual explotó”*

*-Terry Pratchett-*

Gracias Guillermo por la libertad y apoyo que me has dado en todo momento. Sólo cuando se deja pensar, el trabajo tiene resultado.

*“No sé, sin ellas no puedo volar.”*

*-Extremoduro-*

Gracias Silvia. Gràcies Esther.

No recuerdo etapa mejor en mi vida... y vosotros tenéis la mayor parte de culpa.





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍA GEODÉSICA  
CARTOGRÁFICA Y TOPOGRÁFICA



## ÍNDICE GENERAL

---

1.	INTRODUCCIÓN .....	9
1.1	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	12
1.2	PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO .....	14
2	PRINCIPIOS FÍSICOS Y FUNDAMENTO TEÓRICOS .....	17
2.1	EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO.....	17
2.2	FENÓMENOS FÍSICOS DERIVADOS DE LA INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.....	19
2.2.1	ABSORCIÓN .....	19
2.2.2	FLUORESCENCIA .....	22
2.2.3	DISPERSIÓN O SCATTERING.....	24
2.3	INSTRUMENTOS DE CAPTURA DE LA INFORMACIÓN .....	26
2.3.1	EL ESPECTROFOTÓMETRO.....	26
2.3.2	SENSORES DIGITALES .....	28
2.4	LA IMAGEN DIGITAL.....	29
2.4.1	LAS RESOLUCIONES DE LOS SENSORES DE CAPTURA Y DE LAS IMAGENES .....	30
-	Resolución espacial.....	30
-	Resolución espectral.....	30
-	Resolución radiométrica .....	31
2.5	TIPOS DE SENSORES DE CAPTURA DE IMAGEN .....	33
2.6	TIPOS DE CÁMARAS QUE INTEGRAN LOS SENSORES .....	36
2.6.1	CÁMARAS HIPER ESPECTRALES.....	36
2.6.2	CÁMARAS MULTI ESPECTRALES .....	38
2.6.3	CÁMARAS RGB.....	41
2.7	FUENTES DE ILUMINACIÓN.....	43
2.7.1	LA CAPTURA DE LA FLUORESCENCIA.....	46
2.8	ESPECTROSCOPIA DE IMAGEN .....	47





2.9	CARACTERÍSTICAS DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS - TUMORALES	
	49	
2.10	LA AUTOFLUORESCENCIA .....	53
2.11	APLICACIONES DE LA AUTO FLUORESCENCIA EN LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS.....	57
2.12	SISTEMAS COMERCIALES .....	63
-	VELscope .....	63
-	SIAscopy .....	63
-	miniFLARE .....	64
-	MelaFind (Melanoma Detection) .....	64
2.13	RESUMEN.....	65
3	EXPERIMENTAL EN LABORATORIO .....	72
3.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1.1	FUENTES DE ILUMINACIÓN.....	73
3.1.2	SENSOR DE CAPTURA.....	74
3.1.3	FILTROS EMPLEADOS .....	77
3.1.4	EXPERIMENTAL .....	78
4	LÍNEA DE TRABAJO FUTURA.....	85
5	Bibliografía .....	86
	ANEXO I: ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS FILTROS EMPLEADOS EN EL EXPERIMENTAL. ....	87
	ANEXO II: RESUMEN DEL ARTÍCULO PRESENTADO EN EL CONGRESO INNODOCT 2018.....	87





## ÍNDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES

---

Tabla 1-Colores complementarios y sus longitudes de onda aproximadas...	19
Tabla 2-Comparativa de características de los sensores CCD y CMOS.....	34
Tabla 3- Comportamiento espectral de los principales fluoróforos endógenos	56
Ilustración 1- El espectro electromagnético .....	18
Ilustración 2- El espectro continuo, de emisión y de absorción de los materiales.....	18
Ilustración 3- Fenómeno de absorción de luz.....	20
Ilustración 4-Espectros de absorción de los principales compuestos biológicos y definición de la ventana terapéutica. ....	21
Ilustración 5- Diagramas del comportamiento de la fluorescencia .....	23
Ilustración 6-Fenómeno de dispersión lumínica.....	24
Ilustración 7- Partes y estructura de un espectrofotómetro.....	27
Ilustración 8- La imagen digital.....	29
Ilustración 9- La resolución espectral. Comparativa .....	31
Ilustración 10- Escena idéntica captada por dos sensores con diferente resolución radiométrica.....	32
Ilustración 11- Esquema sensores CCD y CMOS.....	34
Ilustración 12- Estructura de una imagen hiper espectral .....	38
Ilustración 13-Estructura de una imagen multi espectral .....	39
Ilustración 14- Realce del color mediante combinación de bandas de imágenes multi espectrales. FUENTE: (21).....	40
Ilustración 15-Imágenes hiper espectrales, multi espectrales y RGB convencionales .....	41
Ilustración 16-Reconstrucción de la firma espectral con datos multiespectrales y con datos hiper espectrales. Comparativa. ....	42
Ilustración 17-Lámpara de luz de Wood.....	44
Ilustración 18- Hipopigmentación de la piel observada bajo luz de Wood.....	45
Ilustración 19-Hiper pigmentación de la piel observada bajo luz de Wood ....	45





Ilustración 20-Huella espectral de la hemoglobina..... 51

Ilustración 21-Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de fluoróforos endógenos. .... 56

Ilustración 22-Imagen normal VS imagen auto fluorescencia carcinoma cutáneo (con aplicación de pomada potenciadora de fluorescencia) ..... 57

Ilustración 23- Imagen de auto fluorescencia de micro metástasis peritoneales ..... 58

Ilustración 24-Imagen de broncoscopia de auto fluorescencia ..... 58

Ilustración 25- Imágenes de auto fluorescencia de mucosas bucales con áreas patológicas ..... 61

Ilustración 26-Estructura dental ..... 72

Ilustración 27- Iluminante empleado ..... 73

Ilustración 28-Iluminante empleado ..... 73

Ilustración 29- Formato de metadatos de las imágenes empleadas ..... 75

Ilustración 30- Formato de metadatos de las imágenes empleadas ..... 75

Ilustración 31- Formato de metadatos de las imágenes empleadas ..... 76

Ilustración 32- Filtro Schott VG 9 (verde)..... 77

Ilustración 33-Filtro Schott RG610 (rojo)..... 77

Ilustración 34- Imagen de dientes naturales tomada con luz natural y sin filtros especiales..... 78

Ilustración 35- Zonas de desgaste de la capa superficial de esmalte dental y aumento de la visualización de la dentina ..... 78

Ilustración 36- Imagen tomada con luz AZUL y sin filtros especiales ..... 79

Ilustración 37- Imagen tomada con iluminación AZUL y filtro de paso alto Schott RG610..... 80

Ilustración 38- Imagen con luz AZUL y filtro RG610 sin bloqueo completo de la luz iluminante..... 81

Ilustración 39-Nomenclatura estructura bucal inferior ..... 81

Ilustración 40-Cavidad bucal perspectiva frontal con luz natural sin filtros ..... 82

Ilustración 41-Cavidad bucal perspectiva lateral con luz natural sin filtros ..... 82

Ilustración 42-Cavidad bucal perspectiva frontal con luz AZUL sin filtros ..... 82

Ilustración 43-Cavidad bucal perspectiva frontal y lateral con luz AZUL y filtro Schott VG 9 ..... 83





Ilustración 44- Cavidad bucal perspectiva frontal y lateral con luz AZUL y filtro ROJO Schott RG610 ..... 83

Ilustración 45- Cavidad bucal perspectiva frontal y lateral con iluminación AZUL y filtro ROJO Schott RG610 ..... 84





# 1.INTRODUCCIÓN

---

El presente documento corresponde con el Trabajo de Fin de Grado de la alumna María Moncho Santonja para la obtención del título de Grado en Ingeniería Geomática y Topografía (ETSIGT) impartido en la Universitat Politècnica de València (UPV) durante el periodo 2014-2018.

El desarrollo del presente proyecto se ha realizado en el Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas (CITG) y viene respaldado por la concesión de una beca de colaboración del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte en el curso académico 2017-2018.

La tutorización de todo el trabajo ha sido responsabilidad de D. Guillermo Peris Fajarnés, director del CITG, junto con la colaboración de D. Juan José Vila Carbo, director del área de cirugía pediátrica del hospital público La Fe de Valencia.

La actividad clínica exige tener la capacidad de distinguir cuando y donde hay una lesión, área o célula patológica con el fin de poder actuar. En las cirugías, el reconocimiento de tejido patológico suele hacerse mediante la visión del cirujano, quien debe tomar las decisiones en función de la información que dispone.

En el presente trabajo, se analizará el estado de la ciencia con relación a las posibilidades de mejorar esa capacidad de discriminación mediante la combinación de técnicas de iluminación y visión no invasivas. Esta actividad se plantea además buscando una aplicabilidad real en lo relacionado con la practicidad y el coste.

Bajo esta premisa, se ha definido el trabajo que se presenta.

En este sentido el análisis que se plasmará en el resumen del trabajo se ha basado en:



- a) El estudio del comportamiento físico-biológico de tejidos y células del cuerpo humano.
- b) En la revisión del estado de la ciencia de las herramientas multispectrales que se pueden aplicar para la mejora del reconocimiento de lesiones.
- c) En la propuesta de un procedimiento que puede permitir, en teoría, mejorar la capacidad de discriminación de diferentes tejidos en función de la absorción y reflexión de luz de forma particular.

Estos estudios precisamente apuntan hacia la posibilidad de desarrollar sistemas de diagnóstico de patologías en el cuerpo humano a través de sistemas de obtención y procesado de imagen multi e hiper- espectrales no invasivos.

Precisamente la diferencia en la absorción de luz de los tejidos es la base para el aprovechamiento y su discriminación.

Han sido varias los problemas que se plantean en la eficacia de algunas técnicas, como el tiempo de procesado de los datos o la obtención de algunos errores en la clasificación de los tejidos patológicos.

No obstante, la principal limitación que se ha encontrado y que se intentará resolver, ha sido el elevado coste que el instrumental comercializado presenta, y como consecuencia de ello, el bajo aprovechamiento de estas técnicas, aunque su eficacia venga avalada y respaldada por numerosos estudios.

Del desarrollo del trabajo se espera poder definir una metodología experimental para la toma de datos propios y posterior tratamiento y estudio de éstos.

Este TFG se propone como el inicio de una tarea investigadora que pueda extenderse incluso al desarrollo de una tesis doctoral. Es por ello



por lo que tras la defensa del proyecto se seguirá desarrollando el trabajo, intentando mejorar la calidad de los resultados obtenidos.

**El objetivo último es intentar incorporar unas herramientas económicas y con una efectividad comparable a la de los costosos instrumentales comercializados actualmente.**





## 1.1 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En el presente trabajo se define y se propone una técnica que combina el procesado de imagen asociado a una iluminación específica como herramienta de ayuda a la toma de decisiones en procesos quirúrgicos. En concreto, el trabajo propone una serie de técnicas para reconocer áreas y células patológicas y no patológicas de manera visual y aplicable durante la intervención.

En este sentido el trabajo expone ordenadamente un análisis mediante el que se define en primer lugar la base del conocimiento, en segundo lugar, las referencias directamente relacionadas con el trabajo y en último lugar una serie de propuestas específicas con el fin de trasladar y formalizar dicho estudio en una herramienta y técnica aplicable clínicamente en un futuro cercano.

Cuando una anomalía aparece en el cuerpo humano, la detección precoz de ésta es un elemento clave para mejorar la eficiencia en el tratamiento y evolución de la enfermedad.

En muchos casos, cuando hablamos de patologías oncológicas, parte del tratamiento es la resección y extirpación de la masa de células tumorales. Por ello la mejora en el proceso de resección de la masa patológica, supone una reducción en la probabilidad de una posterior reaparición de la enfermedad.

En muchos casos, la presencia de las masas dañinas se encuentra en tejidos sensibles, en proximidades de órganos vitales o incluso en el interior de estos, como el cerebro, el esófago, el útero, etc. En este tipo de cirugías se intentará conservar la mayor parte del tejido sano circundante a la masa a extirpar.

Es por ello por lo que la demarcación precisa de la masa a extirpar será clave tanto para evitar dejar rastro de pequeñas porciones de masa anómala (que provoquen recaídas en los pacientes), como para minimizar





al máximo los daños que la resección de exceso de tejido no dañado pueda provocar.

Así, las herramientas de ayuda en la visión quirúrgica, delimitación de márgenes tumorales e identificación de posibles restos de éstos, se encuentran en continuo desarrollo.

Por todo ello, el desarrollo de herramientas y técnicas que mejoren esta capacidad de reconocimiento y discriminación tiene un impacto potencial relevante. El presente proyecto analiza el conocimiento que existe al respecto y propone, a nivel de laboratorio (que pueda ser trasladado a un escenario quirúrgico) un procedimiento para mejorar la capacidad de discriminación visual. Si bien la utilidad inicial se va a centrar en el campo de la medicina, se apuntarán nuevos sectores de aplicación durante el proyecto sobre los que se podrá ampliar en un futuro nuevas líneas de actuación.



## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

El desarrollo y la mejora de las técnicas de visualización y discriminación de tejido en función de la absorción de diferentes longitudes de onda, y la adecuada selección de la longitud de onda de la respuesta de dichos tejidos (huella espectral) forman la base para el desarrollo del proyecto.

Por ello, es necesario estructurar el proyecto en una serie de etapas o apartados.

En primer lugar, estudiaremos el problema desde un punto de vista general, siendo fundamental revisar cómo se comporta la luz y qué ocurre cuando incide en un determinado tejido.

En segundo lugar, vamos a plantear y revisar cual es el estado de conocimiento del ámbito que se va a tratar en el presente estudio desde dos perspectivas:

- La **científica**, en la que se realizará una amplia revisión de la bibliografía.
- La **técnica**, en la que se revisará la existencia de dispositivos o herramientas que, sobre una base similar contribuyen precisamente a esta mejora en la percepción visual del personal sanitario.

Realizadas estas dos actividades, estaremos en disposición de proponer qué técnicas teóricas serán las que potencialmente tendrán una aplicabilidad real, y, en consecuencia, van a definir futuros desarrollos.

Por tanto, para cubrir los aspectos científicos, técnicos, y plantear a su vez una futura línea de trabajo, el documento ha quedado organizado en los siguientes apartados:



## 1. **Introducción.**

2. **Marco teórico** que analiza y describe las metodologías y técnicas actuales empleadas para obtener un realce en la visión del personal sanitario. Es crucial saber cómo se comporta la luz, el funcionamiento de los equipos de toma de datos y la reacción de las estructuras biológicas tras una interacción con un foco luminoso de características espectrales concretas.

Estudio de la evolución de las técnicas y descripción de la **situación actual** de la tecnología existente.

3. **Planteamiento de una técnica experimental.** A partir de la información recopilada se ha propuesto un experimental en laboratorio en el que se demuestre que el registro de fluorescencia es un parámetro útil para la clasificación de estructuras que, vistas bajo luz natural por el ojo humano, no son distinguibles.

**Análisis de los datos obtenidos**, que sirvan como base de desarrollo y mejora de la técnica empleada hasta la obtención de un prototipo funcional y realmente útil (futuros proyectos de investigación).

## 4. **Definición de líneas de investigación y trabajo futuras.**

Probablemente la fase más importante del presente proyecto sea el estudio de la bibliografía publicada. Una buena comprensión de la materia de estudio, junto con una buena definición del estado actual de la tecnología son dos factores claves para la planificación y el éxito de un proyecto.





La **física**, la **biología**, la **estadística** y la **informática** son las disciplinas básicas sobre las cuales se apoya el desarrollo del proyecto y que dan soporte a los puntos planteados anteriormente.



## 2 PRINCIPIOS FÍSICOS Y FUNDAMENTO TEÓRICOS

---

### 2.1 EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

*“Se denomina espectro electromagnético a la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas. Referido a un objeto, se denomina espectro electromagnético o simplemente espectro a la radiación electromagnética que emite (espectro de emisión) o absorbe (espectro de absorción) una sustancia. Dicha radiación sirve para identificar la sustancia. Los espectros se pueden observar mediante espectroscopios que, además de permitir ver el espectro, permiten realizar medidas sobre el mismo, como son la longitud de onda, la frecuencia y la intensidad de la radiación.” (1)*

El espectro electromagnético se extiende desde las menores longitudes de onda de radiación (como rayos gamma) hasta las longitudes de onda más elevadas (como las ondas radio).

Dentro del espectro, la gama de radiación o luz visible para el ojo humano se encuentra comprendida dentro del rango de 400nm-700nm.

Por bajo de estas longitudes de onda encontramos la radiación ultravioleta y por encima de éstas la radiación infrarroja.

