

Grado en Óptica y Optometría

Trabajo Fin de Grado

Curso 2018/2019



**DISEÑO DE UN MICROENDOSCOPIO DE
FLUORESCENCIA DE ALTA RESOLUCIÓN
BASADO EN UN *SMARTPHONE*.**

Verónica Canto Caño y Nuria Manzanero Rodríguez.

Tutores: Miguel Antón Revilla y Eduardo Cabrera Granado.

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN	3
1.1.-HIPÓTESIS DE TRABAJO	4
1.2.-BASES DE LA FLUORESCENCIA	5
1.3.-FLUORESCENCIA Y CÁNCER.....	5
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1.- MICROENDOCOPIO DE FLUORESCENCIA.....	8
2.2.-CARACTERIZACIÓN ÓPTICA.....	12
2.2.1.-AUMENTO.....	12
2.2.2.-RESOLUCIÓN.....	14
2.2.3.-IRRADIANCIA EN LA MUESTRA.....	14
3.-RESULTADOS	15
3.1 OBSERVACION DE CÉLULAS <i>IN VITRO</i>	15
3.2 OBTENCIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.....	17
3.3.- CASO CLÍNICO.....	18
3.4.-ANÁLISIS DEL CASO CLÍNICO.....	19
4.- DISCUSIÓN	22
5.- CONCLUSIÓN	24
6.-AGRADECIMIENTOS.....	25
7.- BIBLIOGRAFÍA	26
8.- ICONOGRAFÍA	29
ANEXO: <i>SCRIPTS</i> DEL TRATAMIENTO DE IMAGEN.....	30

1.-INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 se han registrado 18,1 millones de nuevos casos y 9,6 millones de muertes, siendo una estimación de 185 países para 36 tipos de cáncer. Los más prevalentes son el de pulmón y el de mama ambos con un 11,6% de incidencia.¹

La detección del cáncer en la fase de displasia, antes de que tengan lugar cambios visibles en el tejido, es difícil por la falta de cambios macroscópicos en las primeras etapas de la enfermedad; lo que da lugar a un gran número de falsos negativos. Para evitarlo, en la actualidad nos vemos obligados a realizar numerosas biopsias.

El diagnóstico se basa en la visualización de la morfología y arquitectura celular, y se suele llevar a cabo mediante la extracción de una parte de tejido o la aspiración de células para su examen histopatológico. Las células neoplásicas presentan diferencias citológicas tales como un aumento del ratio del tamaño núcleo/citoplasma (N/C), formas y tamaños nucleares anormales, y un incremento de actividad mitótica.² Estos procedimientos son invasivos, costosos, entrañan riesgos, los resultados no son inmediatos, y dependiendo de la región extraída pueden dar lugar a falsos negativos. Por otra parte, la detección temprana de cambios estructurales o funcionales en epitelios displásicos es difícil pero es crucial para un tratamiento exitoso.

Considerando estos hechos, sería deseable disponer de nuevas técnicas de detección, rápidas, no invasivas y objetivas que permitan el diagnóstico de patologías como el cáncer en etapas tempranas.

La aplicación de métodos ópticos puede ser potencialmente útil porque muchos de los cánceres se producen en las capas más superficiales. Podríamos estudiar las alteraciones morfológicas y bioquímicas del tejido durante la progresión del cáncer al hacerlo interactuar con un haz de luz, que produce absorción, scattering o fluorescencia pudiéndolos correlacionar con las alteraciones celulares. Esta es la base que permite pensar en el uso de la luz en biomedicina³.

En el presente trabajo nos planteamos el uso de la obtención de imágenes ópticas de fluorescencia de estructuras celulares mediante microendoscopía de fluorescencia y la obtención de parámetros morfológicos de las células mediante el desarrollo de programas específicos de tratamiento de la imagen en el entorno de MATLAB.

1.1.-HIPÓTESIS DE TRABAJO

Cuando un haz de radiación interacciona con un tejido biológico experimenta diferentes procesos tales como absorción, fluorescencia, y scattering, que dependen de la composición y estructura del mismo³. Debido a ello, el haz incidente puede cambiar en intensidad, composición espectral, polarización, etc. Si en el paso de un tejido en estado normal a otro patológico se produjeran cambios en la composición relativa de cromóforos, en las alteraciones morfológicas de las estructuras y en las desintegraciones morfológicas, estas podrían inducir a su vez cambios en las propiedades del haz reflejado o transmitido que podría correlacionarse con el estado del tejido. Así, por ejemplo, durante el desarrollo de un proceso tumoral se producen una serie de alteraciones morfológicas de los núcleos celulares y alteraciones metabólicas tales como se aprecia en la Figura 1, y que pueden resumirse en:²

- Pleomorfismo: variación del tamaño y forma de los núcleos celulares dentro de un mismo tejido, dando lugar a formas irregulares.
- Aumento del material nuclear: el núcleo celular, al aumentar de tamaño por la pérdida del empaquetamiento de las cadenas de ADN (ácido desoxirribonucleico) invade el citoplasma, produciendo un aumento del ratio N/C (Núcleo/Citoplasma).
- Aumento de la actividad mitótica: división celular descontrolada impidiendo la delimitación de los márgenes del tejido y aumentando la posibilidad de metástasis tumoral a través de los vasos tanto linfáticos como sanguíneos.

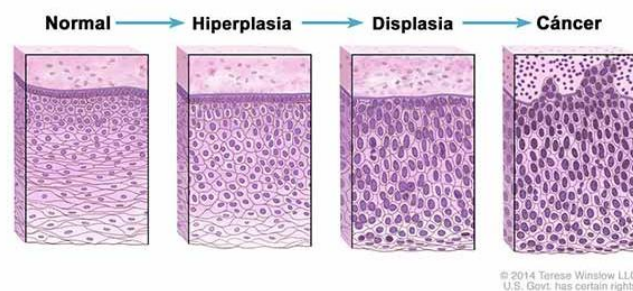


Figura 1. Muestra las etapas de proliferación del cáncer partiendo desde un tejido normal.¹

La principal motivación de nuestro estudio es buscar una estrategia no invasiva que permita la visualización y cuantificación de estos cambios. Para poder observar las alteraciones estructurales nucleares vamos a emplear la fluorescencia como método de contraste. Diseñaremos y construiremos un microendoscopio de fluorescencia, evaluaremos sus capacidades y prestaciones y elaboraremos unos programas específicos en MATLAB que nos permitan obtener información morfológica cuantitativa relevante de los núcleos que permitan diferenciar un estado normal de otro tumoral.

1.2.-BASES DE LA FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso óptico mediante el cual, una molécula que absorbe radiación de una determinada longitud de onda y re-emite radiación de otra longitud de onda más larga. El proceso se puede entender mediante el diagrama de energía de Jablonsky (Figura 2): el fotón absorbido lleva a la molécula a un estado excitado, singlete S_1 , dentro de este estado se producen transiciones no radiativas entre los niveles vibracionales, para decaer finalmente desde el último nivel vibracional hasta los niveles vibracionales del nivel fundamental. Como se ve, la energía del fotón emitido es inferior a la del fotón incidente; siguiendo la ecuación de Planck:

$$\Delta E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, por lo que la longitud de onda emitida será mayor que la longitud de onda incidente.

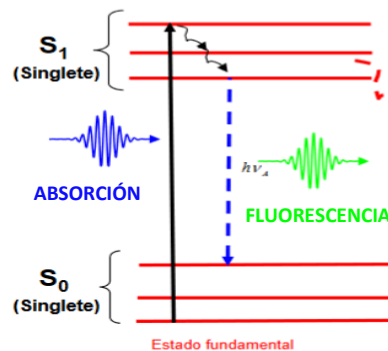


Figura 2: Diagrama de Jablonski.

La imagen de fluorescencia aprovecha el hecho de que al iluminar convenientemente aquellas partes del tejido donde se instalen las moléculas fluorescentes (endógenas o exógenas), estas producirán radiación fluorescente de una longitud de onda específica, que se puede aislar del fondo mediante la elección de filtros adecuados.

1.3.-FLUORESCENCIA Y CÁNCER

Según el Centro de Investigación del Cáncer (CIC), el cáncer en todas sus modalidades se caracteriza por un crecimiento celular autónomo debido a las continuas mutaciones que afectan a los genes haciendo que cuenten con una diferenciación y supervivencia anómalas. Como consecuencia nos encontramos con una alteración estructural del tejido.⁴

Actualmente, los estudios que relacionan la fluorescencia y el cáncer se centran tanto en la búsqueda de fluoróforos que permitan visualizar la estructura de interés mediante biopsias ópticas *in vivo* como en fluoróforos que actúen como marcadores tumorales facilitando su localización y extirpación.