En la siguiente figura vienen detalladas las regiones principales que encontramos en el espectro electromagnético:

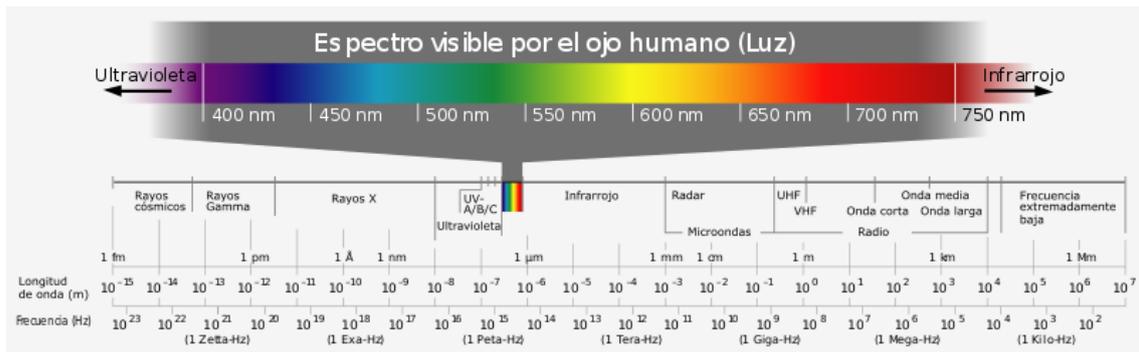


Ilustración 1- El espectro electromagnético

FUENTE: (2)

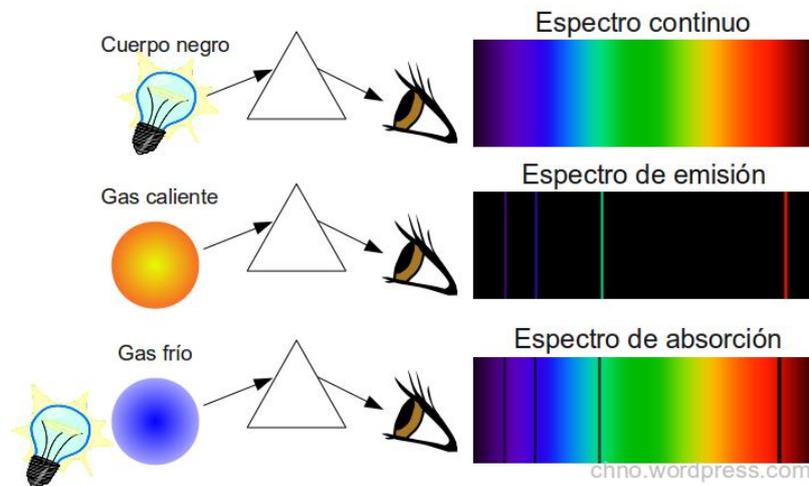


Ilustración 2- El espectro continuo, de emisión y de absorción de los materiales

FUENTE: (3)

Los colores que observamos a simple vista responden a las longitudes de onda que los objetos transmiten, no que absorben. El color que se absorbe es el color complementario al que se está transmitiendo.

Por tanto, para el estudio de la absorción de una sustancia, es conveniente emplear la fuente de radiación en la que el objeto de interés absorbe la luz y estudiar la banda de la imagen que cubra una región espectral próxima a la de la fuente de iluminación empleada.

En la siguiente tabla se detallan las longitudes de onda de los colores complementarios:

LONGITUD DE ONDA (nm)	COLOR QUE SE PERCIBE	COLOR QUE ABSORBE
390-435	AMARILLO-VERDE	VIOLETA
435-490	AMARILLO-VERDE	AZUL
490-580	ROJO	VERDE
580-595	AZUL	AMARILLO
595-650	AZUL-VERDE	NARANJA
650-780	VERDE-AZUL	ROJO

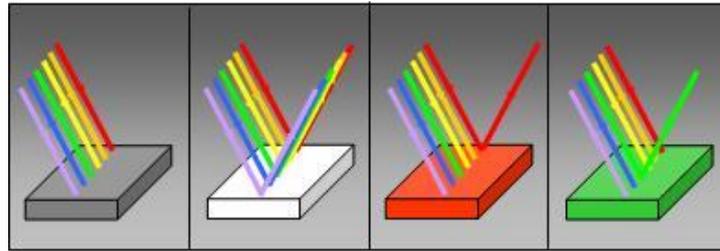
Tabla 1-Colores complementarios y sus longitudes de onda aproximadas

## 2.2 FENÓMENOS FÍSICOS DERIVADOS DE LA INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

Como consecuencia directa de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con los objetos y materiales presentes en el espacio, resultan una serie de fenómenos cuyo estudio revela información sobre la composición de éstos. Los principales, y cuyo estudio va a ayudar a realzar la visión quirúrgica, encontramos la fluorescencia, la absorción y la dispersión o *scattering*.

### 2.2.1 ABSORCIÓN

*“Cuando la luz blanca incide sobre un cuerpo éste absorbe total o parcialmente una parte del espectro y refleja o transmite (según sea opaco o transparente) una determinada gama de longitudes de onda, que constituyen su color. Es entonces cuando la energía luminosa puede convertirse en otro tipo de energías como el calor o la electricidad, o producir una reacción química como la que ocurre en la fotografía analógica y los soportes fotosensibles.” (4)*



*Ilustración 3- Fenómeno de absorción de luz*

*FUENTE: (5)*

La absorción viene determinada principalmente por los átomos y moléculas que conforman el tejido, no por la forma o estructura que éstos tienen. El principal absorbente de todo tejido orgánico es el agua, que a su vez suele ser el componente que encontramos en mayor concentración.

Cuando se pretende emplear la absorción como fenómeno de caracterización de alguna superficie, en primer lugar, se tiene que definir la ventana terapéutica de trabajo. La ventana terapéutica es pues el rango del espectro electromagnético en el cual una superficie presenta unas características que la hacen distinguible de otras superficies.

La sangre, por ejemplo, presenta unas características espectrales muy marcadas en el rango verde del espectro y por tanto el rango del verde sería la ventana terapéutica de la sangre.

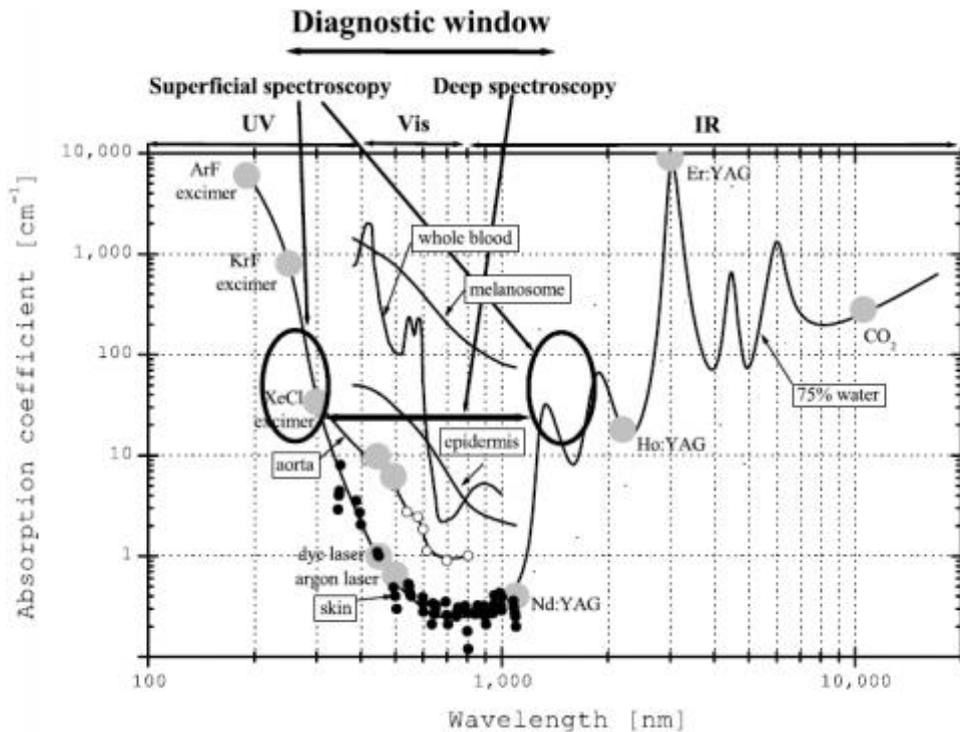


Ilustración 4-Espectros de absorción de los principales compuestos biológicos y definición de la ventana terapéutica.

FUENTE: (6)

La absorción de la sangre viene causada por la hemoglobina que ésta contiene. Cuando nos encontramos ante una patología oncológica, se observa que el contenido en sangre aumenta (aumento de la vascularización-metabolismo).

Pero, y aunque la concentración de sangre en una zona de tejido sea un muy buen identificador de presencia tumoral, como ésta absorbe una gran cantidad de luz, el espectro del resto de componentes se ve fuertemente truncado.

La presencia de sangre en muchas ocasiones es pues un gran impedimento que se encuentra en las técnicas ópticas de análisis e identificación de tejidos in vivo. (6)

## 2.2.2 FLUORESCENCIA

Es la propiedad que tienen algunas sustancias de emitir energía con una longitud de onda distinta a la que ha incidido sobre ellas.

La fuente de luz con la que se suele iluminar la muestra para conseguir este efecto es una luz fluorescente (energía) que suele tener longitudes de onda del rango inferior a la de la luz visible.

El proceso de fluorescencia vendrá pues dado por una excitación molecular de los componentes de los tejidos, una pérdida o ganancia de energía como resultado de la interacción y una emisión de energía de longitud de onda distinta al incidente.

La longitud de onda que emiten las sustancias iluminadas con una luz fluorescente (luz de excitación) suelen remitir su energía en longitudes de onda de entre 400 y 700 nm, es decir, luz visible.

Para aprovechar este fenómeno, se suele iluminar el tejido con una fuente cuya longitud de onda venga ubicada en la zona del espectro electromagnético correspondiente al azul o al infrarrojo cercano.

Esta zona del espectro provoca una excitación de los fluoróforos-cromóforos, los cuales emitirán la energía en una longitud de onda distinta a la de incidencia, mostrando un color diferente en el tejido (este color puede ser percibido a simple vista o no, ya que puede no ser lo suficientemente fuerte como para distinguirlo del resto de tonalidades presentes en el tejido, y se tendrá que aplicar un filtro de paso de las longitudes de onda que interese captar).

En la práctica médica, en ocasiones, se introducen agentes fluorescentes externos al cuerpo.

Lo que se pretenderá en el presente trabajo será aprovechar la fluorescencia intrínseca al tejido biológico humano que explicaremos en apartados posteriores.

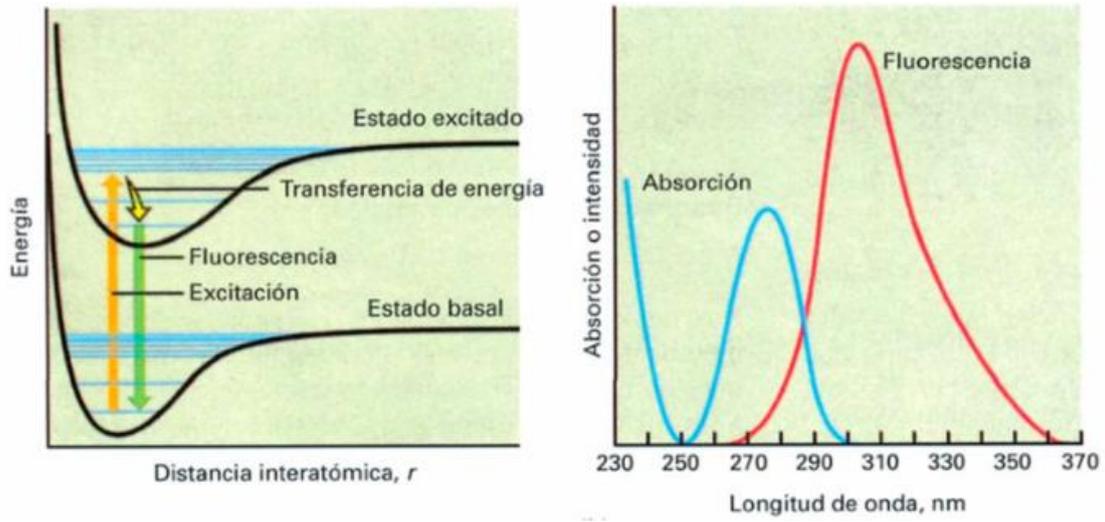


Ilustración 5- Diagramas del comportamiento de la fluorescencia

FUENTE: (7)

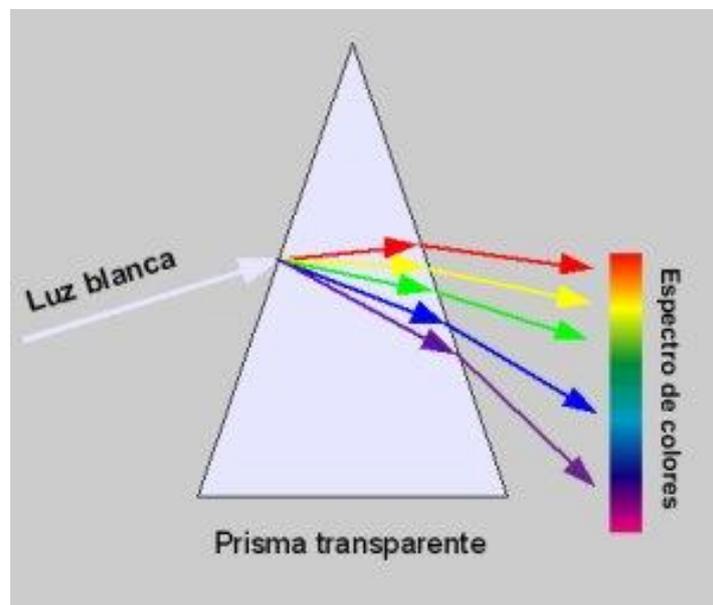
### 2.2.3 DISPERSIÓN O SCATTERING

La dispersión o *scattering* da como resultado la descomposición de una radiación en varios haces de energía sencillos.

La dispersión asociada a la luz se conoce como el fenómeno por el cual un rayo luminoso se separa en diversos colores espectrales al pasar por un prisma o dispositivo adecuado.

En este proceso, la luz atraviesa pues un medio y en su paso por éste se descomponen en las distintas longitudes de onda que lo forman.

El scattering depende directamente del tamaño, estructura y forma de los componentes del tejido y por tanto al cuantificarlo, podremos detectar variaciones en la forma o tamaño de los componentes de un tejido. (6)



*Ilustración 6-Fenómeno de dispersión lumínica*

FUENTE: (8)

Como consecuencia de los tres fenómenos anteriores, y con la ayuda de los dispositivos adecuados, podremos capturar la cantidad de luz



reflejada, la luz fluorescente o transformada tras su contacto con el tejido o medio y la luz transmitida por el tejido tras haber sido dispersada.

Todas las cantidades registradas nos brindarán información cuantitativa de la presencia de ésta en el tejido que contiene la patología o cualitativa de la patología de estudio.

El registro de la absorción, dispersión o fluorescencia que resulta de la interacción de la luz con un tejido nos brindará información que, tras ser correctamente interpretada, puede determinar la presencia de una patología en el tejido de estudio.



## 2.3 INSTRUMENTOS DE CAPTURA DE LA INFORMACIÓN

### 2.3.1 EL ESPECTROFOTÓMETRO

*“Un espectrofotómetro es un instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra.*

*Este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Esto le permite al operador realizar dos funciones:*

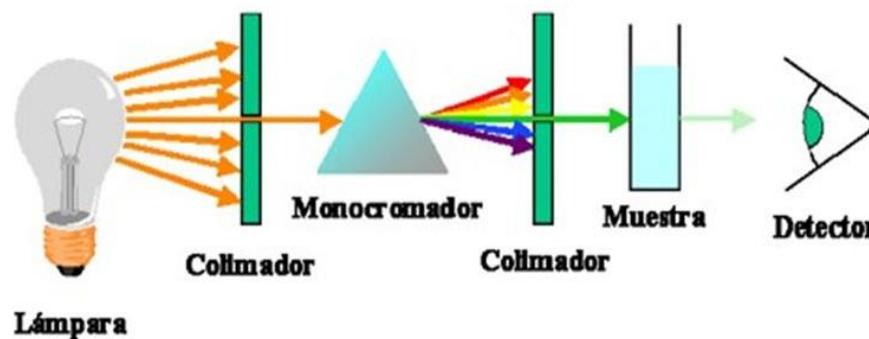
- a) dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra*
- b) indicar indirectamente qué cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra.” (9)*

Los componentes principales de un espectrofotómetro son los siguientes:

1. **FUENTE DE LUZ:** con una distribución espectral de energía continua. Las fuentes de luz más comunes son las lámparas de xenón y las lámparas LED.
2. **MONOCROMADOR:** permite filtrar la luz anterior, dando paso únicamente a unas longitudes de onda deseadas.

### 3. COMPARTIMENTOS PARA DEPOSITAR LAS MUESTRAS O SOPORTES DE APOYO DE ÉSTAS

4. **DETECTORES - FOTODETECTORES:** éstos reciben la radiación en distintas partes del espectro electromagnético visible para una misma onda de incidencia. Por tanto, caracterizan el comportamiento espectral de un material a lo largo del rango visible y para un haz de luz de incidencia de longitud de onda concreta.



*Ilustración 7- Partes y estructura de un espectrofotómetro*  
FUENTE: (10)

Para poder medir la fluorescencia, la cantidad de luz reflejada o la dispersión de ésta, en el mercado actual encontramos distintos sensores que nos permiten cuantificar sus valores.

Las cámaras digitales contienen en su interior un sensor encargado de la captura y cuantificación de la cantidad de energía que reciben tras pasar por todos los filtros que se hayan ubicado en su objetivo.

La cantidad de energía que el sensor recibe depende principalmente de los filtros que coloquemos y del tiempo de exposición del sensor a la energía, es decir, del tiempo de apertura del obturador.



### 2.3.2 SENSORES DIGITALES

A diferencia del espectrofotómetro, los sensores digitales permiten registrar la información de superficies mayores, pero no proporcionan una información espectral tan completa. Se estudiarán a continuación.



## 2.4 LA IMAGEN DIGITAL

*“Una imagen digital es una función  $F(x, y)$ , donde  $x$  e  $y$  representan unas coordenadas y el valor  $F(x, y)$ , es proporcional a la transmitancia o reflectividad de la luz, que se reconoce visualmente por el nivel de color o gris de la misma en el punto considerado  $(x, y)$ .”*

*Al proceso de obtención de imágenes digitales se le denomina digitalización y consiste en la descomposición de la imagen real en una matriz discreta de puntos de un determinado tamaño, donde cada uno tiene un valor proporcional a su nivel de color.*

*Por tanto, puede decirse que una imagen digital se puede asimilar a una matriz de  $n$  filas y  $m$  columnas. A cada celda de la matriz se le denomina pixel (picture x element) y esta representa una superficie que es función de su tamaño  $(\Delta x, \Delta y)$ . A cada pixel le corresponde uno o más valores digitales (número digital o valor digital “Nd”).” (11)*

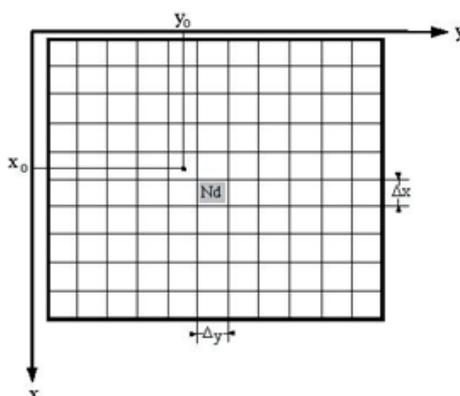


Ilustración 8- La imagen digital

FUENTE: Pérez Álvarez, Juan Antonio. Apuntes de FOTOGRAMETRÍA II. Universidad de Extremadura s.n.