Un ejemplo del uso de la fluorescencia como marcador tumoral es el 5-ALA (ácido 5-aminolevulínico) utilizado para la extirpación de gliomas ya que al entrar en contacto con las células tumorales el 5-ALA pasa a ser protoporfirina-IX.⁵ Se excita con ultravioleta-azul correspondiente a 375-440nm y emite longitudes de onda correspondientes a 636nm, lo que conlleva un alto corrimiento Stokes, facilitando la selección apropiada de filtros interferenciales.⁶ El procedimiento consiste en suministrar el 5-ALA por vía oral 3 horas antes del anestésico; durante el procedimiento quirúrgico se ilumina el área sospechosa con luz ultravioleta-azul y se realiza una resección del tejido tumoral correspondiente a la fluorescencia roja y las zonas de células tumorales infiltrantes que toman un color rosado (ver Figura 3). Este procedimiento solo es efectivo en gliomas en estadios III y IV según la OMS.^{7,8,9}

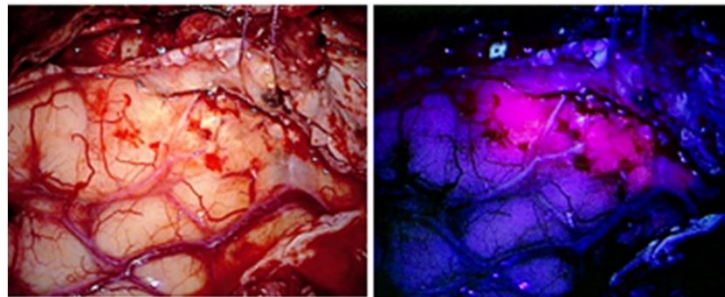


Figura 3. La imagen de la izquierda representa anatómicamente el cerebro con el glioma y la imagen de la derecha la fluorescencia del glioma (rosa-rojo).¹¹

Por otro lado, según los estudios de Wilbee D. Sasikala y Arnab Mukherjee existen diferentes fluoróforos tales como la proflavina que se introducen dentro de los núcleos celulares, permitiéndonos visualizarlos a través de un microscopio de fluorescencia, siendo el método en el que vamos a enfocar nuestro estudio.¹⁰

La Proflavina es una molécula anfipática usada en investigaciones recientes para la fluorescencia celular. Principalmente, se incorpora al material genético siguiendo dos etapas: un cúmulo de Proflavina alrededor de la envoltura nuclear y una posterior difusión a través de la bicapa lipídica al nucléolo^{10, 11}. Aquí actúa como intercalador entre los ácidos nucleicos de la cadena de ADN que está compuesta por hebras de grupos fosfato y uniones de las bases de nucleótidos a través de sus grupos amino: A/T (Adenina-Timina) y C/G (Citosina-Guanina). La Proflavina, al igual que las bases de nucleótidos cuenta con dos grupos amino, lo que le permite

establecer puentes de hidrogeno con ellas, siendo la orientación perpendicular de la molécula al ADN la más efectiva^{10,12}.

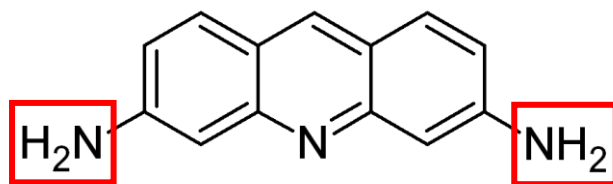


Figura 4. Molécula de Proflavina con sus respectivos grupos amino.^{III}

Por este motivo, hay estudios que refieren que es un anticancerígeno ya que impide que las células se transcriban y por consiguiente proliferen^{11, 13}; mientras que otros lo consideran un agente cancerígeno porque produce mutaciones en el material genético e incluso inducen apoptosis celulares¹⁴. No obstante, se ha visto que tiene funciones antisépticas por la desnaturalización del ADN¹⁴.

El tiempo de asociación del fluoróforo al ADN es del orden de nanosegundos¹¹, pero para la observación por microendoscopía de fluorescencia se aconseja la espera de 1-5 min postaplicación del fluoróforo, asegurándonos así que la Proflavina se ha incorporado completamente al núcleo y evitar fluorescencia difusa nuclear.

Altas concentraciones de fluoróforo provoca hiperfluorescencia del tejido cuando es iluminado a través de la fibra óptica impidiendo la observación celular que se desea, por lo que se sugiere instilar Proflavina de 0.01% masa-volumen. Para su elaboración hemos empleado una balanza de precisión (GRAM FH-100) en la que hemos medido 2g de clorhidrato de 3,6-diaminoacridina (Sigma-Aldrich) y disuelto en 200 ml de agua destilada.

A parte de poder visualizar los núcleos, la Proflavina también se fija a otros orgánulos celulares como los retículos y lisosomas del aparato de Golgi o los gránulos queratohialinos¹¹; y a las células de diferentes tejidos pudiéndose diferenciar entre ellos por la imagen de fluorescencia recogida.

La fijación de la Proflavina es efectiva en las sucesivas mitosis comunes en células cancerosas, permitiéndonos discriminar la división nuclear con alto contraste con respecto al citoplasma celular. Además, supone menor coste económico, haciendo de la Proflavina el fluoróforo idóneo en estos estudios en comparación con tinciones como el Papanicolaou y el Giemsa empleados con mismos fines¹¹.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- MICROENDOSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Como estamos interesados en visualizar estructuras celulares basadas en imagen de fluorescencia y de forma no invasiva, hemos diseñado un microendoscopio de fluorescencia. En la Figura 5 se muestra un esquema del dispositivo que hemos construido junto con el microendoscopio de fibra.

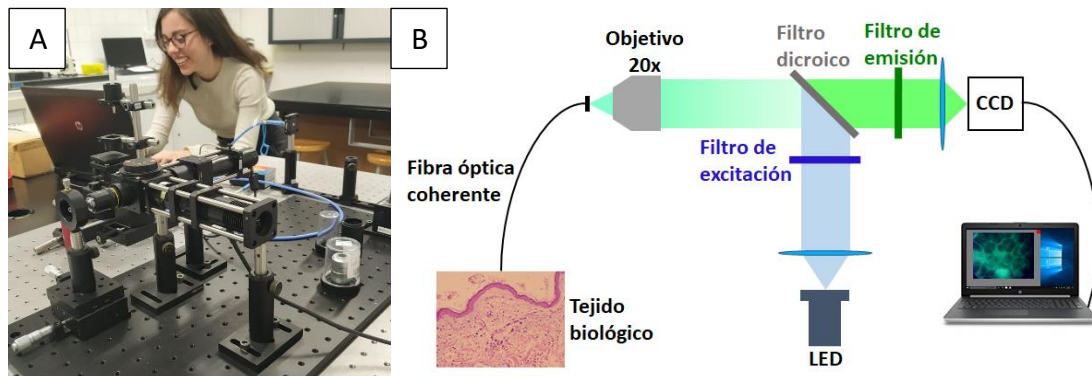


Figura 5. (a) Montaje del microendoscopio de fluorescencia (b) Esquema óptico del montaje.

La luz procedente de un LED se colima con una lente condensadora y se hace pasar por un filtro de emisión que selecciona el espectro de radiación que permite excitar a la molécula fluorescente. Esta radiación se refleja en un filtro dicroico e incide sobre un objetivo de microscopio. Este focaliza la radiación sobre un mazo de fibras coherentes que conduce la radiación hasta el tejido. El mazo de fibras coherentes es el elemento más innovador del montaje. Cosiste en un conjunto de 30.000 fibras ordenadas que permiten trasladar la imagen desde un extremo a otro con gran resolución, como podemos apreciar en la Figura 6. Es flexible y su diámetro exterior es del orden de 800 micras, por lo que se puede acceder a partes del interior del organismo sin demasiados problemas.

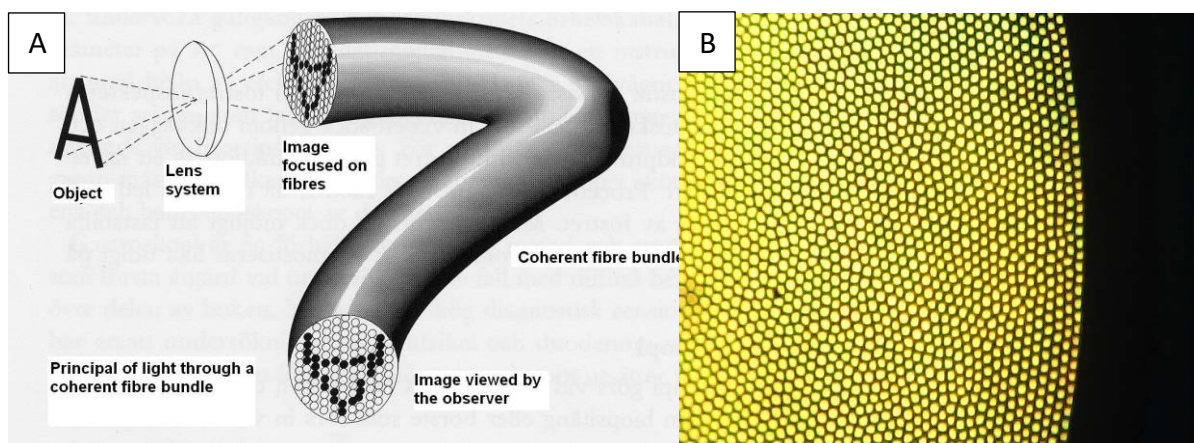


Figura 6. (a) Esquema del mazo de fibras coherentes. (b) Imagen del extremo de la fibra en el microendoscopio.

La fluorescencia de la muestra biológica se capta por la propia fibra, llega al foco del objetivo de microscopio que produce un haz colimado de radiación fluorescente. Esta pasa de nuevo por el filtro dicróico, por un filtro de emisión que selecciona una parte de la fluorescencia y una lente forma la imagen del extremo en una CCD¹⁵.

Antes de montar el microendoscopio se han elegido y caracterizado los espectros de los filtros de excitación, dicróico y emisión. La elección de estos filtros depende de los espectros de excitación y de emisión de la Proflavina. Aunque existen datos en la literatura, hemos querido medir el del producto particular nuestro ya que pueden existir variaciones. El montaje se muestra en la Figura 7.

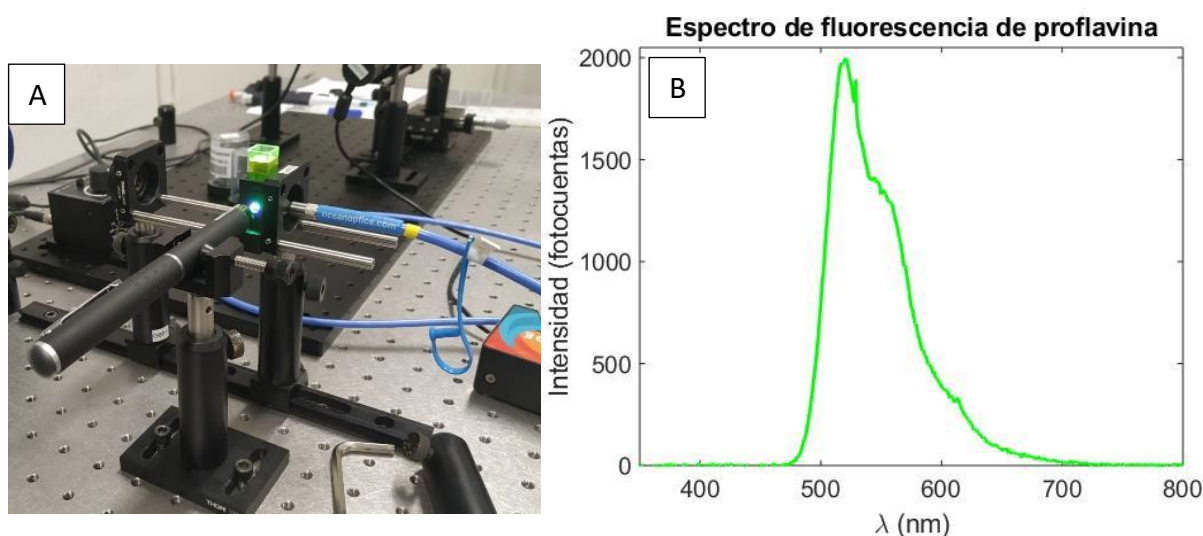


Figura 7. (a) Montaje utilizado para medir el espectro de fluorescencia de la Proflavina
(b) Representación del espectro realizada con MATLAB.

Para ello, vertemos la disolución de 0.01% masa-volumen en una cubeta de 1x1cm; iluminamos la cubeta con un puntero láser azul (405 ± 10 nm) y en perpendicular, situamos el detector del espectrofotómetro (Ocean Optics, USA, modelo USB 500FL) conectado a un ordenador que contiene un programa de control y análisis del espectro (SpectraSuite). Como se puede ver en la Figura 7(b), el máximo del espectro de emisión se encuentra en torno a 510 nm, lo cual está de acuerdo con la bibliografía.¹⁶

En base a la gráfica obtenida del espectro de emisión de la Proflavina y al espectro de absorción sugerido por el fabricante (445 nm), realizamos la selección de filtros interferenciales que disocien completamente los rangos de longitudes de onda correspondientes a la absorción y a la emisión. Para la obtención del espectro de transmitancia de cada filtro, empleamos una

fuente de luz blanca que hacemos incidir sobre los filtros y recogemos la radiación transmitida mediante el espectrofotómetro.

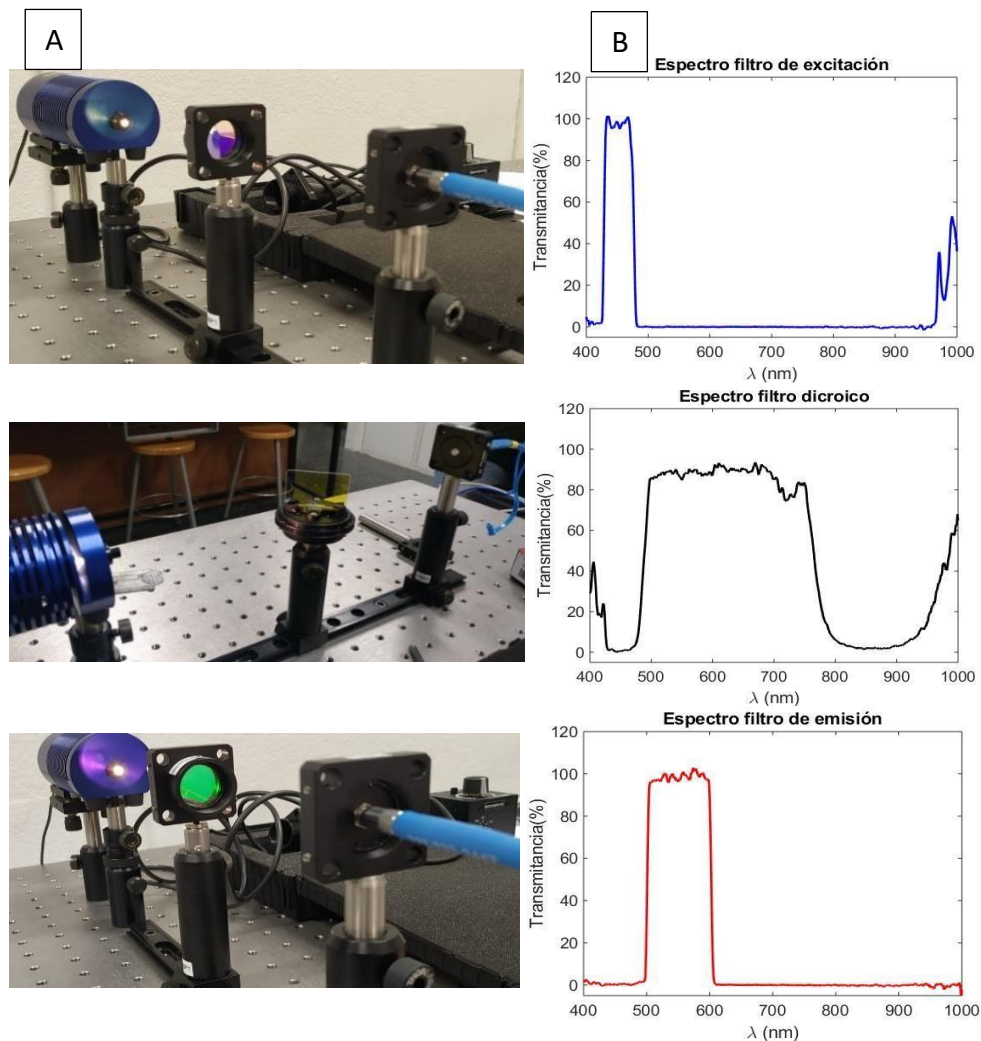


Figura 8. (a) Montajes empelados para medir la transmitancia de los filtros (b) Espectros de transmitancia.