## 2.4.1 LAS RESOLUCIONES DE LOS SENSORES DE CAPTURA Y DE LAS IMAGENES

En la mayoría de las ocasiones, cuando se habla de la resolución de un sensor de una cámara, se habla del número de megapíxeles y del detalle mínimo que podemos ver en la imagen. Pero, existen cuatro tipos distintos de resoluciones a tener en consideración y que se tienen que tener en cuenta dependiendo del tipo de trabajo para el que se empleará el instrumental.

Estas resoluciones son la espacial, espectral y radiométrica:

- **Resolución espacial**

Corresponde al tamaño del menor objeto identificable (12). Cuantos más píxeles contenga una imagen, menos porción del espacio se registrará en un píxel y por tanto más detalle podremos observar en la imagen.

- **Resolución espectral**

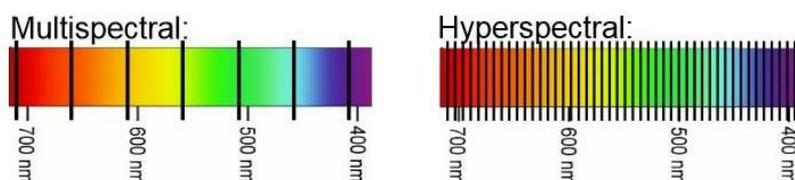
Capacidad del sensor para discriminar la radiancia detectada en distintas longitudes de onda del espectro electromagnético [5]. Cuantas más bandas sea capaz de capturar un sensor y cuanto más estrechas sean las porciones del espectro electromagnético éste pueda captar, mayor será la resolución espacial del sensor. Viene determinada por el número de bandas y por el ancho de cada una de éstas, siendo ambas características directamente proporcionales al aumento de la resolución espectral de un sensor fotográfico.

En la mayoría de los casos, cuanto mayor resolución espectral se tenga de una escena, la segmentación y clasificación de los objetos que aparecen en ésta será más sensible.

Por ejemplo, al estudiar el estrés hídrico de un cultivo, si se tiene en cuenta únicamente las bandas que corresponden con el rango visible del espectro electromagnético, podremos saber el contenido aproximado de clorofila de las hojas.

Si además tenemos en cuenta la banda que refleja el comportamiento de la hoja en el rango del infrarrojo cercano, podremos determinar la cantidad de agua que se concentra en la membrana celular de las hojas de la vegetación.

Haciendo una combinación de los dos factores mencionados, tendremos una mayor seguridad y precisión en la predicción del estado en el que se encuentra el cultivo.



*Ilustración 9- La resolución espectral. Comparativa*  
FUENTE: (13)

## - Resolución radiométrica

Es la cantidad de niveles digitales en los que se puede almacenar la información en un píxel.

Una resolución de 8 bits permitirá clasificar la energía recibida por el sensor en 255 niveles digitales diferentes.

En una resolución de 9 bits, podremos almacenar 512 niveles digitales distintos en un mismo píxel, lo cual nos permitirá tener más sensibilidad a la hora de clasificar la intensidad lumínica que capte el sensor.



*Ilustración 10- Escena idéntica captada por dos sensores con diferente resolución radiométrica  
FUENTE: (14)*

Por ejemplo, una imagen binaria tendrá una menor resolución radiométrica que una imagen RGB convencional, ya que únicamente podrá almacenar 0 o 1 en el valor de sus píxeles (blanco y negro).

Aclarados los conceptos anteriores, podremos clasificar los distintos tipos de sensores que se detallan a continuación teniendo en consideración (entre otros parámetros) algunas de las resoluciones anteriores.

En el presente trabajo será crucial una buena resolución espacial (se necesita un alto nivel de detalle) y una alta resolución espectral (que se obtendrá haciendo un filtrado de la señal captada como se detallará más adelante).

## 2.5 TIPOS DE SENSORES DE CAPTURA DE IMAGEN

El primer tipo de sensor que podemos encontrar en las cámaras digitales en un sensor ***CCD o Dispositivo de Carga Acoplada***.

*“Los píxeles del CCD registran gradaciones de los tres colores básicos: rojo, verde y azul (abreviado “RGB”, del inglés red, green, blue), por lo cual tres píxeles, uno para cada color, forman un conjunto de células fotoeléctricas capaces de captar cualquier color en la imagen.” (15)*

Los sensores CCD convierten la luz recibida en corriente eléctrica. La cantidad de electrones o de corriente eléctrica que producen es proporcional a la cantidad de fotones que inciden sobre el sensor. Cuando finaliza el tiempo de exposición del sensor, los electrones producidos son transferidos por cada una de las celdas que lo forman (detectores individuales). El sensor CCD tiene tanta cantidad de detectores individuales como píxeles contiene la imagen resultante.

Siguiendo una estructura de filtro Bayesiano, delante de cada detector individual, se coloca un filtro que deja pasar la luz roja, azul o verde de forma única. Tras ello, y por adición de colores se obtiene una representación de las escenas con colores muy similares a los que podemos ver.

También encontramos filtros de paso UV, infrarrojo cercano NIR, etc.

En segundo lugar, encontramos los sensores ***CMOS (active pixel sensor)***, que *“al igual que el sensor CCD, se basa en el efecto fotoeléctrico. Está formado por numerosos fotositos, uno para cada píxel, que producen una corriente eléctrica que varía en función de la intensidad de luz recibida. En el CMOS, a diferencia del CCD se incorpora un amplificador de la señal eléctrica en cada fotosito y es común incluir el conversor digital en el propio chip.” (16)*

Estos últimos contienen un filtro para captar la luz roja, otro para la luz verde y otro para la luz azul.

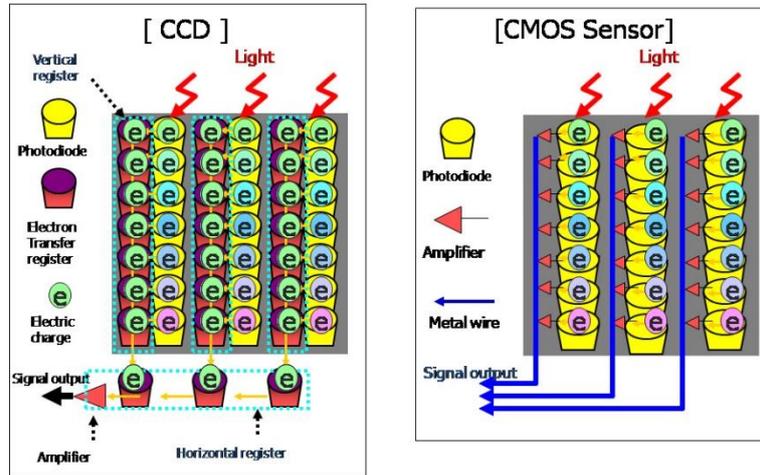


Ilustración 11- Esquema sensores CCD y CMOS

FUENTE: (17)

Por último, los sensores monocromáticos, que captan la información de la misma forma que el CCD, pero que prescinden de los filtros RGB y transforman la intensidad de luz recibida en una escala de blanco-negro.

Si queremos determinar para que trabajos o aplicaciones se adecuan más los sensores mencionados, podemos tener en cuenta los parámetros de la siguiente tabla (18):

CARACTERÍSTICAS	
CMOS	CCD
MENOR COSTE ECONÓMICO	MAYOR RANGO DINÁMICO
MEJOR RESPONSIVIDAD	MENOR RUIDO
MENOR VELOCIDAD DE CAPTURA	RESPUESTA MÁS UNIFORME
MENOR BLOOMING	

Tabla 2-Comparativa de características de los sensores CCD y CMOS



Por RESPONSIVIDAD entendemos la mínima diferencia energética recibida que puede detectar un sensor.

El RANGO DINÁMICO es el nivel de saturación de los píxeles y el umbral por debajo del cual no captan señal energética.

Cuando un píxel se satura porque capta una señal energética demasiado fuerte, puede saturar o distorsionar la señal que reciben sus píxeles vecinos, produciéndose en estos casos el BLOOMING. Este efecto es muy perjudicial, pues se distorsionará la señal de varios píxeles y se transcribirán niveles digitales que no corresponderán con la intensidad de señal que realmente está incidiendo sobre éstos.



## 2.6 TIPOS DE CÁMARAS QUE INTEGRAN LOS SENSORES

En el ámbito de la demarcación tumoral o identificación de lesiones en tejidos biológicos, encontramos un gran volumen de publicaciones que emplean cámaras hiper espectrales y multiespectrales, además de las convencionales RGB.

El principio físico de registro de la información es el mismo que el detallado en el apartado anterior (dependiendo del tipo de sensor de captura que tengan integrado), pero difieren en la cantidad de información que toman y procesan, es decir, en su resolución espectral.

Cada una de ellas

proporcionará una reconstrucción del comportamiento espectral de los elementos de la escena de forma más o menos detallada.

De entre las cámaras existentes en el mercado, las más empleadas en las aplicaciones que estudia el proyecto son:

- ***HIPER ESPECTRALES***
- ***MULTI ESPECTRALES***
- ***CÁMARAS RGB.***

### 2.6.1 CÁMARAS HIPER ESPECTRALES

Consideramos una cámara hiper espectral aquella que tiene más de 10 bandas de captura de información. Cada una de las bandas captura la radiación que emite o refleja un objeto en una parte estrecha del espectro electromagnético, pudiendo comprender partes del espectro no visible como el infrarrojo o el ultravioleta.



Además, cada una de las bandas de registro de la información es contigua a la anterior, pudiéndose reconstruir así la huella espectral de cada píxel de la imagen.

Este tipo de imágenes, aunque no revelan tanta información como tan precisa como la que pueda brindarnos un espectrofotómetro, permiten caracterizar de forma casi inequívoca (químicamente) los elementos que se encuentran en la escena.

Cuando se toman imágenes con cámaras hiper espectrales se hace referencia a espectrometría de imagen, pues se obtiene como se ha dicho una reconstrucción de la firma espectral de los píxeles que la forman.

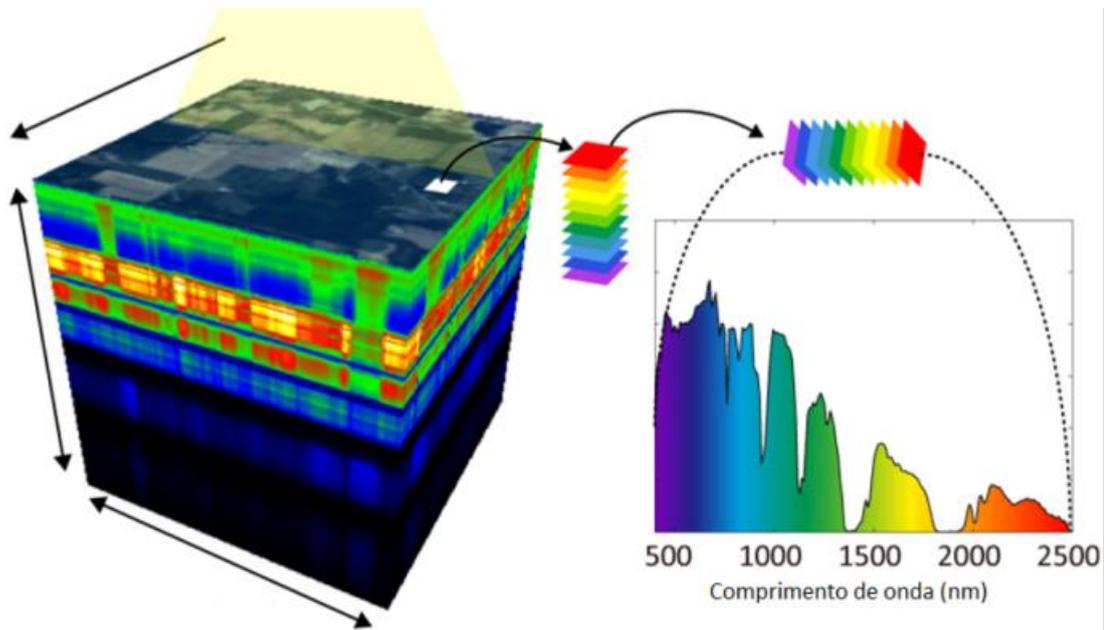
En muchas ocasiones, cuando se explica qué es una imagen hiper espectral se hace un símil a un hiper cubo, pues a cada píxel (X, Y) le corresponden tantas Z como bandas de captura sea capaz de registrar el dispositivo.

El procesado de los datos obtenidos con estos dispositivos requiere en la mayoría de las ocasiones de un análisis de componentes principales para minimizar el volumen de datos que se procesa y seleccionar de esta forma únicamente la información relevante y no repetitiva.

La principal desventaja de estos sistemas es su elevado coste.

Así pues, si capturamos imágenes de tejidos biológicos, tendremos la huella espectral de cada píxel, permitiendo deducir la presencia de elementos químicos característicos y en ocasiones sus concentraciones.





*Il·lustració 12- Estructura de una imatge hiper espectral*  
FUENTE: (19)

## 2.6.2 CÁMARAS MULTI ESPECTRALES

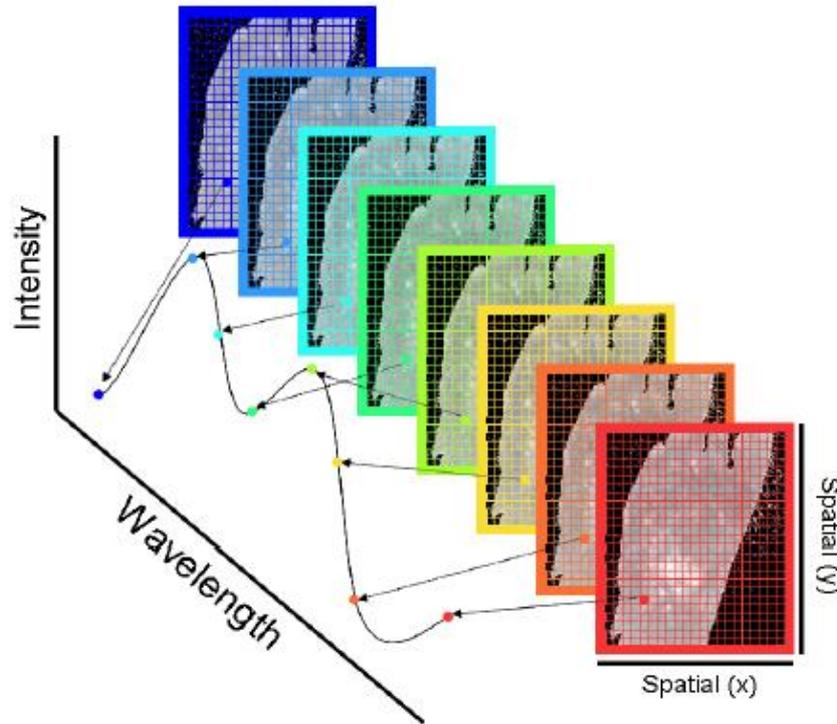
Aunque con más bandas de captura de la radiación que las cámaras digitales convencionales, las cámaras multi espectrales no superan las diez bandas de registro de información.

En muchos casos comprenden bandas que registran información en el infrarrojo cercano. En la región del espectro visible el ancho espectral de cada una de las bandas de captura es menor que el de una cámara digital convencional.

Las bandas que conforman las imágenes multi espectrales no son contiguas, dejan intervalos del rango del espectro sin cubrir y por tanto no permiten recrear la firma o huella espectral de un píxel de una imagen.

Proporcionan un tanto más de información espectral que las cámaras digitales y en el ámbito médico proporcionan un realce en la

diferenciación de los niveles de rojo (mejor identificación de tejidos inflamatorios, por ejemplo), pero en la mayoría de las aplicaciones no revelan información especialmente útil.



*Ilustración 13-Estructura de una imagen multi espectral*

FUENTE: (20)

Algunos trabajos como (21) se emplean cámaras multispectrales para el estudio de las bandas del rango visible para conseguir un realce del color. Se superpone una imagen RGB con una banda de la imagen multispectral. La superposición resulta uno a uno. El usuario escoge la banda espectral deseada y ésta se superpone a la RGB. No se pueden superponer todas las bandas de la multispectral, pues la correspondencia con la imagen convencional resulta difusa.

Adicionalmente y previa superposición de las bandas, las imágenes se ven sometidas a un procesamiento de los datos que incluye la conversión de datos al espacio de color CIE  $L^*a^*b$ , ya que se obtiene una mayor

diferencia de color entre las regiones epiteliales y la red de vascularización.