Finalmente, los filtros elegidos son:

- Un filtro de excitación (Thorlabs FF01-452/45) que selecciona con mayor precisión la longitud de onda de la fuente incidente (transmite de 425 nm a 482 nm).
- Un filtro dicróico (Semrock 253809) orientado a 45° que se encarga de reflejar el rango de longitudes de onda correspondientes a la excitación del fluoróforo y transmitir la correspondiente a la fluorescencia (transmite a partir de 475 nm).
- Un filtro de emisión (Thorlabs FF01-550/88) cuya función es seleccionar las longitudes de onda correspondientes a la emisión del fluoróforo y además elimina posibles longitudes procedentes de la excitación (transmite desde 500 nm a 610 nm).

En la Figura 9, se muestran los espectros de los diferentes filtros superpuestos a los espectros de la Proflavina para visualizar el efecto de los mismos.

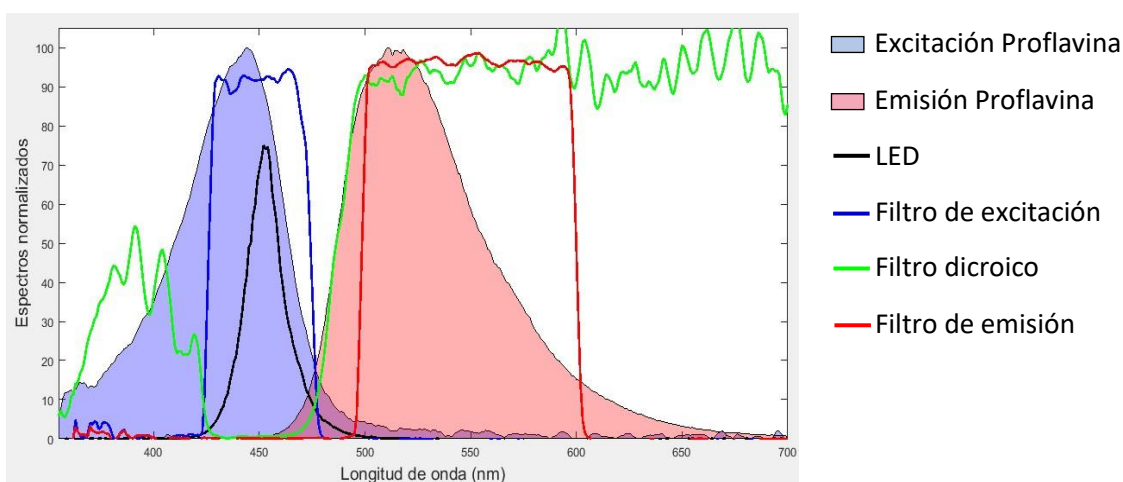


Figura 9. Conjunto de espectros del LED, filtros interferenciales y Proflavina.

Una vez determinados los filtros hemos procedido al montaje de la estructura optomecánica del microendoscopio. Para ello hemos empleado cubos, bases y postes de la firma Thorlabs, que permiten un ensamblaje modular del brazo de iluminación y detección mediante un cubo en el que se pueden insertar los tres filtros interferenciales, adecuados a los espectros de excitación y de emisión de la Proflavina.

Como fuente de iluminación hemos empleado un LED de longitud de onda de 450 ± 50 nm (color azul), un objetivo de 20x, y un mazo de fibras coherentes (Sumytono FIGH-30-850N). La alineación y acoplo del extremo de la fibra con el objetivo de microscopio ha sido la parte más costosa del montaje, dado que un pequeño desplazamiento o inclinación impedía la formación de la imagen. Para ello montamos la fibra sobre un soporte que puede desplazarse unas micras en X/Y. A su vez, para situar la fibra en el foco del microscopio, montamos todo el soporte en dos desplazadores micrométricos Z/Y que permiten en todo momento la focalización, con precisión y estabilidad.

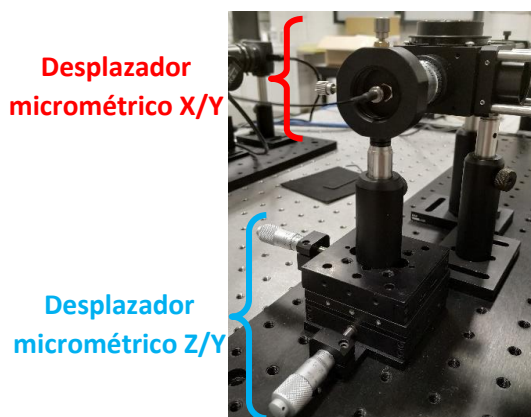


Figura 10. Soporte de la fibra óptica coherente.

Finalmente, hemos usado una CCD con un objetivo (Bresser) que cuenta con un sistema de lentes incorporado que focaliza la imagen en una CCD de 640 x 480 píxeles, con píxeles de 3,25x3,25 μm de tamaño y un ordenador. Adicionalmente, se ha sustituido la CCD y el ordenador por un ocular de Ramsdem y un *Smartphone* para la toma de imágenes.^{17,18}

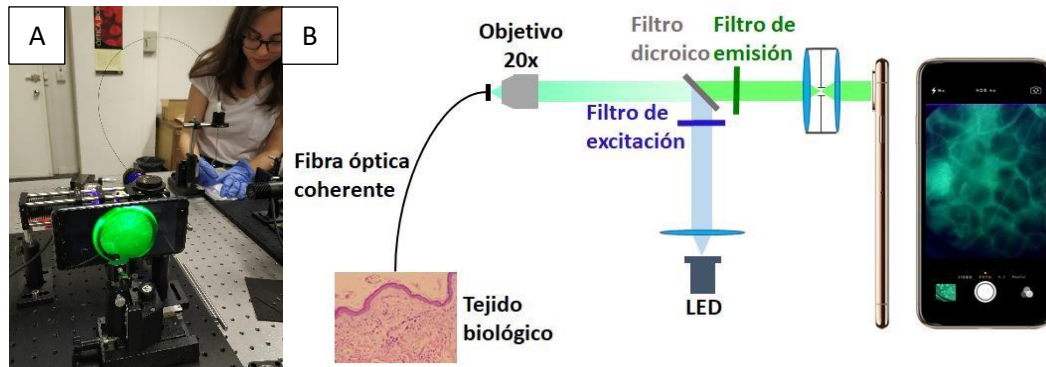


Figura 11. (a)Montaje del microendoscopio con *Smartphone* (b) Esquema óptico con *Smartphone*.

2.2.-CARACTERIZACIÓN ÓPTICA

Los parámetros más relevantes desde el punto de vista óptico para nuestro propósito son: aumento (M), resolución (R), intensidad (I), tiempo máximo de exposición (t_{\max}), el número de píxeles de muestreo por fibra (F_M) y el porcentaje de campo máximo detectable (%FOV).

El aumento lineal del instrumento se ha de elegir en base a un compromiso entre la frecuencia de muestreo y el máximo porcentaje de campo observable. En efecto, la frecuencia de muestreo se puede definir como:

$$F_M = \frac{D'_f}{W_p} = \frac{MD_F}{W_p}$$

donde D'_f representa el diámetro de la imagen de una fibrilla en el plano de la CCD, D_F es el diámetro real de una fibra del mazo que equivale a 4.6 μm y W_p es el tamaño de un píxel de la CCD que es 3.25 μm . Por otra parte, el %FOV se define como:

$$\%FOV = \frac{W_{CCD}}{W'_F} = \frac{W_{CCD}}{MW_F}$$

donde W_{CCD} representa el tamaño del sensor, W'_F es el tamaño de la imagen del mazo de fibras coherentes y W_F es el diámetro real de la fibra que es de 800 μm .

2.2.1.-AUMENTO

Para seleccionar el objetivo a usar, en primer lugar, calculamos el aumento total del instrumento empleando un objetivo de 10x y otro de 20x para tres redes de Ronchi: 20, 40 y 80 líneas/mm. Tomamos una imagen de cada una de ellas con cada objetivo para posteriormente

representar los periodos con MATLAB (ver Figura 12), en base al tamaño real del objeto (y) y al de la imagen (y'):

$$M = \frac{y'}{y} = \frac{n_p W_p}{L}$$

donde n_p es el número de píxeles que contienen cinco periodos tomados en este caso y L el tamaño real de cinco periodos.