Como hemos dicho es un método de mejora de la visualización de tejidos superficiales y en el cual se mantiene el color natural de la imagen en el fondo:



*Ilustración 14- Realce del color mediante combinación de bandas de imágenes multi espectrales.  
FUENTE: (21)*

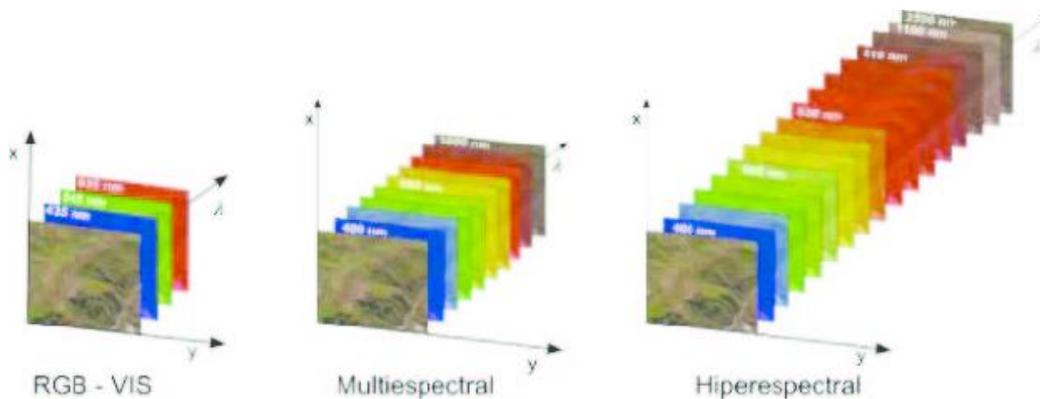
En (22) también se emplean bandas de imágenes multiespectrales para el realce de color y su visualización en falso color para realzar regiones afectadas por procesos inflamatorios. Los procesos inflamatorios vienen acompañados de un aumento de irrigación sanguínea, que a su vez absorbe mucho la luz verde. Por tanto, el estudio se centra en la diferencia de color a 550 nm (verde) en varias bandas de la imagen multiespectral.

En algunas de las aplicaciones de la técnica, se requiere un pre procesamiento de los datos con Análisis de Componentes Principales, pues se acelera el procesamiento de la imagen y se disminuye la redundancia de información, lo cual se transcribe en una reducción sistemática de ruido y error en la extracción de elementos.

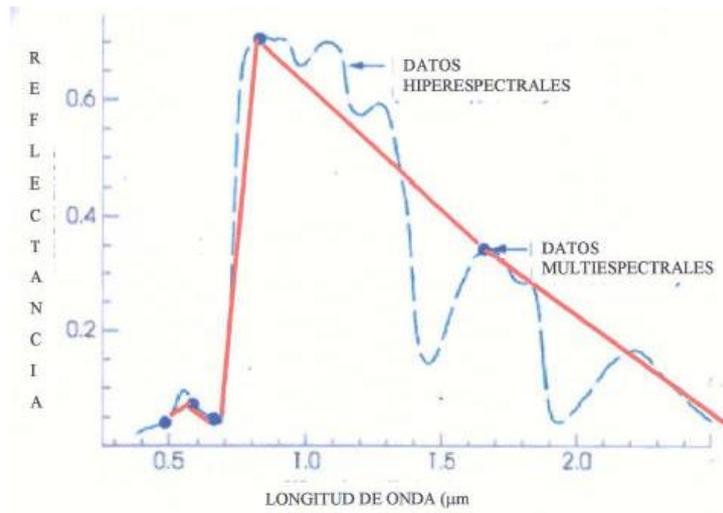
### 2.6.3 CÁMARAS RGB

Con tres bandas de captura de la información, presentan una menor resolución espectral que las anteriores. Tienen tres canales de captura: ROJO, VERDE Y AZUL. En cada uno de ellos se discretiza toda la radiación electromagnética que se registra en el sensor correspondiente a la región completa espectral de luz roja, verde o azul. Por combinación de ellas, se podrá reconstruir el color 'real' de los objetos de la imagen.

A continuación, se muestra una imagen a modo de comparativa de los tres dispositivos anteriores:



*Ilustración 15-Imágenes hiper espectrales, multi espectrales y RGB convencionales*  
FUENTE: (23)



*Ilustración 16-Reconstrucción de la firma espectral con datos multiespectrales y con datos hiperespectrales. Comparativa.*

FUENTE: (24)

## 2.7 FUENTES DE ILUMINACIÓN

En muchas ocasiones, sabemos cómo responde espectralmente una sustancia o tejido frente a una iluminación concreta. Es por ello por lo que la iluminación desempeña un papel fundamental en la espectrometría de imagen.

El estudio adecuado de la huella espectral de una imagen o subregión de ésta nos brinda en muchas ocasiones la posibilidad de identificar un objeto.

Cuanto más coherente y más pequeño sea el rango de emisión (en términos de longitud de onda) de una fuente de iluminación, con más certeza podremos analizar los resultados que hayan sido capturados por el sensor.

La obtención de un haz de luz coherente y con una determinada longitud de onda se puede conseguir de distintas formas:

- La más sencilla resulta el empleo de un **láser** cuya luz es **monocromática** y de una longitud de onda perfectamente definida. La principal problemática de empleo de éstos es la pequeña porción de tejido que este puede iluminar (haz muy estrecho).
- La segunda forma es el uso de **monocromadores o filtros de emisión**. Estos filtros se colocarán delante de fuentes de iluminación de espectro continuo como pueden ser arcos de Xenón o arcos de Mercurio. Con el uso de estos filtros es muy complicado conseguir un haz de luz caracterizado por una longitud de onda concreta. Se pueden llegar a filtrar partes del espectro de ancho hasta 10 nm, pero bandas más estrechas son difíciles de obtener.

- Por último, encontramos a **iluminación LED**, que basada en la combinación que químicos y excitación de éstos nos brindan iluminaciones de colores concretos y con anchos de banda que han conseguido acotarse hasta valores de 25-30nm.

Concretamente, y cuando el fenómeno de estudio es la fluorescencia, las fuentes de luz que se emplean suelen ser ultravioletas, bien en formato LED o bien mediante lámparas como la luz de Wood.

La luz de Wood es un haz de luz proveniente de una lámpara de mercurio y que emite en el rango de 400nm a 450nm (UV).



*Ilustración 17-Lámpara de luz de Wood*

*FUENTE: (25)*

Aunque empleada para la activación de fluoróforos, también es absorbida fuertemente por cromóforos como la melanina. Por ello, se emplea en el estudio de patologías como el vitíligo, ya que las zonas con concentración pigmentaria menor bajo la luz de Wood presentan un aspecto más blanquecino que el resto de las zonas de la piel.



*Ilustración 18- Hipopigmentación de la piel observada bajo luz de Wood*  
FUENTE: (26)



*Ilustración 19-Hiper pigmentación de la piel observada bajo luz de Wood*  
FUENTE: (27)

En la Ilustración 18 se muestra cómo el vitiligo aparece mucho más claro bajo la luz de Wood.

En la Ilustración 19, encontramos una hiper pigmentación de la piel, la cual bajo la luz de Wood se ve resaltada a causa de la mayor absorción de la luz en las zonas donde la concentración de melanina es anormalmente superior.

### 2.7.1 LA CAPTURA DE LA FLUORESCENCIA

Para la captura de señales de fluorescencia en una longitud de onda determinada, se aplicará un *filtro de paso* que únicamente deje llegar al sensor de captura los haces de energía de la longitud de onda deseada.

También resulta frecuente el uso de cámaras hiper espectrales que tienen múltiples bandas de captura de la información, correspondiendo cada una de ellas con una pequeña porción de longitudes de onda del espectro electromagnético.

Para activar o registrar la fluorescencia de una muestra, se emitirá (en la mayoría de los casos) una luz no visible para el ojo humano y se capturará una respuesta que se encuentre dentro del rango visible del espectro electromagnético, pues este es el principio clave de la fluorescencia.

Como hemos dicho, en la mayoría de los casos la fluorescencia se activa por medio de luz no visible (ultravioleta) aunque recientes estudios demuestran que la luz azul presentada de forma muy coherente puede activar este fenómeno en fluoróforos como la lipofuscina.

El registro óptimo de la información requiere pues una acotación de las longitudes de onda con las que se ilumina el tejido y las longitudes de onda que se registrarán en el sensor.

La acotación de la luz incidente se consigue colocando filtros de emisión delante de una lámpara de emisión espectral continua o empleando fuentes de iluminación monocromáticas como un láser o lámparas LED.

La acotación del rango espectral registrado por el sensor se consigue colocando filtros de paso delante del objetivo de una cámara convencional o empleando cámaras hiper espectrales que permitan seleccionar las bandas de registro que contengan la información espectral de interés.

## 2.8 ESPECTROSCOPIA DE IMAGEN

La herramienta que se emplea para la aplicación de esta técnica es un espectroscopio (o en su defecto una cámara hiper espectral), que proporcionan la información sobre el comportamiento de una radiación de longitud de onda concreta y conocida a lo largo del espectro electromagnético, tras haber incidido sobre un material o tejido.

De esta forma, sabiendo el comportamiento estándar de una onda al interactuar sobre un tejido, podremos caracterizar a éste por la forma en la que transforma o interactúa con la radiación electromagnética.

El primer ejemplo que encontramos de trabajo con esta técnica es el expuesto por *García Allende P.B* en (28). En este trabajo se diseñó una metodología para poder cuantificar las heterogeneidades de los coeficientes de dispersión y establecer una correlación con cada tipo o zona del tejido. Se emplea una fibra óptica para iluminar una muestra pequeña de tejido tumoral con una luz blanca de tungsteno y un conjunto de lentes.

La información sobre el comportamiento de la luz recibida tras interactuar con el tejido se recoge con un espectroscopio. Las longitudes de onda empleadas se encuentran dentro del rango de 510-780 nm, calculándose para varias de ellas los coeficientes de dispersión. Además, se añade un nuevo parámetro que intenta evitar los picos de absorción de la hemoglobina. Además, se combinan dos métodos de clasificación de distinta naturaleza de los datos obtenidos (método de agregación de técnicas), para así aumentar la fiabilidad de los datos clasificados, ya que únicamente los datos que se consideren como tumor en ambas clasificaciones se darán por válidos.

Se caracterizó pues la firma espectral de distintas regiones de un tumor pancreático de ratones y tras la aplicación de dos métodos de clasificación distintos, se segmentó un área de una imagen del tumor.

Así consideramos pues un primer método de segmentación de un tejido *ex-vivo*.

En (29) encontramos ahora un método basado de la misma forma en el estudio de la firma espectral para la discriminación de patologías oncológicas, diferenciándose del anterior por no entrar en contacto con ningún tipo de fibra óptica para iluminar los tejidos; ahora se emplea una lámpara led que puede iluminar con longitudes de onda concretas del NIR y una cámara digital. Además, en este estudio se estudia la frecuencia espacial dominante de cada región tanto de la luz absorbida como del *scattering* que se produce en una misma zona al iluminarse con cinco longitudes de onda distintas.

En (30) encontramos un estudio de la reflectancia difusa para medir las propiedades ópticas de los melanomas. Para ello se realiza un estudio *in-vivo* de las propiedades de absorción y esparcimiento del tejido a partir de las medidas tomadas de reflectancia difusa. Para ello se emplea como en anteriores trabajos una fibra óptica que se pone en contacto con el tejido e ilumina al anterior con luces de entre 455-765 nm. La información es capturada por un espectrógrafo y una cámara CCD. Las lesiones estudiadas se caracterizan por producir un incremento del *scattering* de la luz, pues los núcleos de las células malignas tienen un tamaño mayor que el de las células benignas.

En (31) encontramos otro estudio que se basa en el aumento del *scattering* a causa del aumento del tamaño del núcleo en células cancerosas; empleándose también un espectroscopio y fibra óptica para la toma de datos *in-vivo*.

Siguiendo una línea similar a las anteriores, en (32) se segmenta la imagen tumoral a partir de la información recogida con un microscopio diseñado para recoger directamente la imagen de *scatter* del tejido. En este caso el instrumental se encuentra limitado a una toma de datos *ex vivo* a causa de la lentitud de toma de los datos.

## 2.9 CARACTERÍSTICAS DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS - TUMORALES

La forma en la que se propaga un haz lumínico al incidir sobre un tejido es un parámetro que puede ser empleado para caracterizarlo e identificarlo.

Cuando el haz de energía entra en contacto con un tejido biológico, se desencadenan distintos procesos de absorción, dispersión y aparición de fluorescencia resultante de la excitación de las moléculas que lo forman.

Los fenómenos de absorción y fluorescencia dependen de la composición química de las partículas. Los componentes de los tejidos responsables de la aparición de los mencionados fenómenos se denominan CROMÓFOROS.

Algunos de los más importantes y que son responsables de la absorción de la luz visible son la sangre y la melanina, cuyos coeficientes de absorción decrecen conforme incrementamos las longitudes de onda de los haces incidentes.

Los cromóforos más significativos en cuanto a la absorción de las longitudes de onda comprendidas en el rango UV, son las proteínas y los aminoácidos. El principal cromóforo que provoca la absorción de las longitudes de onda comprendidas en el rango IR es el agua. (33)

Por otra parte, el fenómeno de dispersión depende de la forma y tamaño de la partícula sobre la cual se incide, es decir, de la textura del tejido. Este fenómeno aparece en el punto en cual el índice de refracción del medio cambia.

Cuando un haz de luz incide sobre un tejido, puede penetrar más o menos en su superficie, dependiendo esto de la longitud de onda del haz (a mayor longitud de onda, menor penetración del haz de energía sobre el tejido de incidencia). Además, también depende de cuánta luz

sea capaz de absorber el tejido, ya que cuanto más luz absorba el tejido, menor será la cantidad de luz que pueda penetrar en éste.

Como ya se ha introducido, los anteriores fenómenos permiten identificar tejidos. Por ejemplo, el espectro de absorción de la sangre en un momento dado nos permitirá revelar la concentración y la saturación de hemoglobina, parámetros están asociados a patologías oncológicas: la angiogénesis y el hiper-metabolismo. (34).

En cuanto al fenómeno de fluorescencia, viene provocado por los FLUORÓFOROS. Los más abundantes en la matriz celular son el colágeno y la elastina. Los principales fluoróforos presentes en el proceso de metabolismo celular son la NADH, FAD y lipo-pigmentos.

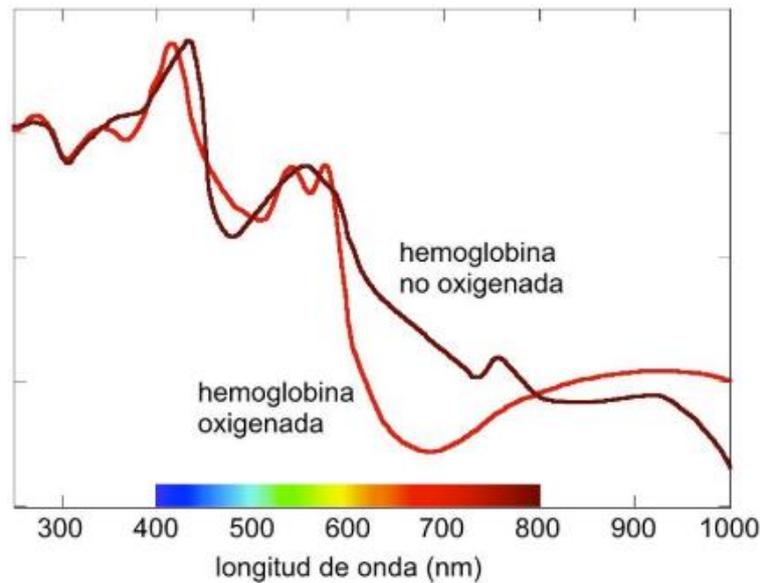
Por ejemplo, si se hace incidir sobre el colágeno un haz cuya longitud de onda venga comprendida entre 300-400 nm, la energía que rebote de éste vendrá caracterizada por una longitud de onda de entre 400 y 600 nm. De esta forma, se podrá distinguir por ejemplo tejido epitelial del conectivo. (34).

Como las células en estadios cancerosos tienen un metabolismo distinto a las células normales de su misma clase, podremos aprovechar la propiedad de fluorescencia para intentar realzar las zonas de tejido en las que se encuentren las primeras. (34).

Se han sintetizado diversos fluoróforos artificiales y contrastes que pueden ser inyectados en el paciente y que se adhieren a un tipo de células o moléculas concretas, permitiendo así la identificación de éstas cuando son excitadas por una energía concreta. Los más comunes son el 5-ALA y el VERDE DE INDOCIANINA. Ejemplos del uso de éstos los encontramos en (35), (36), (37), (38), (39), (40), (41), (42) y (43).

Aunque no se clasifica como fluoróforo (pues no presenta el fenómeno de fluorescencia), la hemoglobina es un cromóforo presente en casi la totalidad de tejidos biológicos. La hemoglobina oxigenada absorbe fuertemente luz infrarroja y deja pasar la luz roja. Por el contrario, la

hemoglobina desoxigenada tiene el comportamiento contrario, absorbiendo la luz roja y reflejando la luz infrarroja.



*Ilustración 20-Huella espectral de la hemoglobina*

FUENTE: (44)

Por tanto, el estudio de las ratios de absorción y concentración de la hemoglobina también juegan un papel trascendental en la identificación de lesiones, pues pueden caracterizar de forma precisa un aumento en el metabolismo (y por tanto un aumento de la irrigación sanguínea). El espectro de máxima absorción de la saturación de oxígeno de la hemoglobina permite identificar dos procesos característicos en procesos oncológicos (angiogénesis e hipermetabolismo).

Por ejemplo, en (45) se emplea una cámara multispectral para calcular mediante correlaciones de distintas bandas, la saturación de oxígeno que existe en el tejido durante un trasplante uterino (en conejos). La saturación de oxígeno viene dada en este caso por una relación entre la cantidad de hemoglobina oxigenada y hemoglobina desoxigenada que se registra. Como resultado final se ofrece un mapeado en tiempo real de la saturación de oxígeno de las distintas partes del lecho quirúrgico.



Autores de referencia como Khaodhimar han planteado múltiples experimentales que intentan aprovechar la sangre como parámetro identificador de patologías. En uno de los métodos, se planteó una medición de la REFLEXIÓN característica de la luz en los márgenes tumorales. Para ello se calculaba una ratio a través de fórmulas empíricas de la relación entre la luz roja y la infrarroja (ratio I/IR).

La presencia de sustancias (cromóforos-fluoróforos) en cantidades distintas a las habituales resultan de la aparición de una actividad metabólica anormal, y su análisis permite identificar la presencia de lesiones en los tejidos.



## 2.10 LA AUTOFLUORESCENCIA

La auto fluorescencia es un caso particular del fenómeno de fluorescencia. Cuando se habla de dicho fenómeno se hace referencia a la capacidad intrínseca que presentan algunos compuestos naturales de los tejidos biológicos y que consiste en la emisión de una luz en el espectro de longitudes de onda comprendidas entre los 500 y 700 nm bajo la influencia de luces con longitudes de onda más cortas.

Numerosos estudios que podemos encontrar en la bibliografía del presente trabajo explican cómo en los tejidos biológicos encontramos moléculas que, cuando un tejido se encuentra sano y libre de cualquier patología, tienen unos patrones de concentraciones estándar. Por tanto, sabiendo cuáles son esas concentraciones y sabiendo cómo responden dichas sustancias bajo la presencia de una luz que las excite, podremos detectar cambios en la concentración de éstas.

Si bien resulta complicado dar una cuantificación exacta de la variación en la concentración, el simple hecho de encontrar una diferencia puede dar un atisbo de que una lesión se encuentra presente.

Las variaciones en la cantidad de fluorescencia que se registra cuando una lesión se presenta en un tejido pueden ser de aumento o disminución.

En muchos casos, la señal de fluorescencia producida por el tejido tiene una intensidad bastante baja y es frecuente el empleo de tubos fotomultiplicadores acoplados frente al sensor de captura que permiten intensificar la señal que se pretende capturar.

Sin entrar en profundidad en cuestiones biológicas, vamos a explicar un ejemplo claro que permita entender cómo la variación en la concentración de ciertas moléculas puede servirnos de ayuda en el diagnóstico de una lesión:



NADH y NAD<sup>+</sup> son dos coenzimas presentes en las células del cuerpo humano. Estas coenzimas desempeñan un papel fundamental en la síntesis molecular de nutrientes y en la obtención de energía entre otras.

Por tanto, juegan un papel clave en el metabolismo celular y como hemos indicado en apartados anteriores, una de las características de las células tumorales es su hiper metabolismo.

Las proporciones de concentración de estas dos coenzimas viene definida por la ratio NAD<sup>+</sup>/NADH y en tejidos sanos de mamíferos esta proporción suele ser aproximadamente de 1. Por tanto, sus concentraciones suelen ser similares.

En realidad, las coenzimas tienen carácter simbiótico, pues una de ellas es la forma oxidada de la otra. Cuando por ejemplo la glucosa se oxida y libera energía, ésta se transfiere al NAD<sup>+</sup> mediante la reducción a NADH (ciclo de Krebs).

Así pues, los electrones que adquiere en NADH se transportan al interior de las mitocondrias celulares y así la energía que éste contiene permite seguir el ciclo de vida biológico habitual de éstas.

Ambas coenzimas presentan propiedades fluorescentes. Ambas absorben luz ultravioleta, siendo NADH la que presenta una mayor absorción de dicha energía. Además, esta última tiene un pico de emisión a 460 nm mientras que el NAD<sup>+</sup> no emite luz en el rango visible.

De esta forma, cuando un tumor se ilumina con luz ultravioleta, la intensidad de fluorescencia medida a 460nm decrece significativamente. La interpretación de este fenómeno es simple. El hiper metabolismo celular provoca que la ratio de concentración de las anteriores coenzimas se altere.

De esta forma, la coenzima fuertemente fluorescente (NADH) suele disminuir en su concentración, provocando una disminución en la



fluorescencia del tejido maligno respecto la fluorescencia normal que remite el tejido sano circundante.

En el caso anterior, encontramos una disminución de la fluorescencia, pero, en las células también encontramos la presencia de porfirinas, que tienen una emisión de fluorescencia en la región roja del espectro bajo la iluminación con fuentes ultravioletas.

Las porfirinas endógenas tienden a acumularse en tejido maligno y además su presencia se incrementa en las células circundantes (márgenes) al tumor.

En la mayoría de los trabajos y como ejemplo en [51], se suelen emplear ratios que relacionan la energía captada por los sensores en distintas bandas del espectro. Esta metodología se conoce como “*dual peak fluorescence study*”.

Además, en la mayoría de los trabajos se estudia de forma complementaria el aumento de irrigación sanguínea, ya que es un indicador claro de presencia tumoral (hipermetabolismo y por tanto aumento de vascularización capilar para el aporte de nutrientes).

A continuación, se muestran los fluoróforos cuyos cambios en concentraciones aportan información relevante a la hora de diagnóstico de lesiones.

En la tabla se muestra el compuesto y las longitudes de onda de excitación y emisión idóneas para su estudio.

<b>FLUORÓFORO ENDÓGENO</b>	$\lambda$ excitación (nm)	$\lambda$ emisión (nm)
<b>ENZIMAS Y COENCIMAS</b>		
NADH	290-351	440-470
FAD, FLAVINAS	450	535
NADPH	336	464
<b>PROTEINAS ESTRUCTURALES</b>		
COLÁGENO	325-36	400-405
KINURENINA	360	480
QUININA	380	450
MELANINA	UV	540
ELASTINA	290-325	340-380
<b>AMINOÁCIDOS</b>		
TRIPTÓFANO	280	350
TIROSINA	275	300
FENILANINA	260	280
<b>VITAMINAS</b>		
VITA - RIBOFLAVINA	327	510
VIT K	335	480
VIT D	390	480
PRIOXIDINA	332-340	400
PIRIDOXAMINA	332-340	400

Tabla 3- Comportamiento espectral de los principales fluoróforos endógenos

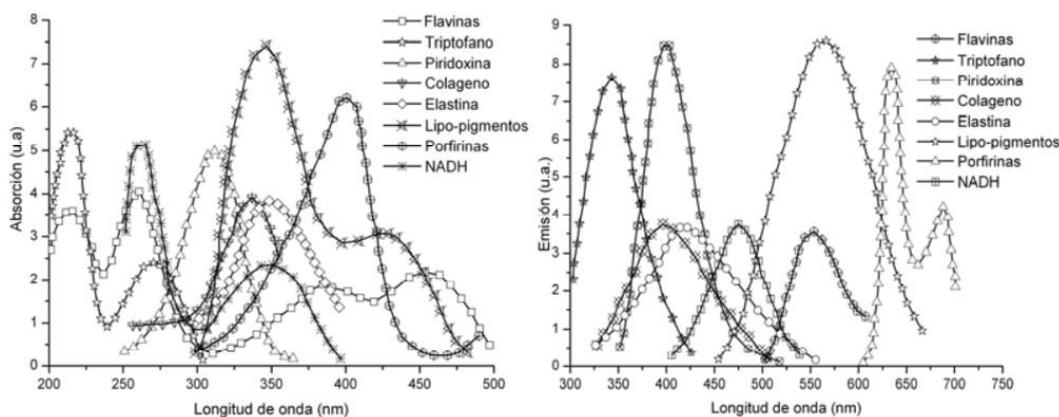


Ilustración 21-Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de fluoróforos endógenos.

FUENTE: (46)

## 2.11 APLICACIONES DE LA AUTO FLUORESCENCIA EN LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS

La excitación de los fluoróforos endógenos se ha demostrado como herramienta útil en los siguientes órganos y tejidos:

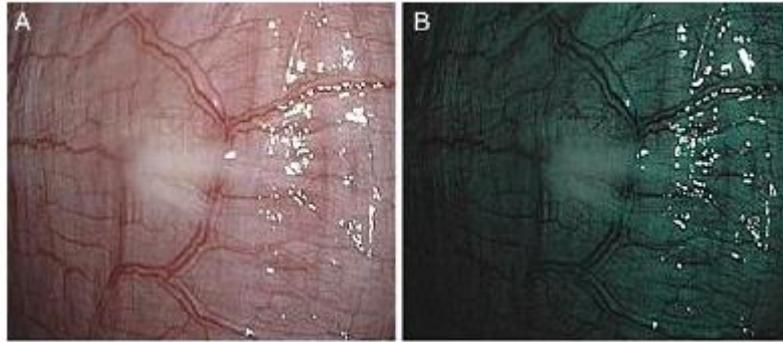
- **PIEL:** la disminución de la fluorescencia en los melanomas resulta producto del aumento del colágeno y la hiperpigmentación del tejido bajo una luz de excitación de 335nm, como se detalla en (47). Otros estudios (48) avalan la eficacia y sensibilidad de la auto fluorescencia en la detección temprana de hiperpigmentaciones y presencia anómala de concentraciones melanocíticas.



*Ilustración 22-Imagen normal VS imagen auto fluorescencia carcinoma cutáneo (con aplicación de pomada potenciadora de fluorescencia)*

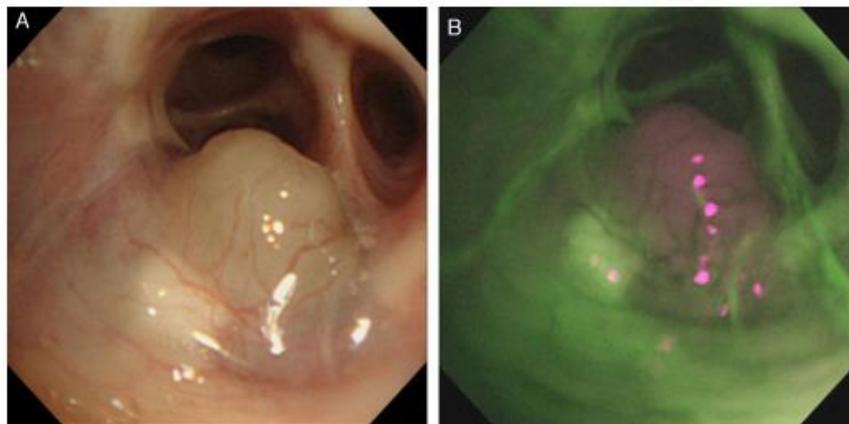
FUENTE: (48)

- **VEJIGA Y TRACTOS URINARIOS:** la auto fluorescencia de la vejiga bajo una excitación de 308nm ha sido estudiada en (49). En dicho artículo también se detalla el uso de una ratio de intensidades de fluorescencia en emisión a 358 y 455 nm bajo una luz de excitación de 337 nm. En (50) , (42) y (51) encontramos más aplicaciones de la técnica en el ámbito de la urología.



*Ilustración 23- Imagen de auto fluorescencia de micro metástasis peritoneales*  
FUENTE: (50)

- **BRONQUIOS:** en (52) se detalla que la combinación de la auto fluorescencia emitida en el rango rojo y verde del espectro electromagnético proporciona alta sensibilidad en la detección de las lesiones neoplásicas intraepiteliales.



*Ilustración 24-Imagen de broncoscopia de auto fluorescencia*  
FUENTE: (53)

- **CIRUGÍAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL:** se demuestra en (54) la utilidad de la auto fluorescencia en el tejido de colon bajo combinación de imágenes tomadas con luces de excitación de 330, 370 y 430 nm. Se permite la diferenciación sensible de pólipos adenosos y pólipos hiperplásicos del tejido normal de colon.

- **CABEZA Y CUELLO:** usándose una cámara CCD de color convencional, se han podido en (55) tomar datos bajo una luz de excitación de 300nm que permiten hacer un cálculo de una ratio en emisiones del tejido en 330 y 470nm.
- **PECHO:** en (29) y (56) se demuestra que la auto fluorescencia permite detectar los mismos cambios en los tejidos neoplásicos del epitelio mamario, aunque con mucha menos intensidad que con un contraste exógeno introducido en el organismo horas antes de la operación.
- **CEREBRO:** en este caso, aunque se encuentran puntos de fluorescencia intrínseca que permiten detectar meningismos con un 50% de sensibilidad, como se trata de un tejido muy sensible, en (57) se considera un riesgo no introducir ningún agente fluorescente exógeno para realizar la extirpación completa del tejido tumoral. En (58) se garantiza la mayor eficacia quirúrgica si se inyecta un colorante externo (5-ALA) horas antes de la intervención. En (59) aseguran una eficacia en la extirpación de neoplasias cerebrales del 98% al aplicar dicho colorante externo.
- **BOCA y LARINGE:** estudios recientes en odontología demuestran que las caries y la mucosa bucal responde efectivamente ante iluminación azul.

En (60) se describe la metodología endoscópica con uso de iluminantes azules y verdes que producen una fluorescencia en el tejido maligno y un aumento de la resolución en la visualización de las venas; permitiendo asociar en ciertas ocasiones un aumento de la irrigación sanguínea zonal con una pre-malignidad (aumento del metabolismo y celular por el mayor aporte de nutrientes a través de la capilarización).



Conviene resaltar que en la bibliografía aparecen muchos más estudios de la utilización de técnicas auto fluorescentes, pero difieren en el propósito del presente trabajo por emplear espectrofotómetros y fibras ópticas de contacto para la iluminación de una zona muy restringida del lecho de diagnóstico.

En (36) se explica detalladamente la influencia y el por qué cada uno de los fluoróforos endógenos son útiles para la identificación y diagnóstico de cada una de las patologías tratadas.

En algunos estudios como (61) se emplean fuentes de iluminación violetas, azules y verdes, que en ocasiones y combinándose pueden servir (junto con el cálculo de ratios) para excitar ciertos fluoróforos.

Aunque haciendo uso de endoscopio, en (62) se mejora la detección de lesiones precancerosas de laringe mediante el registro de la fluorescencia verde que éstas presentan tras ser excitadas con una fuente de luz (arco de Xenón) que emite luz de onda corta en el rango de los 375 a 440 nm.

El filtro que se empleó en la óptica del sensor de captura de la imagen bloquea la entrada de luz con longitud de onda menor a 440 nm.

De esta forma, las zonas con lesiones como la queratosis (aumento de la concentración de queratina) presentan una tonalidad verdosa más brillante que la mucosa sana.



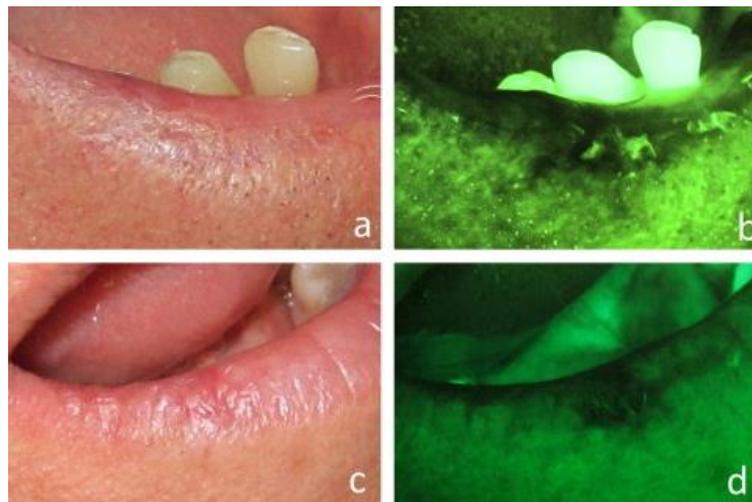


Ilustración 25- Imágenes de auto fluorescencia de mucosas bucales con áreas patológicas  
FUENTE: (63)

- **GINECOLOGÍA - OVARIO:** En (41) y (64) se estudia la disminución de la fluorescencia en regiones ováricas con mayor irrigación sanguínea a causa del aumento de hemoglobina. También se emplea la técnica de toma de imágenes multispectrales para la monitorización del oxígeno en los tejidos durante trasplantes uterinos animales.
- **OFTALMOLOGÍA:** el uso de la auto fluorescencia del fondo del ojo como valor de diagnóstico de desprendimientos y glaucomas retinianos se ha incrementado de forma considerable en los últimos años. El fluoróforo de estudio principal es la lipofuscina, que cuando se presenta una lesión en los nervios o fondos del lecho retiniano aumenta su fluorescencia cuando es iluminada con un láser azul.

En este campo es muy importante el estudio y comparación de la imagen de auto fluorescencia obtenida con unos patrones de concentración estándar de la molécula en el fondo del ojo. Un aumento de lipofuscina y por tanto un aumento de la fluorescencia puede indicar la presencia de una lesión, pero no necesariamente, pues cuando el ojo se ha

expuesto a altas intensidades lumínicas la concentración de lipofuscina aumenta de forma temporal y no conlleva una patología posterior.

Por tanto, cuando la fluorescencia ha aumentado es muy importante comparar con patrones de aumento de fluorescencia retiniana en lesiones malignas. Es cuando la fluorescencia del fondo del ojo decrece, cuando encontramos indicios claros de daños en las estructuras oculares. El descenso en este caso de la actividad metabólica de los fotorreceptores (encargados de la síntesis de lipofuscina) implica en la mayor parte de casos una atrofia del disco óptico que puede desencadenar en una pérdida de visión si no se ha tratado precozmente.

Estudios como (65) (66) (67) (68) y (69) detallan la técnica, su viabilidad y aplicación al diagnóstico de diferentes patologías oculares.

Si bien en la gran mayoría de artículos se hace uso de luces de excitación caracterizadas por longitudes de onda del espectro no visible, se han encontrado estudios que avalan el uso y combinación de luz azul y verde para detectar cambios en la fluorescencia de algunas mucosas.

En áreas esofágicas, la iluminación azul provoca cambios en la fluorescencia del tejido emitida en las regiones verde y roja.

En algunos trabajos se estudia conjuntamente el comportamiento de la auto fluorescencia junto con las diferencias de absorción de los tejidos y estructuras de interés cuando una fuente de iluminación es introducida en el estudio. Cuantos más factores o parámetros se estudien para clasificar e identificar lesiones, se podrá obtener una clasificación más precisa.

## 2.12 SISTEMAS COMERCIALES

Como sistemas ópticos de detección de patologías (principalmente cutáneas) encontramos los siguientes instrumentos:

### - VELSCOPE

Aprovechando unos iluminantes de luz violeta y azul, empleando filtros de paso y aplicando regresiones logarítmicas, ayuda al diagnóstico de malignidades bucales y epiteliales pequeñas, de unos 2 cm \* 2 cm aproximadamente.