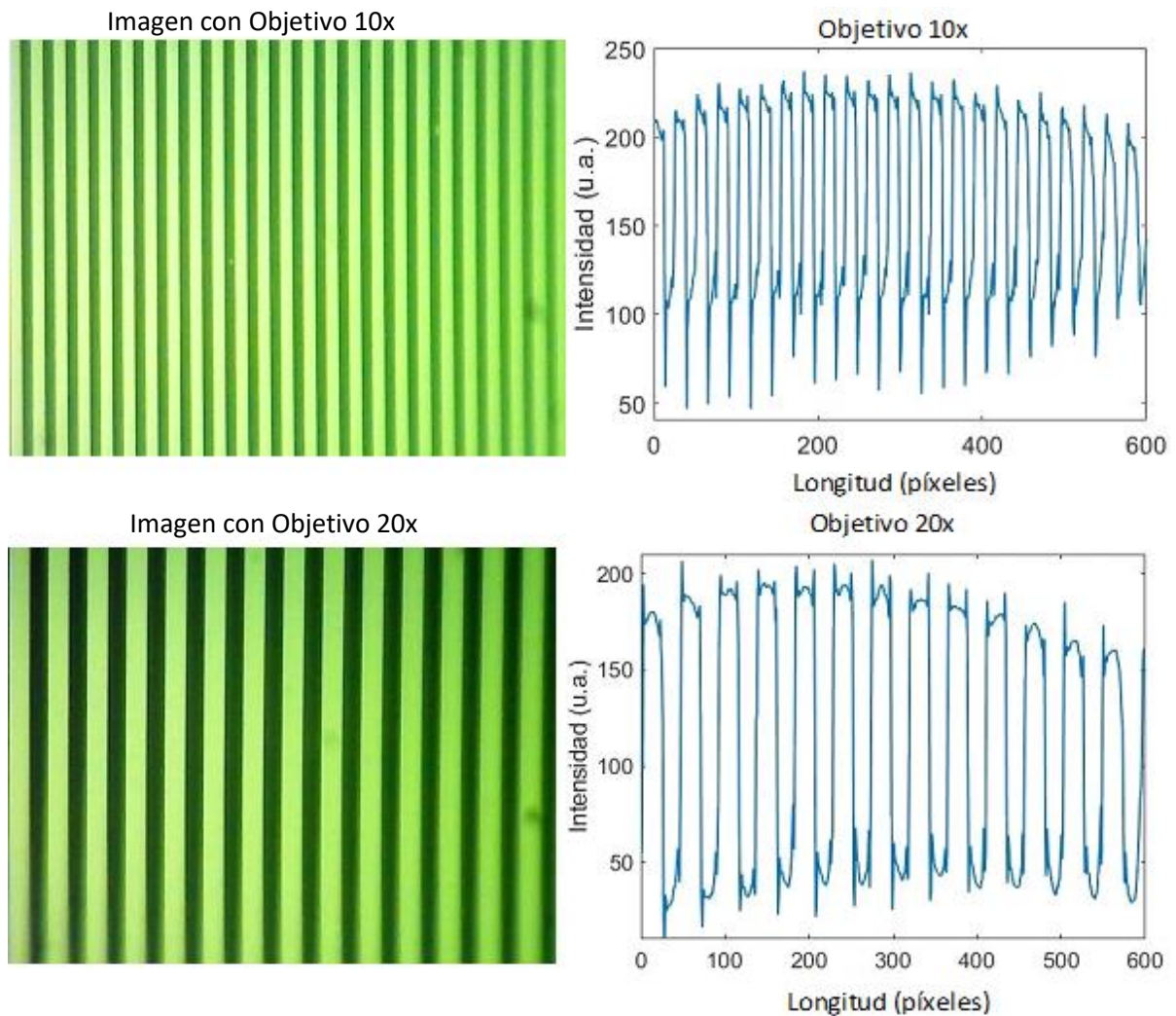


Figura 12. (a) Imágenes de la Red de Ronchi (b) Representaciones gráficas con MATLAB para los objetivos de 10x y 20x.

Por ejemplo, para una red de 20 líneas/mm y el objetivo de 10x, sustituyendo los valores obtenemos un aumento de:

$$M = \frac{104 \cdot 3.25}{250} = 1.4x$$

En cambio, para la misma red, pero con un objetivo de 20x el aumento correspondiente es:

$$M = \frac{226 \cdot 3.25}{250} = 3x$$

A partir del aumento lineal hallamos F_M y %FOV para seleccionar el objetivo que nos proporcione un $F_M \geq 4$ con la finalidad de que nuestra CCD muestree adecuadamente la imagen. Para el objetivo de 10x se obtiene un valor de F_M de 2 y un %FOV en la altura del sensor de 1.47; y para el objetivo de 20x, el valor de F_M es 4 y %FOV en la altura de sensor de 0.66. En conclusión, aunque con el 10x logramos un mayor campo permitiéndonos visualizar el diámetro total de la fibra, la frecuencia de muestreo es menor. Como nos interesa una frecuencia de muestreo lo mayor posible empleamos el objetivo de 20x.

2.2.2.-RESOLUCIÓN

Para estimar la resolución formamos la imagen de un test de resolución USAF-1951, de Thorlabs. En la Figura 13 se puede apreciar que el último que somos capaces de discriminar es el elemento 4 dentro del grupo 6. Para cuantificarlo, empleamos la siguiente fórmula:

$$R = \frac{1000}{2x2^{\left(\frac{\text{grupo} + \frac{\text{elemento} - 1}{6}\right)}} = 5.52 \mu\text{m}$$

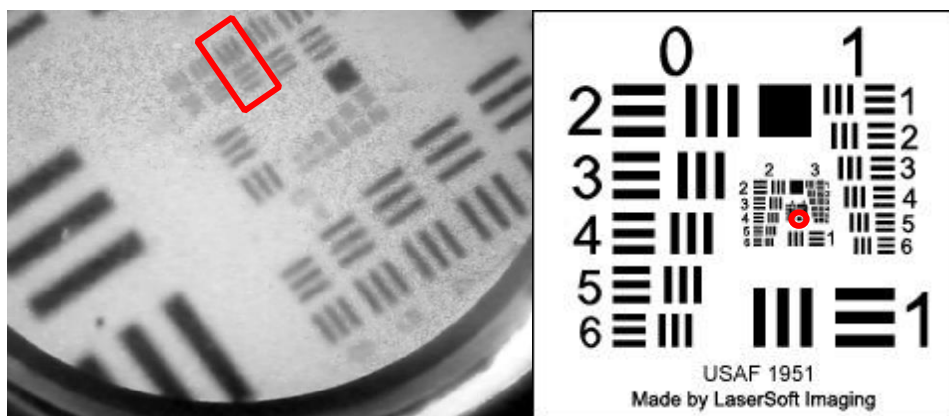


Figura 13. Test de resolución.

2.2.3.-IRRADIANCIA EN LA MUESTRA

Con la finalidad de ver si la irradiancia que alcanza al tejido produce daño biológico, hemos medido la potencia a la salida de la fibra en dos situaciones, (i) con el LED a su máxima potencia (I_M) y (ii) con el LED a una potencia media (I_m). Para ello situamos el extremo de la fibra en el sensor del medidor de potencia (Thorlabs) como se aprecia en la Figura 14. El valor obtenido

de potencia máxima del LED es (i)(1.350±0.001) mW y la empleada para la observación celular es (ii)(47.0±0.1) μW. Podemos entonces estimar la irradiancia dada por:

$$I = \frac{P}{\pi r^2}$$

donde r es el radio de la fibra. El valor de irradiancia máxima se corresponde con:

(i)($I_M=268.6\pm0.2$) mW/cm² y la irradiancia empleada para nuestras medidas es de:
(ii)($I_m=9358\pm2$) μW/cm².

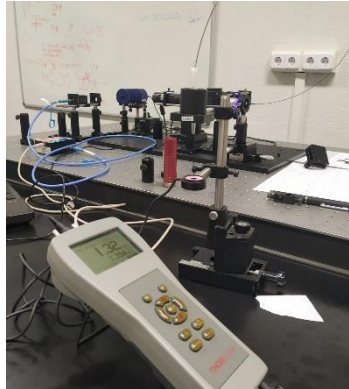


Figura 14. Montaje empleado para medir la potencia.

Con estos valores podemos estimar el tiempo máximo de exposición. Para ello, usamos los valores de fluencia máxima suministrados por la norma ANSI Z136.1¹⁹:

$$F_{MPE} = 11.1 t^{0.25}$$

donde F_{MPE} es la fluencia en kJ/m² y el tiempo se expresa en s.

Teniendo en cuenta que la $F=I t$, igualando ambas expresiones obtenemos:

$$t_{\max} = 0.75 \sqrt{\frac{11.1}{I(\text{kW} / \text{m}^2)}}$$

Para el valor de irradiancia máxima del LED el tiempo máximo es del orden de 6s y el valor para la irradiancia media es de 10 min. Por lo tanto, se puede emplear esta última para la observación de tejido celular sin producir daño biológico.

3.-RESULTADOS

3.1 OBSERVACION DE CÉLULAS IN VITRO

Para analizar la aplicabilidad del microendoscopio *in vitro*, se han realizado cultivos celulares en el departamento de bioquímica de la Facultad de Óptica y Optometría de células NPE (Non-Pigmented layer of the ciliary Epithelium) y de células SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea). Para ello empleamos una mezcla de DMEM (Dulbecco Modified Eagle

minimal esencial medium) y 10% de FBS (Suero Fetal Bovino) sugerido por el laboratorio al que se le compraron las células. El DMEM es el medio más utilizado para realizar cultivos que requieren adherencia (tejidos), contiene altos porcentajes de vitaminas, aminoácidos y glucosa para la subsistencia celular y también un indicador de pH rojo fenol²⁰. El FBS es el suplemento para cultivos celulares más utilizado por los agentes promotores de crecimiento que contiene el tejido embrionario, con la finalidad de la prosperación celular²¹. Además, necesitamos pipetas de 20 y 10 ml, micropipetas de 1000 μ l, frascos y placas de 12 pozos de cultivo, Falcon de 15 y 50 ml, vaso de precipitados, campana extractora, calefactor de baño María, estufa y centrifugadora.

En primer lugar, descongelamos las células al baño María y retiramos el anticongelante por su toxicidad, para ello añadimos un poco de medio nutritivo (DMEM más 10% de FBS) junto a las células en un Falcon de 15 ml y lo centrifugamos a 1800 rpm durante 5 min. Posteriormente, retiramos la fase líquida del Falcon y añadimos 10 ml de medio para diluir las células con una micropipeta hasta conseguir que todas las células se encuentren en suspensión. En segundo lugar, sacamos 5 ml de la mezcla diluida celular y los incorporamos a un frasco de cultivo al que añadimos 40 ml de medio nutritivo; en otro recipiente, extraemos 1 ml del concentrado celular que mezclamos con 16 ml de medio nutritivo, para echar finalmente 4 ml en cada pozo de la placa. Por último, fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante unos días.

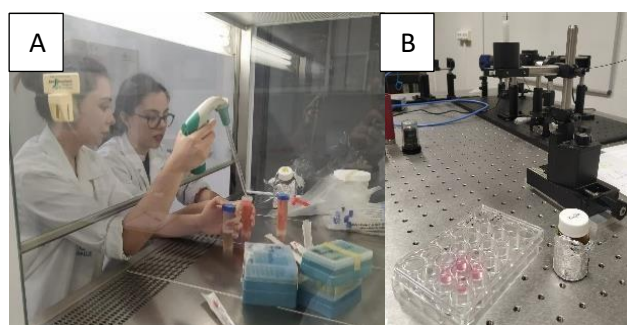


Figura 15. (a) Elaboración del cultivo (b) Placa de pozos pre-observación con el microendoscopio de fluorescencia.

Tomamos dos tipos de imágenes de las células NPE de un mismo pozo, primero captamos imágenes con el microscopio convencional (Nomarski) del laboratorio. Seguidamente aplicamos 20 μ l de Proflavina en el pozo, esperamos 5 minutos para que se introduzca en los núcleos celulares y tomamos imágenes de fluorescencia con nuestro microendoscopio.

Podemos apreciar el resultado en la Figura 16. En la Figura 16 A se puede apreciar toda la estructura celular, como el citoplasma, el núcleo e incluso alguno de los orgánulos celulares mientras que, en la imagen obtenida con nuestro microendoscopio de fluorescencia, Figura 16 B, se observan los núcleos de las células NPE como se requiere para nuestro estudio.

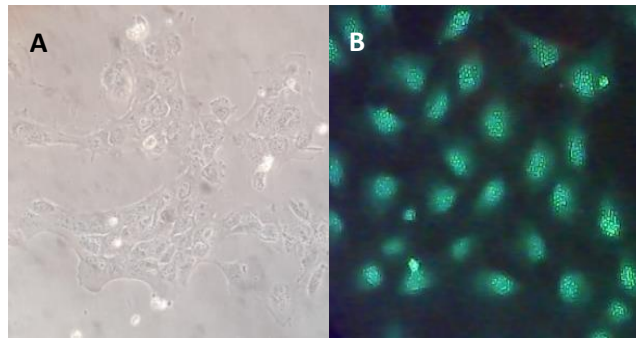


Figura 16. (a) Imagen tomada desde el microscopio Nomarski.(b) Imagen tomada con nuestro microendoscopio de fluorescencia.

3.2 OBTENCIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

Para extraer información cuantitativa de los núcleos celulares realizamos un tratamiento de imagen, desarrollando una serie de *Scripts* en MATLAB. Hemos seguido el siguiente procedimiento:

- Convertimos la imagen de color a escala de grises con la finalidad de eliminar la información de matiz y saturación, pero manteniendo la luminancia. Simplificando de este modo la matriz imagen de 3 dimensiones a 2.
- Realizamos un ajuste del contraste para facilitar la posterior binarización.
- Aplicamos un filtro Gaussiano con el que eliminamos el falso pixelado producido por la estructura de las fibras que conforman el mazo de fibras coherentes.
- Binarizamos la imagen para segmentar los núcleos celulares del fondo, aportando según la luminancia valor 1 (blanco) o valor 0 (negro).
- Atribuimos un falso color convirtiendo la matriz de etiquetas en imagen RGB (Red- Green- Blue) con el fin de visualizar las regiones etiquetadas.

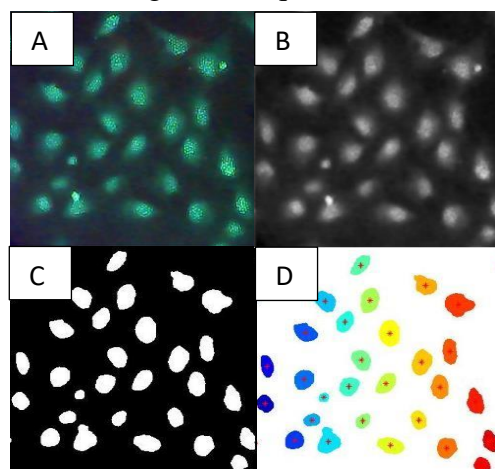


Figura 16. (a) Imagen sin tratar. (b) Imagen con filtro Gaussiano. (c) Imagen binaria. (d) Imagen con falso color y marcado el centro nuclear “*”.

A partir del etiquetado nuclear calculamos los valores del área, la excentricidad, la solidez y la relación ratio N/C, puesto que la mayoría de las alteraciones propias de la proliferación del cáncer se producen en los núcleos celulares, alterando su morfología; por lo que consideramos relevantes estos parámetros para caracterizar el tejido. Los programas realizados se pueden ver en el Anexo 1.