El principio físico que aprovecha el instrumental es la fluorescencia (aumento o descenso de ésta en la mucosa estudiada)

Un ejemplo de aplicación de esta patente la encontramos en (70), intentando realzar la visualización de neoplasias bucales para mejorar su diagnóstico temprano.

Autores como Roblyer en (71) discuten alternativas a VELscope basadas en la relación de zonas de referencia (ROI's) de imágenes microscópicas y macroscópicas.

### - SIASCOPY

Se basa en la cuantificación de las concentraciones de melanina, hemoglobina y colágeno aprovechando una fuente de iluminación y un sensor que capta las variaciones de la luz incidente que el tejido retorna. El principal principio en el que se basa es la determinación del scattering y del cambio en la coloración del tejido. (72)

Empleado en el diagnóstico de patologías de la piel.



## - **MINIFLARE**

El sistema de medida de éste es similar a los anteriores. Está formado por dos iluminantes de 700nm y 800nm, una cámara de vídeo a color, una cámara digital y una cámara que permite la captura de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano. (56)

## - **MELAFIND (MELANOMA DETECTION)**

El sistema permite capturar una imagen con 10 bandas espectrales que cubren desde las regiones azules del espectro electromagnético hasta la región del infrarrojo cercano. Se trata de un dermatoscopio de contacto con una inmensa base de datos de melanomas para la comparación del comportamiento de éstos en las bandas con la imagen que se está tomando y poder determinar si es patología o no. (73)



## 2.13 RESUMEN

Las imágenes multi-espectrales e hiper-espectrales encuentran sus inicios en el campo de la teledetección y toma de imágenes por satélite, siendo sus aplicaciones principales el control de la vegetación y la agricultura de forma remota.

En 1988 podemos encontrar los primeros indicios de uso de cámaras con bandas de captura NIR, R,G,B y combinación de éstas para el cálculo de ratios de reflectividad que permitían identificar características de las quemaduras en tejidos humanos. Aquí empieza el uso de la técnica de imagen multi-espectral e hiper-espectral en el ámbito de la medicina.

Son muchos los avances obtenidos en este campo y actualmente sus aplicaciones engloban

- el diagnóstico no invasivo de lesiones patológicas
- el guiado de cirugía en tiempo real (delimitación de márgenes tumorales o mapeado de vascularización entre otras)

En las dos anteriores, el rango espectral estudiado engloba la región UV (ultravioleta), el rango visible y en ocasiones el NIR (infrarrojo cercano).

La tecnología hiper-espectral cubre una porción continua del espectro y por tanto proporciona una mayor resolución espectral que la tecnología multi-espectral.

Es conveniente resaltar que, dada una mayor longitud de onda de incidencia, menor es la penetración del haz de luz en el tejido, y por tanto menos características internas de éste se verán plasmadas en el retorno del haz. Es decir, la luz ultravioleta tiene una mayor penetración que la luz visible.

Los fenómenos físicos que permiten la caracterización de tejidos biológicos a través de su registro en sensores de captura de imagen son la dispersión, la absorción y la fluorescencia.

Cuando encontramos una fuente de luz que incide sobre un tejido biológico, se producen fenómenos de *absorción* y *dispersión* de ésta. Dichos fenómenos vienen asociados a la composición del tejido.

Tanto la absorción y la dispersión que se producen en los tejidos, vienen condicionada por la concentración de hemoglobina, melanina y volumen de agua presente.

Los principales absorbentes en el rango UV son las proteínas y aminoácidos. Por el contrario, en el IR, el principal absorbente es el agua.

La **DISPERSIÓN** de la luz incidente se incrementa al encontrar un límite morfológico en el tejido, ya que cambiará el valor del índice de refracción de éste.

Cuando se produce un cambio en los componentes internos de los tejidos, la absorción de la luz también cambia, pues esta se ve condicionada por la composición molecular de los materiales. Por tanto, si el índice de refracción cambia, la energía que llegará al sensor también tendrá valores distintos.

La **ABSORCIÓN** de la luz incidente también responde a una diferencia en la cantidad de luz reflejada por el tejido, y por tanto en una diferencia de energía captada por el sensor.

Como la saturación y concentración de oxígeno en sangre en la hemoglobina responde a dos espectros claramente diferenciables, estudiando dichos espectros podremos identificar dos fenómenos

asociados a patologías oncológicas: angiogénesis e hiper-metabolismo (aumento de la irrigación sanguínea en una parte del tejido).

La hemoglobina oxigenada, es un gran absorbente de luz infrarroja, pero refleja luz roja. La hemoglobina desoxigenada, es un gran absorbente de luz roja pero reflector de luz infrarroja.

Calculando la ratio entre la cantidad de luz roja e infrarroja reflejada, podremos averiguar si una actividad hiper-metabólica se está desencadenando en una parte del tejido.



El tercer fenómeno físico de estudio es la **FLUORESCENCIA**. Si ésta viene provocada por cromóforos endógenos al cuerpo humano, nos encontramos ante un fenómeno de auto-fluorescencia.

Ahora bien, cuando se registran los anteriores fenómenos mediante un sensor de captura de imagen digital, la información que obtenemos se puede interpretar como:

- Imágenes de reflectancia, que detectan cambios en la dispersión y absorción y por tanto cambios estructurales del tejido.
- Imágenes de fluorescencia, que detectan cambios en la composición bioquímica, revelando cambios en los niveles de concentración de fluoróforos internos.

La captura de señal electromagnética rebotada por los tejidos a través de una cámara digital se ve complementada con la espectrofotometría, la cual ayuda a crear un catálogo de patrones de respuesta característicos de cada tipo de tejido-estructura y sus componentes en forma de respuesta espectral para distintas fuentes de iluminación.

Así, si se tienen patrones estandarizados del comportamiento espectral de un tejido sano, por comparación de éstos con una imagen del tejido de estudio, se podrán obtener, incluso de forma semi automatizada, regiones en las cuales haya presencia de una lesión no identificable en condiciones habituales de visión.

Si sabemos las zonas del espectro que caracterizan a cada sustancia, sabremos que partes del espectro (ventanas terapéuticas) tendremos que captar para identificar anomalías.

Ahora bien, en la tecnología usada actualmente, tal y como hemos apuntado anteriormente, podemos diferenciar claramente dos ramas:

- I. La empleada en el diagnóstico y tiene un tiempo de procesado un tanto demorado.
- II. Aquella usada en tiempo real y que sirve como apoyo en el guiado de cirugías.

En ambos casos los sistemas empleados suelen estar compuestos principalmente por:

- Una fuente emisora de luz.
- Un sensor receptor de luz.
- Filtros para la polarización, dispersión y filtrado del haz de luz emitido y de la señal recibida.

Si el registro de la información se hace con sensores multi o hiper espectrales, los datos suelen llevar asociados un tratamiento de componentes principales previo a su análisis. Esto se aplica para obtener una reducción de la dimensionalidad y normalización de la información a analizar.



Si hablamos del aprovechamiento de la fluorescencia como parámetro de estudio, cabe remarcar que en el trabajo se han estudiado principalmente aquellas metodologías que no emplean el suministro de agentes externos para provocar un realce de color o aumento de la fluorescencia, ya que como se ha dicho anteriormente, buscamos una técnica completamente no-invasiva.

En cuanto a la tecnología empleada en el diagnóstico precoz de lesiones, encontramos ya equipos que se encuentran a la venta, como son MelaFind y MICRO-FLARE. Ambos son de aplicación cutánea y dermatológica, ayudando al diagnóstico efectivo de melanomas en la piel. También se basan en el empleo de tecnología hiper-espectral, no multi-espectral.

Otros ámbitos de aplicación de la tecnología para la detección precoz de lesiones han sido: en colonoscopias, en seguimiento de la saturación de oxígeno de los tejidos casi en tiempo real (laparoscopias en trasplantes de útero), detección de venas subcutáneas, etc.

Actualmente, el guiado en tiempo real de cirugías no se encuentra claramente definido; si bien en muchos artículos se detallan metodologías para la adquisición y procesado de estos datos, se suele encontrar la problemática del tiempo en que tardan los sistemas en tomar y procesar el volumen de datos (las imágenes hiper-espectrales llegan a tener hasta 200 bandas).

La tecnología más efectiva encontrada ha sido la metodología ya patentada “DLP hyperspectral imaging system”, la cual se basa en un software que permite emisión automática de una luz concreta que ilumine el tejido de trabajo y un sistema de procesado automático mucho más rápido que los anteriores y en sistema de vídeo.

Esta tecnología aumenta la eficacia en cuanto al tiempo de procesado gracias a la toma de tres únicas imágenes por segundo en tres bandas





claramente definidas y escogidas por el usuario (juego con la fuente de iluminación).

El empleo de imágenes multi-espectrales en sí se suele emplear para obtener un pequeño realce del color o para determinar mapas de inflamación.

Otro de los problemas que se plantea cuando se emplean dos fuentes de toma de datos distintas como puedan ser una cámara con alta resolución espacial y un sistema con alta resolución espectral es la correlación de los datos, es decir, la superposición exacta de dos imágenes de una misma zona de forma automática.

Por ello, se ha pensado en una combinación de todas las técnicas anteriores: se intentará tratar la iluminación y caracterización de algún tipo de tejido de tal forma que con una cámara empleada convencional con canales de toma RGB, se puedan realzar algunas características intrínsecas de los tumores para delimitar los márgenes de éstos y evitar así la problemática en la posterior superposición de imágenes provenientes de dos sistemas independientes.

Escoger el iluminante correcto y el filtro que permita el registro de únicamente el rango del espectro electromagnético de interés será crucial para obtener información que pueda ser discriminativa.

Se intentará tratar la información captada en RGB como si fuese información multi o hiper espectral, abaratando los costes del mecanismo y simplificando los algoritmos de correlación entre imágenes.

Además, como el volumen de datos no se incrementará sustancialmente, el procesado en tiempo real o con muy poca demora en la visualización puede ser posible.





La auto-fluorescencia y las diferencias de absorción de un tipo concreto de luz por parte de los tejidos biológicos será finalmente el parámetro de estudio del proyecto, pues podremos aprovechar cámaras RGB y no se necesitará suministrar ningún fármaco ni tinción a los especímenes de estudio.



### 3 EXPERIMENTAL EN LABORATORIO

---

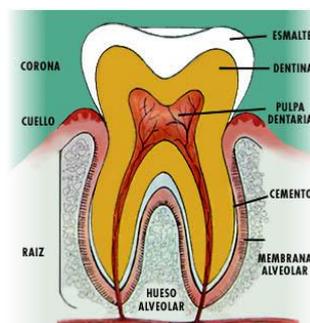
Como consecuencia de la anterior recopilación de información, se ha planteado un experimental a nivel de laboratorio con el cual se demostrará cómo la auto fluorescencia que presentan algunas estructuras biológicas puede ser una herramienta de identificación y demarcación de lesiones.

Para realizar lo anterior se ha seleccionado la fluorescencia de los dientes (dentina) cómo parámetro de estudio.

El diente está formado por una estratificación de materiales perfectamente conocida tal y como se muestra en la Ilustración 25.

La capa de dentina presenta una fluorescencia roja cuando es iluminada con luz azul-verdosa. Aunque esta capa se encuentre cubierta por el esmalte dental, como éste es translúcido, la fluorescencia de la dentina puede ser observada y analizada.

La capa de dentina presenta un color blanco-amarillento distinto al blanco de la capa superficial de esmalte. A continuación, mostraremos una imagen de dos dientes naturales en las cuales podremos distinguir la capa de dentina del esmalte natural, pues presentan desgastes sectoriales de la capa de esmalte.



*Ilustración 26-Estructura dental*

FUENTE: (74)

## 3.1 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1.1 FUENTES DE ILUMINACIÓN

Como fuente de emisión de luz se ha empleado una bombilla con 15 LED's de color azul de la marca Paulmann de 230V-1W.



*Ilustración 27- Iluminante empleado*

*FUENTE: María Moncho Santonja*



*Ilustración 28-Iluminante empleado*

*FUENTE: María Moncho Santonja*



Se ha optado por este tipo de iluminación puesto ya que nos confiere una luz bastante monocromática (rango azul del espectro electromagnético) y su coste es muy bajo.

### 3.1.2 SENSOR DE CAPTURA

El dispositivo empleado para la toma de imágenes tiene dos sensores de captura, uno RGB con 12 megapíxeles y un monocromático de 20 megapíxeles, el cual permite capturar una mayor cantidad de luz en la escena (efecto similar a un fotomultiplicador). Además, permite controlar el tiempo de exposición del sensor y nos proporciona un pequeño fichero con los metadatos (EXIF) de cada una de las imágenes tomadas en el cual se detallan el valor de apertura, la focal de la imagen, el momento de toma, el tiempo de exposición, etc.

Corresponde con el modelo de sensor integrado en el smartphone IPHONE X.

En estudios como (75) se emplean distintas cámaras integradas en smartphones y que permiten una efectiva captura imágenes en áreas de piel con gran resolución de detalle (5 mm) y que permiten obtener un mapeado de los cromóforos presentes en la zona de estudio.





f/1.8	1/254 segundo	20 ISO
4 mm	⚡	iPhone X
Évaluation étoilée	☆☆☆☆☆	
Apertura (Número-F)	f/1.8	
Sensibilidad ISO	ISO 20	
Distancia focal	4 mm	
Distancia focal en 35 mm	28 mm	
Flash	Flash disparado, modo de flash obligatorio	
Aperture Max		
Fecha tomada	02-07-2018 09:50:36 a. m.	
Velocidad	0.00 Miles par heure	
Altitud	36.089240 pieds au-dessus du niveau de la mer (+/- 0.00)	
VersiónFlashpix	1.0	
Radio de zoom digital	0.000000	
Valor parcial de exposición	0.00	
Modo exposición	Exposición automática	

Ilustración 29- Formato de metadatos de las imágenes empleadas

FUENTE: María Moncho Santonja

DPI de altura	72.000000
DPI de anchura	72.000000
Tamaño del archivo	798 KB (797.572 bytes)
Profundidad	8
Operación	6
Espacio de color	ICC Profile
Bits comprimidos por píxel	0
Contraste	normal
Personalización renderizada	Proceso normal
Ganar control	Estándar
Fuente de luz	desconocido
Saturación	normal
Artista	
Copyright	
Marca	Apple
Modelo	iPhone X
Software	11.4

Ilustración 30- Formato de metadatos de las imágenes empleadas

FUENTE: María Moncho Santonja



Modo exposición	Exposición automática
Programa de exposición	Programa normal
Tiempo de exposición	0.003040 - ( 1/329 segundo )
Balance de blancos	Balance automático de blancos
Modo métrico	Patrón
Tipo de captura de escenario	Estándar
Tipo de escenario	La imagen fue directamente fotografiada
Método de detección	Sensor de área de color de un solo chip
Tipo de sensibilidad	desconocido
Nitidez	normal
Resolución	12,2 MegaPixels
Relación de aspecto	4/3
Rango de distancia del sujeto	desconocido
Modelo de color	RGB

*Ilustración 31- Formato de metadatos de las imágenes empleadas*

*FUENTE: María Moncho Santonja*



### 3.1.3 FILTROS EMPLEADOS

Los filtros empleados para la toma de imágenes son:

1. Filtro Schott VG 9\* (verde) Se trata de un filtro bandpass centrado en 526nm y que se extiende en el rango [450-633 nm].



Ilustración 32- Filtro Schott VG 9 (verde)

FUENTE: María Moncho Santonja

2. Filtro Schott RG610\* (rojo) Se trata de un filtro de paso alto que bloquea el paso de longitudes de onda inferiores a 610 nm.



Ilustración 33-Filtro Schott RG610 (rojo)

FUENTE: María Moncho Santonja

\* las especificaciones técnicas más detalladas de los filtros las encontramos en el Anexo I.

### 3.1.4 EXPERIMENTAL



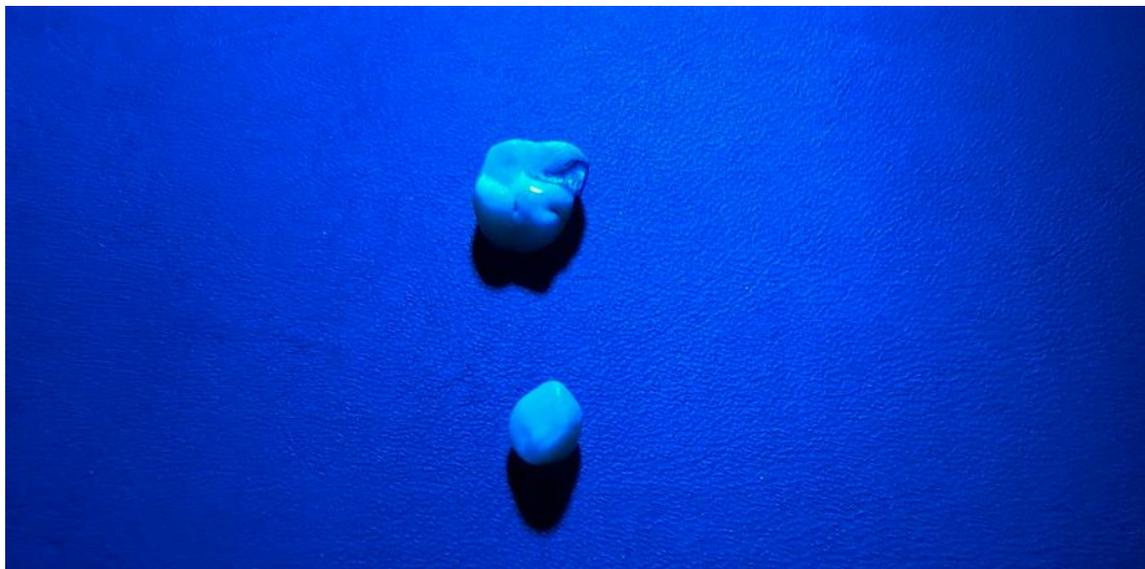
*Ilustración 34- Imagen de dientes naturales tomada con luz natural y sin filtros especiales*  
FUENTE: María Moncho Santonja



*Ilustración 35- Zonas de desgaste de la capa superficial de esmalte dental y aumento de la visualización de la dentina*  
FUENTE: María Moncho Santonja

En la Ilustración 35 observamos cómo las zonas en las cuales el esmalte presenta un desgaste, el color es más amarillento, pues la capa de dentina se encuentra ya en estratos más superficiales.