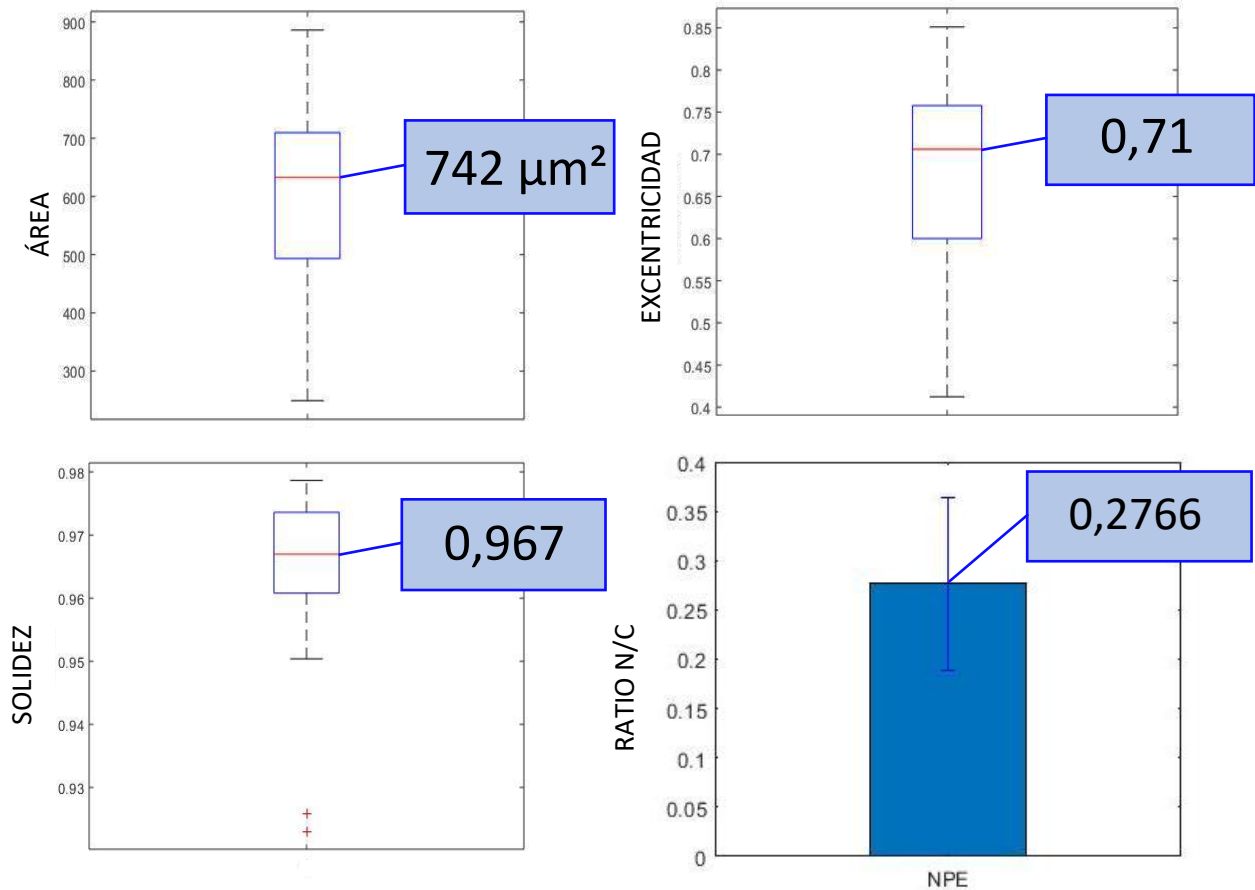


Figura 17. Diagramas obtenidos a partir del Script del Anexo 1.

Estos valores se corresponderían con los de un tejido sano. En caso de encontrarnos ante un tejido tumoral, cabe esperar que los valores se vean modificados, de tal forma que el área, la excentricidad y el ratio N/C nuclear aumentarían como consecuencia del incremento del radio nuclear que produce una invasión del citoplasma y el pleomorfismo nuclear; y una reducción de la solidez que es una medida que nos permite valorar la irregularidad de la estructura nuclear.¹⁶

3.3.- CASO CLÍNICO

A continuación, hemos pasado a considerar una muestra biológica real *in vitro*. Se trata de una hembra canina mestiza grande de 13 años. Acude a consulta veterinaria por inflamación de las extremidades traseras, que le dificultaban la movilidad y estado anímico depresivo. Se le

realizó un examen completo y se ordenó una analítica para descartar infecciones y dos radiografías una de tórax y otra de cadera, para descartar alteraciones renales o hepáticas y artritis reumatoide. Todas ellas fueron inconcluyentes, solo se observó un ligero aumento de

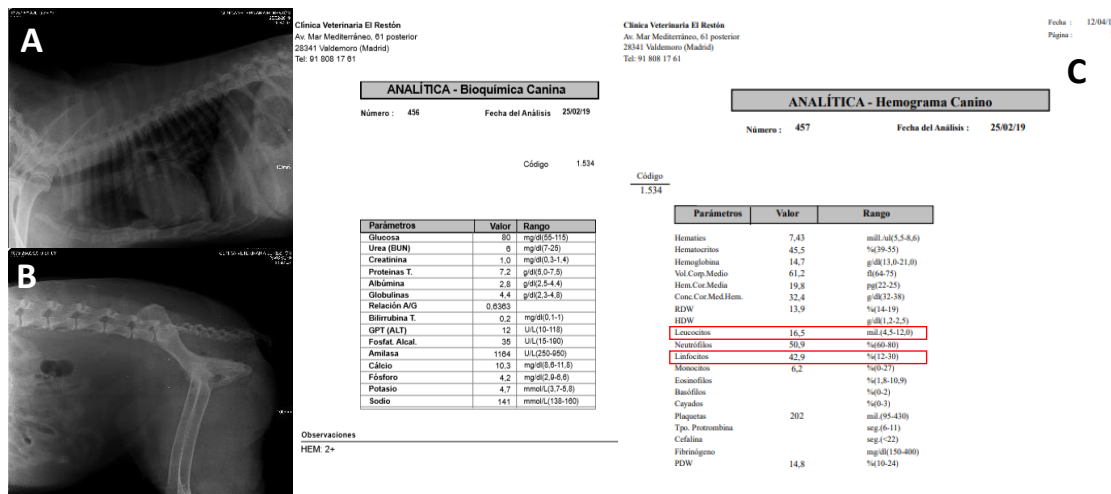


Figura 18. (a) Radiografía de tórax, (b) Radiografía de cadera y (c) Analítica.

los leucocitos y linfocitos, pero no como para clasificarlo como patología de tipo infeccioso.

En un posterior examen, se diagnosticó que todas las mamas habían sido invadidas por el tumor a excepción de las 1, 2 y 3 del lado izquierdo. La muestra descrita por el histopatólogo es: irregular, de 5 x 4,5 x 2 cm, al corte se observa un nódulo, bien delimitado, de coloración blanquecina con zonas pardas, que tiene un diámetro máximo de 2 x 1,4 cm y además se observa otro pequeño nódulo de 1 x 0,7 cm a analizar por el histopatólogo y se reservó otra muestra igual para nuestro estudio.

3.4.-ANÁLISIS DEL CASO CLÍNICO

La descripción microscópica de la muestra analizada por el histopatólogo Andrés Calvo Ibbitson de VetPatólogos fue la siguiente: “Se identifica una formación que muestra un crecimiento multinodular, mal delimitado y muy infiltrante. Sigue un patrón de crecimiento en masas sólidas. Estas células presentan pleomorfismo celular evidente e intensas atipias nucleares y un índice mitótico de grado moderado, contabilizándose 15 mitosis en 10 campos a 40x. Hay focos de necrosis que ocupan entorno al 20% del parénquima tumoral. El estroma es escaso. Los márgenes de resección están libres de infiltración tumoral. Hay zonas de dermis edematosas y con células inflamatorias dispersas, con predominio de neutrófilos y linfocitos. Invasión linfovascular (émbolos tumorales en el interior de vasos linfáticos y/o vasculares), invasión linfovascular dérmica, se aprecian múltiples acúmulos de células neoplásicas en la luz de los vasos linfáticos subepiteliales y no se identifica invasión perineural.”

El diagnóstico final obtenido fue Carcinoma Mamario Sólido (inflamatorio) que se caracteriza por ser una neoplasia mamaria de alta malignidad formada por células epiteliales con patrón de crecimiento en masas sólidas muy infiltrantes. Por tanto, se trata de un tumor agresivo y su pronóstico es desfavorable.

Por otro lado, el procedimiento a seguir para analizar las muestras con el microendoscopio de fluorescencia es impregnar un hisopo en una disolución de Proflavina al 0,01% masa-volumen para repartir uniformemente la disolución sobre la muestra con el fin de evitar excesos que puedan generar hiperfluorescencia que sature la imagen a analizar.

Tras esperar 5 minutos post-aplicación de Proflavina sobre las muestras, se procede a la toma de imágenes en distintas localizaciones del tejido, abarcando tejido glandular, adiposo y conectivo denso no modelado que conforman el tejido mamario.

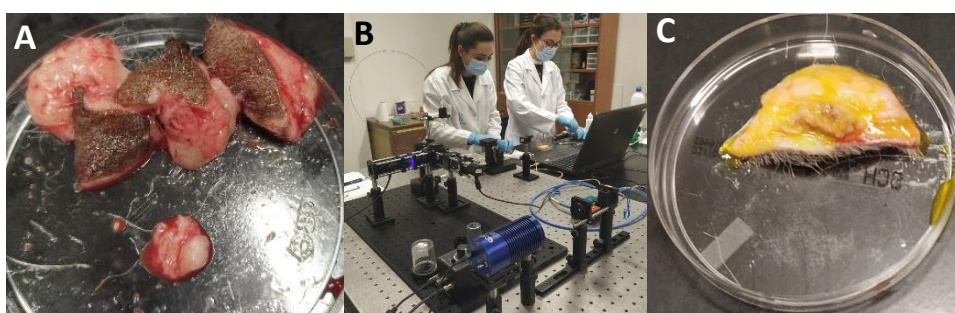


Figura 19. (a) Biopsia de tejido sano L4. (b) Preparación de la muestra para observarla con el microendoscopio de fluorescencia. (c) Biopsia de tejido tumoral con Proflavina R4.

En primer lugar, fuimos capaces de observar los tejidos conectivos denso no modelado y adiposo blanco que se sitúan en el área circundante a las glándulas mamarias.