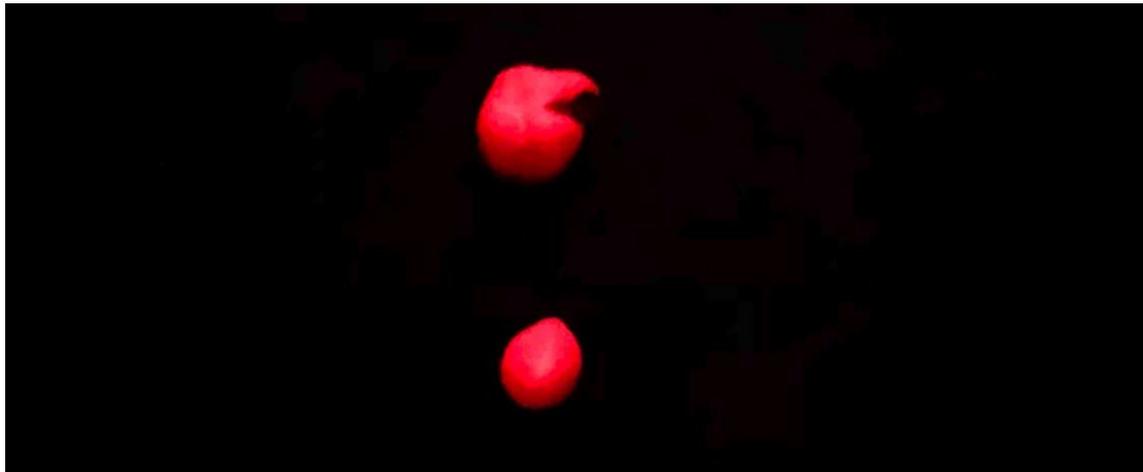
Si la dentina careciese de propiedad de fluorescencia, al ser iluminada bajo una luz azul, y aunque se aplicase un filtro especial de captura, por simple reflexión de la luz, la veríamos con menos intensidad que el resto del esmalte. El color blanco refleja toda la luz visible, mientras que un color amarillento reflejaría menos cantidad de ésta.



*Ilustración 36- Imagen tomada con luz AZUL y sin filtros especiales*

*FUENTE: María Moncho Santonja*

En la Ilustración 36 observamos que con una iluminación azul pero sin ningún tipo de filtros, no obtenemos una diferencia en la visualización de las zonas con mayor y menor desgaste del esmalte dental.



*Ilustración 37- Imagen tomada con iluminación AZUL y filtro de paso alto Schott RG610  
FUENTE: María Moncho Santonja*

La Ilustración 37 se ha tomado con una iluminación azul y un filtro de paso alto que bloquea la entrada al sensor de imagen las longitudes de onda menores a 610 nm.

En esta imagen podemos observar cómo las zonas que anteriormente se mostraban con un mayor desgaste y por tanto una mayor concentración de dentina, aparecen en tono más blanco. Esto se debe a que la dentina presenta fluorescencia y emisión de energía en el rango rojo del espectro electromagnético.

Además, si el filtro RG610 que se coloca delante del objetivo de la cámara no tiene contacto con éste y deja pasar una pequeña cantidad de luz azul, el efecto de realce de la fluorescencia de las zonas con desgaste es mayor, como podemos observar en la siguiente imagen.



Ilustración 38- Imagen con luz AZUL y filtro RG610 sin bloqueo completo de la luz iluminante

FUENTE: María Moncho Santonja

A continuación, se observará una estructura bucal completa para la identificación de piezas bucales naturales y prótesis artificiales.

La cavidad de estudio presenta todos los incisivos y caninos inferiores artificiales, conservando naturales los pre molares y molares.



Ilustración 39-Nomenclatura estructura bucal inferior

FUENTE: <http://www.clubratoncitoperez.es/blog/wp-content/uploads/2016/02/imagen-dientes-correctada.jpg>

Al iluminar la cavidad bucal de una persona con implantes bajo luz visible y azul y sin aplicar ningún tipo de filtros, no es fácil diferenciar el diente natural de la prótesis.

A continuación, se muestran una serie de imágenes tomadas bajo iluminación normal y bajo una lámpara de luz azul.



*Ilustración 40-Cavidad bucal perspectiva frontal con luz natural sin filtros*

*FUENTE: María Moncho Santonja*



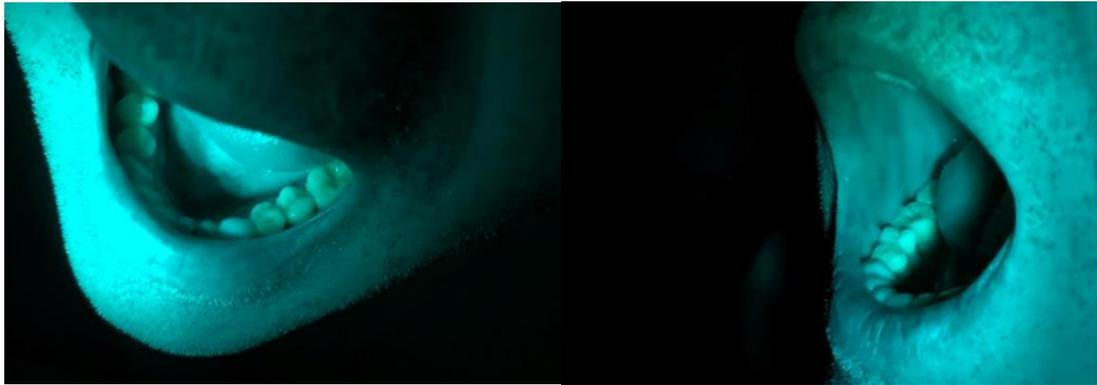
*Ilustración 41-Cavidad bucal perspectiva lateral con luz natural sin filtros*

*FUENTE: María Moncho Santonja*



*Ilustración 42-Cavidad bucal perspectiva frontal con luz AZUL sin filtros*

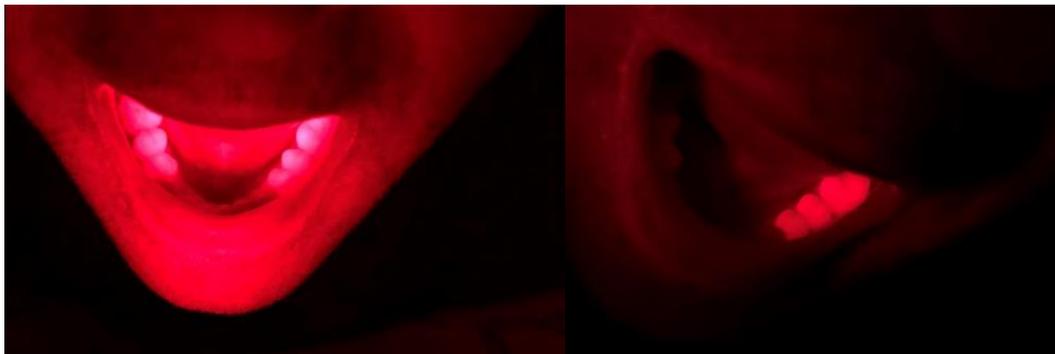
*FUENTE: María Moncho Santonja*



*Ilustración 43-Cavidad bucal perspectiva frontal y lateral con luz AZUL y filtro Schott VG 9*  
FUENTE: María Moncho Santonja

En la ilustración 43, se ha capturado la señal emitida en el rango azul-verde-amarillo-naranja del espectro electromagnético. No se observa ninguna diferencia en la visualización de la estructura dental que pueda dar indicios de la diferente naturaleza que los dientes presentan.

El filtro empleado, es un filtro de paso de banda Schott VG9 [450-633 nm], centrado en 526 nm. Sus especificaciones técnicas se muestran en el Anexo I.



*Ilustración 44- Cavity bucal perspectiva frontal y lateral con luz AZUL y filtro ROJO Schott RG610*

FUENTE: María Moncho Santonja

El filtro empleado en la Ilustración 36, y como se puede comprobar en su ficha técnica que se adjunta posteriormente es un filtro de paso alto, el cual bloquea la entrada de longitudes de onda menores a 610 nm en el objetivo de la cámara.



*Ilustración 45- Cavity bucal perspectiva frontal y lateral con iluminación AZUL y filtro ROJO Schott RG610*

*FUENTE: María Moncho Santonja*

La Ilustración 45 se ha editado con el programa Lightroom CC, eliminándole el tono Rojo, obteniéndose así una imagen más clara de la diferencia de fluorescencia entre el esmalte natural (provocada por la dentina) y las prótesis artificiales.

En la Ilustración 44 podemos observar claramente cómo al seleccionar adecuadamente un iluminante y un filtro de captura de la imagen (que restrinja el rango del espectro electromagnético dónde se puede distinguir el fenómeno de la fluorescencia) se consigue una mejora en la visualización de las estructuras de interés.



## 4 LÍNEA DE TRABAJO FUTURA

---

Una vez demostrada la viabilidad de la técnica, del presente proyecto surge una línea de investigación que se pretende seguir desarrollando en el Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas.

Como punto de inicio, se han presentado:

- I. Solicitud de 2018 - Subprograma C PARA LA REALIZACIÓN DE ACCIONES PREPARATORIAS DE APOYO A LA EXPLORACIÓN Y FORMULACIÓN DE FUTUROS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN/INNOVACIÓN CONJUNTA ENTRE INVESTIGADORES DE LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA E INVESTIGADORES/PROFESIONALES DEL HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC/INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE.

**TÍTULO DE LA ACCIÓN PREPARATORIA:** Discriminación de tejidos por multi-filtrado de longitudes de onda.

- II. Artículo de investigación para el congreso INNODOCT 2018 que tendrá lugar en Valencia entre los días 14 y 16 de Noviembre de 2018.\*\*

**TÍTULO DEL ARTÍCULO PRESENTADO:** Captura y análisis de la auto-fluorescencia en tejidos biológicos para la identificación y demarcación de lesiones.

\*\* Se muestra en el Anexo II el resumen del artículo presentado.



## 5 BIBLIOGRAFÍA

---

1. [En línea] [Citado el: 15 de 03 de 2018.] <https://www.astrofiscayfisica.com/2012/06/que-es-el-espectro-electromagnetico.html>.
2. [En línea] [Citado el: 03 de 02 de 2018.] <https://es.wikipedia.org>.
3. [En línea] [Citado el: 16 de 02 de 2018.] <http://elfisicoloco.blogspot.com/>.
4. [En línea] [Citado el: 09 de 02 de 2018.] [https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro\\_electromagn%C3%A9tico](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_electromagn%C3%A9tico).
5. [En línea] [Citado el: 15 de 06 de 2018.] <http://www.fotonostra.com/grafico/coloresobjetos.htm>.
6. Real Peña, Eusebio. *TFG: Identificación de la composición de tejidos biológicos a partir de medidas de reflectancia digusa*. Cantabria : s.n., 2012.
7. [En línea] 15 de 06 de 2018. <https://quimica-biologia-12-13.wikispaces.com/file/view/uydc.png/382900314/695x318/uydc.png>.
8. [En línea] 12 de 06 de 2018. <http://www.sabelotodo.org/materia/dispersionluz.html>.
9. [En línea] [Citado el: 05 de 03 de 2018.] [https://www.myminstrumentostecnicos.com/sitio/contenidos\\_mo\\_izquierda.php?it=6810](https://www.myminstrumentostecnicos.com/sitio/contenidos_mo_izquierda.php?it=6810).
10. [En línea] [Citado el: 08 de 06 de 2018.] <https://elespectrofotometro.com/partes-del/>.
11. Pérez Álvarez, Juan Antonio. *Apuntes de FOTOGRAMETRÍA II*. Universidad de Extremadura : s.n.
12. Pinilla Ruíz, Carlos. Departamento de Ingeniería Cartográfica. [En línea] [Citado el: 18 de 05 de 2018.] <http://www.ujaen.es/huesped/pidoceps/tel/archivos/7.pdf>.
13. [En línea] [Citado el: 16 de 05 de 2018.] <http://slideplayer.es/3188258/11/images/43/Resoluci%C3%B3n+espectral%3A+El+n%C3%BAmero+de+canales+espectrales+y+su+ancho.jpg>.

14. [En línea] [Citado el: 06 de 23 de 2018.] [https://2.bp.blogspot.com/-x\\_X8DzZRCZI/VzS4hUeSBkI/AAAAAAAAAJU/eGY9G2JZZKwDVtLd9-QhWa4WpBhCJjO6wCLcB/s1600/RESOLUCION%2Bradiometrica.png](https://2.bp.blogspot.com/-x_X8DzZRCZI/VzS4hUeSBkI/AAAAAAAAAJU/eGY9G2JZZKwDVtLd9-QhWa4WpBhCJjO6wCLcB/s1600/RESOLUCION%2Bradiometrica.png).
15. [En línea] [Citado el: 15 de 05 de 2018.] [https://es.wikipedia.org/wiki/Dispositivo\\_de\\_carga\\_acoplada](https://es.wikipedia.org/wiki/Dispositivo_de_carga_acoplada).
16. [En línea] [https://es.wikipedia.org/wiki/Sensor\\_CMOS](https://es.wikipedia.org/wiki/Sensor_CMOS).
17. [En línea] [Citado el: 05 de 05 de 2018.] [https://www.parentesis.com/tutoriales/Sensor\\_CCD\\_o\\_CMOS\\_Que\\_significa\\_todo\\_esto](https://www.parentesis.com/tutoriales/Sensor_CCD_o_CMOS_Que_significa_todo_esto).
18. Aparisi Navarro, Silvia. Apuntes de Fotogrametría y Teledetección. Valencia : s.n., Curso 2016-2017.
19. [En línea] [Citado el: 19 de 05 de 2018.] <https://jpassite.files.wordpress.com/2016/09/hipercubo.png?w=700>.
20. Paul Francis, Robert. DLP HYPERSPECTRAL IMAGING FOR SURGICAL AND CLINICAL UTILITY. *TFM-Master of Science in Bioengineering*. TEXAS : s.n., 2009.
21. *Multispectral image enhancement for effective visualization*. Hashimoto, Noriaki, y otros. 10, 9 de mayo de 2011, Optical Society of America, Vol. 19.
22. *Multispectral color imaging for dermatology: application in inflammatory and immunologic diseases*. Yamaguchi, Masahiro, y otros. 2005, 13th Color Imaging Conference - IS&T/SID .
23. [En línea] [Citado el: 05 de 05 de 2018.] [https://encrypted\\_tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ4M478g3k\\_kLRCdWj5dbMVAsLxotjqhEOgOncle0Qu8OvnOWYFqA](https://encrypted_tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ4M478g3k_kLRCdWj5dbMVAsLxotjqhEOgOncle0Qu8OvnOWYFqA).
24. [En línea] [Citado el: 23 de 06 de 2018.] <http://www.teledet.com.uy/tutorial-imagenes-satelitales/imagenes-hiperespectrales.htm>.
25. [En línea] [Citado el: 03 de 07 de 2018.] [https://images-eu.ssl-images-amazon.com/images/I/41jeCvywDaL.\\_AC\\_US218\\_.jpg](https://images-eu.ssl-images-amazon.com/images/I/41jeCvywDaL._AC_US218_.jpg).

26. [En línea] [Citado el: 06 de 04 de 2018.]  
<http://www.intramed.net/userfiles/2013/images/ultravioleta.png>.
27. [En línea] [Citado el: 12 de 04 de 2018.]  
<http://www.intramed.net/userfiles/2013/images/ultravioleta.png>.
28. **DISCRIMINACIÓN DE PATOLOGÍAS TUMORALES EN TEJIDOS CANCERÍGENOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE IMAGEN.** García Allende, P.B, y otros.
29. *Spectral discrimination of breast pathologies in situ using spatial frequency domain imaging.* Laughney et, Al. 15:R61, 2013, Breast Cancer Research.
30. *In-vivo characterization of optical properties of pigmented skin lesions including melanoma using oblique incidence diffuse reflectance spectrometry.* Garcia-Urbe, Alejandro, y otros. Febrero de 2011, Journal of Biomedical Optics, Vol. 16(2).
31. *Polarized Reflectance Spectroscopy for Pre-Cancer Detection.* Sokolov, Konstantin, y otros. 1, February de 2004, Technology in Cancer Research & Treatment, Vol. 3.
32. *Quantitative Imaging of Scattering Changes Associated With Epithelial Proliferation, Necrosis and Fibrosis in Tumors Using Microsampling Reflectance Spectroscopy.* Krishnaswamy, Venkataramanan, y otros. 29 de Enero de 2010, Journal of Biomedical Optics.
33. Welch, A., Gemert, M. J. C y Star, W. Definitions and overview of tissue optics. [aut. libro] A. Welch y M. J. C Gemert. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue.* Netherlands : Springer, 2011, págs. 27-64.
34. *Medical hyperspectral imaging: a review.* Lu, Guolan y Fei, Baowei. January de 2014, Journal of Biomedical Optics, Vol. 19.
35. Boni, Luigi PROFESSOR. *igc-Enhanced Fluorescence-Guided Laparoscopic Surgery.* Varese : Straub Druck + Medien AG, 2016.
36. *Resección guiada por fluorescencia en pacientes con cáncer de lengua.* Gallegos Hernández, José Francisco, y otros. 2016, GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA, Vol. 15(2), págs. 66-69.

37. *Cirugía guiada por fluorescencia aplicada al aparato digestivo: el ojo cibernético permite ver lo invisible.* M, Diana. 2017.
38. *The Value of Interoperative Near-Infrared fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer.* Tummers, QRJG, y otros. [ed.] Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, ITALY Elda Tagliabue.
39. *Medical diagnostic system based on simultaneous multispectral imaging.* Andersson-Engels, Stefan, Johansson, Jonas y Svanberg, Sune. 34, 1994, APPLIED OPTICS, Vol. 33.
40. *Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence.* Vahrmeijer, Alexander L, y otros. 2013, NAT REV CLIN ONCOL, Vol. 10(9), págs. 507-518.
41. *Multispectral Real-time Fluorescence Imaging for Intraoperative Detection of the Sentinel Lymph Node in Gynecologic Oncology.* Crane, Lucia MA, y otros. 2010, Journal of Visualized Experiments.
42. *Diagnóstico por Fluorescencia en Tumores Vesicales.* Abascal García, RAmon. 5, 2007, Archivos Españoles de Urología, Vol. 60.
43. *El faro tóxico de MMP permitió la resección guiada por fluorescencia del carcinoma oral.* Burguess, Laura, y otros. 3, Biomedics Optic Express, Vol. 7.
44. [En línea] [Citado el: 08 de 05 de 2018.] [https://vidauniversoydemas.files.wordpress.com/2013/11/hemo\\_espectro.jpg?w=270&h=182](https://vidauniversoydemas.files.wordpress.com/2013/11/hemo_espectro.jpg?w=270&h=182).
45. *Registration and analysis of multispectral images acquired during uterine transplantation surgery.* Clancy, Neil T, y otros. 2012, Biomedical Optics and 3D Imaging .
46. [En línea] [Citado el: 15 de 03 de 2018.] <http://www.bdigital.unal.edu.co/3319/1/belarminoseguragiraldo.2009.pdf>.
47. *Fluorescence photography in the evaluation of hyperpigmentation in photodamaged skin.* Kollias, Nikiforos, y otros. 1997, American Academy of Dermatology.

48. Molinet Drona, Francisco y Malanda Trigueros, Armando. **DETECCIÓN Y MARCACIÓN AUTOMÁTICA DE CARCINOMAS BASOCELULARES CUTÁNEOS EN IMÁGENES DE FLUORESCENCIA**. Pamplona : s.n., 2011.
49. *Ultraviolet-excited (308 nm) autofluorescence for bladder cancer detection*. Zaak, Dirik, Stepp, Herbert y Baumgartner, Reinhold. 6, 2002, Vol. 60.
50. *Image-enhanced laparoscopy: A promising technology for detection of peritoneal micrometastases*. Schenelldorfer, Thomas. Philadelphia : s.n.
51. *Wide-field autofluorescence-guided TUR-B for the detection of bladder cancer: a pilot study*. Kriegmair, Maximilian C., Honeck, P y Theuring, M. 2018, World Journal of Urology, Vol. 36, págs. 745-751.
52. *Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy*. Lam, S, y otros. 1998, Vol. 13, págs. 696-702.
53. *Correlación de imágenes broncoscópicas con luz blanca y luz de banda estrecha con la histopatología*. Onofre-Borja, Melissa Betzaira, y otros. 4, 2012, Revista del Hospital General de México, Vol. 74.
54. *Fluorescence endoscopic imaging of human colonic adenomas*. Wang, T. D, y otros. 1996, Gastroenterology, Vol. 111, págs. 1182-1191.
55. *Detection and characterization of chemical induced abnormal tissue rat tumors at different stages using fluorescence spectroscopy*. Chen, W, y otros.
56. *Toward Optimization of Imaging System and Lymphatic Tracer for Near-Infrared Fluorescent Sentinel Lymph Node Mapping in Breast Cancer*. Frangioni, J. V. y Vahrmeijer, A L. 2011, Annals of Surgical Oncology.
57. *Spectral characterization of brain tumors utilizing laser induced fluorescence*. Montan, S y Strömblad, L-G. Lasers Life Science.
58. *Resección de tumor intramedular guiada por fluorescencia con ácido aminolevulínico*. Bernal-García, B.M., y otros. 4, Vol. 21.
59. [En línea] [Citado el: 02 de 05 de 2018.]  
<http://www.lasprovincias.es/valencia-ciudad/201406/21/fluorescencia-para-extirpar-tumores-20140621174622.html>.



60. *Blue-green endoscopy in canine digestive*. Cerquetella, M, y otros. 2015, ITALIAN JOURNAL OF COMPANION ANIMAL PRACTICE.
61. *In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications*. Wagnières, georges A, Star, Willem M. y Wilson, Brian C. 1998, Photochemistry and Photobiology, Vol. 65(5), págs. 603-632.
62. *Detection of early laryngeal cancer and its precursor lesions by a real-time autofluorescence imaging system*. Dobre, Marioara, y otros. 4, Romain Journal of Morphology & Embryology : s.n., 2014, Vol. 5, págs. 1377-1381.
63. *Early Detection and Diagnosis of Oral Premalignant Squamous Mucosal Lesions*. Vigneswaran, Nadarajah y El-Naggar, Adel K. 2016, Biomedical Optics in Otorhinolaryngology.
64. *Registration and analysis of multispectral images acquired during uterine transplantation surgery*. Clancy, Neil T, y otros. 2012, Biomedical Optics and 3D Unagubg .
65. *Actualización en la autofluorescencia retiniana*. Fernández Martínez, Cristian, y otros. s.l. : Domènec Pujades, abril de 2013, Revista de información e investigación oftalmológica de Laboratorios Thea, Vol. 067.
66. *Autofluorescencia de fondo en pacientes con coriorretinopatía serosa central*. Santana Alas, Eva R., y otros. 2, 2010, Revista Cubana de Oftalmología, Vol. 23, págs. 770-780.
67. *Autofluorescencia del fondo en retinitis por citomegalovirus*. Colombero, Daniel, Ladeveze, Emilio y Bercovich, Gabriel. 1, Rosario (Santa Fe) : s.n., 3 de enero de 2016, Oftalmol Clin Exp, Vol. 9, págs. 1-11.
68. *Fundus autofluorescence in the diagnosis of cystoid macular oedema*. McBain, VA, Forrester, JV y Lois, N. 2008, British Journal of Ophtalmology, Vol. 92, págs. 946-949.
69. *Patrones de autofluorescencia del fondo de ojo en el edema macular diabético*. Medellín-Bulbarela, Rubén, y otros. 4, 2016, Rev Med UAS, Vol. 6.
70. *Influence of fluorescence on screening decisions for oral mucosal lesions in community dental practices*. Iaronde, Denise m, y otros. 2013.



71. *Objective Detection and Delineation of Oral Neoplasia Using Autofluorescence Imaging*. Roblyer, Darren, y otros. s.l. : Cancer Prev Res (Phila), 2009, Vol. 2, págs. 423-431.
72. [En línea] [Citado el: 07 de 03 de 2018.] <http://www.medxhealth.com/Skin-Assessment/Siametrics.aspx>.
73. [En línea] [Citado el: 07 de 03 de 2018.] <http://www.cancerquest.org/index.php/patients/detection-and-diagnosis/melafindr>.
74. [En línea] [Citado el: 22 de 06 de 2018.] <http://2.bp.blogspot.com>.
75. *Multispectral, Fluorescent and Photoplethysmographic Imaging for Remote Skin Assessment*. Spigulis, Janis. 12 de 04 de 2017, Sensors.
76. Real Peña, Eusebio. TRABAJO FÍN DE GRADO- Identificación de la composición de tejidos biológicos a partir de medidas de reflectancia difusa. Cantabria : ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN, Julio 2012.
77. *Relación entre las imágenes multiespectrales y las curvas espectrales de los nevus melanocíticos adquiridos*. Hernández U, Yuleidi, y otros. Agosto de 2016.
78. *Clinical evaluation of melanomas and common nevy by spectral imaging*. Diebele, Ilze, y otros. 3, 2012, Biomedical Optics Express, Vol. 3.
79. *DLP Hyperspectral Imaging for Surgical and Clinical Utility*. Zuzak, Karel J, y otros. contact: kzuzak@uta.edu .
80. *Tissue Viability by Multispectral Near Infrared Imaging: A Fuzzy C-Means Clustering Analysis*. Mansfield, james R, y otros. 6, 1998, IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING , Vol. 17.
81. *Multispectral image alignment using a three channel endoscope in vivo during minimally invasive surgery*. Clancy, Neil T, y otros. 10, 2012, BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, Vol. 3.
82. *Multispectral image enhancement for effective visualization*. Hashimoto, Noriaki, y otros. 10, 2011, OPTICS EXPRESS, Vol. 19.



83. *The efficacy of autofluorescence imaging in the diagnosis of colorectal diseases.* Moriichi, Kentaro, Fujiya, Mikihiro y Okamura, Toshikatsu. 2016, Japanese Society of Gastroenterology.
84. *Intraoperative Localization of Insulinoma and Normal Pancreas using Invisible Near-Infrared fluorescent Light.* Winer, Joshua, y otros. abril de 2010, Ann Surg Oncology.
85. *Low-cost, multimodal, portable screening system for early detection of oral cancer.* Rahman, Mohamed, y otros. may-june de 2008, Journal of Biomedical Optics, Vol. 13(3).
86. Luo, Xiaobo, y otros. *Accuracy of autofluorescence in diagnosing oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: a comparative study with aero-digestive lesions.* [ed.] [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).
87. *Quantification of in vivo autofluorescence dynamics during renal ischemia and reperfusion under 355nm excitation.* Raman, Rajseh N, y otros. 7, 31 de March de 2008, Optical Society of America - OPTICS EXPRESS 4930, Vol. 16.
88. *Intrinsic near-infrared spectroscopic markers of breast tumors.* Kukreti, Shwayta, y otros. 26 de August de 2009, PMC, págs. 281-290.
89. P. Zharov, Vladimir, y otros. Wiley InterScience. [En línea]
90. *Infrared thermal imaging: A review of the literature and case report.* Kateb, Babak, y otros. 2009, NeuroImage.
91. *Detection of peritoneal endometriotic lesions by autofluorescence laparoscopic.* Buchweitz, Olaf, y otros. 2006, American Journal of Obstetrics and Gynecology.
92. **FLUORESCENCE IMAGING AND POINT MEASUREMENTS OF TISSUE: APPLICATIONS TO THE DEMARCATION OF MALIGNANT TUMORS AND ATHEROSCLEROTIC LESIONS FROM NORMAL TISSUE.** Anderson-Engels, S, y otros. 6, 1991, Photochemistry and Photobiology, Vol. 53, págs. 807-814.





93. **ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER EN LAS CÉLULAS.** Silva-Pérez, A, y otros.
94. **Edema macular quístico: causas, diagnóstico y tratamiento.** Bravo Alcobendas, Noelia y Mirena Zulueta Odriozola, Joseba. 4, 2014, Reduca (Recursos Educativos), Vol. 6.
95. **Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues.** Ramanujam, Nirmala. 1, 2000, Nature America, Vol. 2, págs. 89-117.
96. **Narrow band imaging as screening test for early detection of laryngeal cancer: a prospective study.** De Vito, A, Meccariello, G. y Vicini, C. 2016, Clinical Otolaryngology, Vol. 42, págs. 347-353.
97. **Imaging of tumors by time delayed laser-induced fluorescence.** Kohl, M. J, y otros. págs. 26-34.
98. Berns, Roy S. **PRINCIPLES OF COLOR TECHNOLOGY.** Canada : BILLMEYER AND SALTZMAN'S, 2000.
99. Aguilar Rico, Mariano y Blanca Giménez, Vicente. **ILUMINACIÓN Y COLOR.** Valencia : Universitat Politècnica de València, 1995.
100. [En línea] [Citado el: 12 de 06 de 2018.]  
[https://encrypted\\_tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ4M478g3k\\_kLRCdWj5dbMVAsLxotjqhEOgOncle0Qu8OvnOWYFqA](https://encrypted_tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ4M478g3k_kLRCdWj5dbMVAsLxotjqhEOgOncle0Qu8OvnOWYFqA).





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍA GEODÉSICA  
CARTOGRÁFICA Y TOPOGRÁFICA



---

# **ANEXO I: ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS FILTROS EMPLEADOS**

---





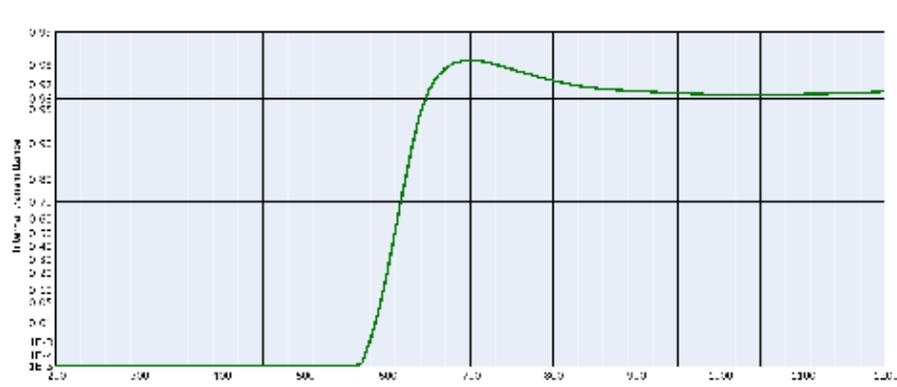
## FILTRO *SCHOTT RG610*

### Data Sheet

# SCHOTT

<b>RG610</b>		<b>Density</b> $\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	2.65	<b>Notes</b> Colloidally colored glass Longpass filter
<b>Reflection factor</b> $P_d$		0.918		
<b>Bubble content</b> Bubble class		3		
<b>Reference thickness</b> $d$ [mm]		3		
<b>Chemical Resistance</b> FR class		0		
<b>Spectral values guaranteed</b> $\lambda_c$ ( $\tau_{\lambda} = 0.5$ ) [nm] = 610 ± 6 $\lambda_{10}$ ( $\tau_{\lambda} = 10^{-6}$ ) [nm] = 530 $\lambda_{0.94}$ ( $\tau_{\lambda} = 0.94$ ) [nm] = 690		<b>Transformation temperature</b> $T_g$ [°C]		
		520		
<b>Refractive index n</b> $n_d$ (587.6 nm) = 1.520 $n_g$ (852.1 nm) = 1.520 $n_e$ (1014.0 nm) = 1.510		<b>Thermal expansion</b> $\alpha_{30+20^\circ\text{C}}$ [10 <sup>-6</sup> /K] = 8.0 $\alpha_{20+0^\circ\text{C}}$ [10 <sup>-6</sup> /K] = 9.2 $\alpha_{50+20^\circ\text{C}}$ [10 <sup>-6</sup> /K] = 9.2		
		<b>Temperature coefficient</b> $T_g$ [nm/°C] = 0.14		
All data without tolerances are to be understood to be reference values. Guaranteed values are only those values listed in the section "Spectral values guaranteed".				

Colorimetric evaluation											
illuminant	A (Planok T = 2868 K)			illuminant	Planok T = 3200 K			illuminant	D65 (T <sub>c</sub> = 6604 K)		
$d$ [mm]	1	2	3	$d$ [mm]	1	2	3	$d$ [mm]	1	2	3
x	0.663	0.690	0.697	x	0.659	0.689	0.696	x	0.629	0.684	0.693
y	0.328	0.310	0.303	y	0.329	0.311	0.304	y	0.330	0.315	0.307
Y	27	20	17	Y	25	18	15	Y	17	12	10
$\lambda_d$ [nm]	614	619	623	$\lambda_d$ [nm]	613	619	623	$\lambda_d$ [nm]	611	617	621
$P_s$	0.94	1.00	1.00	$P_s$	0.93	1.00	1.00	$P_s$	0.89	1.00	1.00



STATUS: 01.12.2014

Further explanations see 'Optical Filters 2013' catalogue

Page 1/2



## Captura y análisis de la autofluorescencia en tejidos biológicos para la identificación y demarcación de lesiones.

Moncho Santonja, María<sup>e</sup>; Vila Carbo, Juan José<sup>d</sup>; Defez García, Beatriz<sup>b</sup>; Lengua Lengua, Ismael<sup>c</sup>; Peris-Fajarnés, Guillermo<sup>a</sup>;

<sup>a</sup> Director del Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas – [gperis@upv.es](mailto:gperis@upv.es); <sup>b</sup>

Researcher in Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas ( Universitat Politècnica de València) – [bdefez@upv.es](mailto:bdefez@upv.es);

<sup>c</sup> Researcher in Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas ( Universitat Politècnica de València) – [islenlen@upv.es](mailto:islenlen@upv.es)

;

---

### Abstract

*Los cromóforos son sustancias características que se encuentran en determinados tipos de células. Estas sustancias hacen que las células respondan de una manera particular frente a la incidencia de una luz específica. En concreto los cromóforos son los responsables de la autofluorescencia de determinadas células. En este trabajo se muestra cómo el uso de técnicas de iluminación y filtrado de la imagen aprovechan estas propiedades para llegar a distinguir dentro de un mismo tejido, posibles lesiones no visibles a simple vista. En el trabajo se expone cómo estas técnicas podrían llegar a mejorar determinados procesos quirúrgicos permitiendo al cirujano disponer de una información más completa y detallada durante la propia intervención.*

**Palabras clave:** Cromóforos, autofluorescencia, fuentes de luz, tejidos.

---

*In certain cell types substances called Chromophores are found. These substances are responsible of a particular way to the incidence of a specific light. Specifically, chromophores are responsible for the autofluorescence of certain cells. This work shows how the use of lighting techniques and image filtering take advantage of these properties to get to distinguish, even in a tissue, possible injuries not visible by the human eye. In the paper, we explain how these techniques could improve certain surgical procedures, allowing the surgeon to have more complete and detailed information during the intervention itself.*

**Keywords:** Chromophores, autofluorescence, lighting techniques, tissues.

Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

EDITORIAL UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Centro de Investigación  
en Tecnologías Gráficas



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍA GEODÉSICA  
CARTOGRÁFICA Y TOPOGRÁFICA