- ✦ Tejido conectivo denso no modelado: cuya función es proporcionar soporte y sostén celular, además de actuar como un sistema defensivo al ser resistente y poco flexible.²² Está constituido por haces gruesos de fibras de colágeno sin orientación definida que conforman la matriz del tejido y un pequeño número de células, la gran mayoría responsables del mantenimiento y síntesis de las fibras de colágenas, denominadas fibroblastos.^{23, 24}

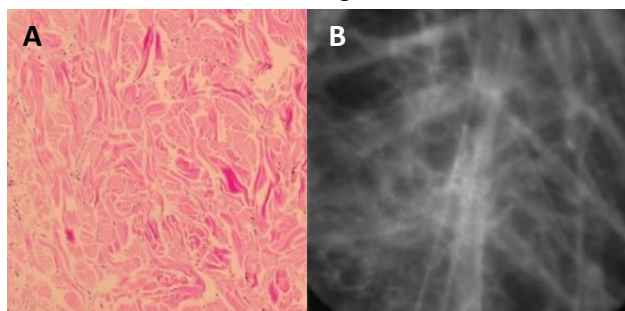


Figura 20. Tejido conectivo denso no modelado. (a) corte histológico tradicional con tinción hematoxiliana-eosina (H&E). (b) Captado con el microendoscopio de fluorescencia utilizando Proflavina.

- ✦ Tejido conectivo adiposo blanco: es un tejido conectivo especializado que constituye las reservas de energía del organismo, almacenada en forma de triglicéridos y también cuenta con una función endocrina ya que secreta moléculas encargadas de regular el peso, la función reproductora, la respuesta inflamatoria y la función vascular. Además, actúa como amortiguador de impactos ejerciendo una función protectora y como aislante térmico. Lo conforman adipocitos, que como se puede ver en la Figura 21 son células redondeadas y de gran tamaño, todo su citoplasma está ocupado por los triacilgliceroles que acumula, separados por estrechas capas de tejido conectivo laxo compuesto por colágeno tipo III, fibroblastos y mastocitos.^{25, 26, 27, 28}

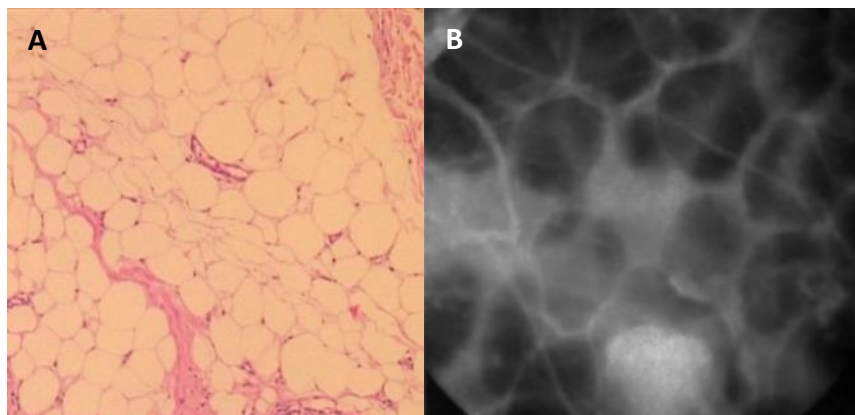


Figura 21. Tejido conectivo adiposo blanco. (a) corte histológico tradicional H&E y la imagen (b) tomada por el microendoscopio de fluorescencia empleando Proflavina.

En segundo lugar, caracterizamos los tipos de glándula mamaria en función del estado de sus núcleos celulares, entre normal-hiperplásico y carcinoma mamario sólido.

- ✦ Glándula mamaria normal-hiperplásica: se trata de un tejido tubular cuyas células conforman pequeños lóbulos que desembocan en los conductos galactóforos. El tejido glandular está rodeado de tejido conjuntivo denso no modelado infiltrado por abundante tejido adiposo (tejido interlobulillar) y tejido conjuntivo laxo (tejido intralobulillar) como se puede ver en la Figura 22. Es un tejido variable en función de la edad, el sexo y el estado fisiológico, se trata de una glándula mamaria en reposo. Como se considera un tumor muy invasivo, a pesar de contar el tejido con una apariencia normal, se clasifica como hiperplasia (benigno) ya que sus núcleos toman un tamaño levemente mayor.^{29, 30}

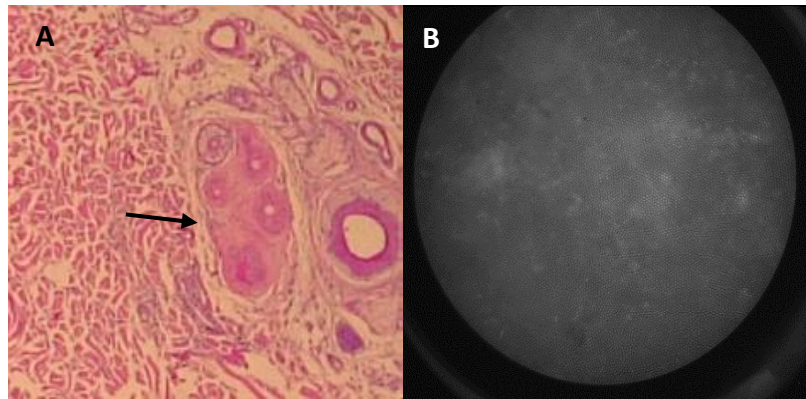


Figura 22. Tejido glandular mamario, (a) Corte histopatológico tradicional, (b) Captada con nuestro microendoscopio de fluorescencia.

- ✦ Carcinoma mamario sólido: pierde la estructura típica tubular, cuenta con un alto ratio mitótico y sus núcleos dejan de tener una estructura redondeada y adquieren tamaños grandes y variados entre ellos. También podemos apreciar cómo se vuelve difuso el límite entre tejido conectivo laxo y glandular, todo esto a consecuencia de la invasión del tejido tumoral.³¹

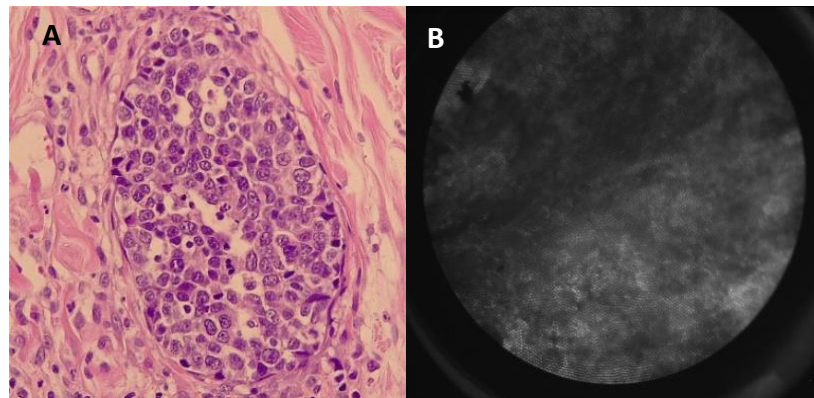


Figura 23. Carcinoma Mamario Sólido, (a) Corte histológico tradicional (b) Observada con nuestro microendoscopio de fluorescencia.

4.- DISCUSIÓN

Investigadores como Rebecca Richards-Kortum han aprobado el uso de fluoróforos para visualizar imágenes de fluorescencia mediante microendoscopios de fibra y posteriormente poder caracterizar cuantitativamente y diferenciar estructuras celulares^{15,16,32}. En este trabajo hemos diseñado y construido el instrumento tomando como referencia trabajos anteriores descritos en la bibliografía^{15,16,17,32}. Además, hemos obtenido imágenes de fluorescencia de núcleos celulares de distintas muestras utilizando la Proflavina como fluoróforo. Finalmente, hemos desarrollado *Scripts* en MATLAB para obtener información cuantitativa de la morfología de los núcleos observados. Las características ópticas de nuestro microendoscopio son: un aumento del triple del tamaño objeto, suficiente para la visualización de los núcleos de las células; una CCD que cuenta con un tamaño de pixel adecuado para resolver la fibra óptica

coherente (cuatro píxeles resuelven una fibra); una resolución del instrumento de 5.52 μm , considerándose un instrumento de alta resolución al igual que otros microendoscopios de estudios contenidos en la bibliografía al compararlo con los endoscopios de cámara empleados en la práctica médica actual^{15,16,17,32}; y un tiempo máximo de exposición alto, de 10 min, para una potencia del LED de 47.04 μW , con la que no produciríamos daño celular.

Uno de los problemas que nos surgieron durante el cálculo de algunos parámetros tanto de la caracterización óptica como morfológica, fue conocer el tamaño de los píxeles de la CCD; pero lo solventamos contactando con la empresa Bresser, fabricante de nuestra CCD. Otra de las dificultades que nos encontramos en relación con el instrumento fue sustituir la CCD conectada al ordenador por un *Smartphone*, porque fue más difícil de alinear que la CCD; para lograrlo tuvimos que usar una pinza sobre un soporte que nos permitiera desplazar el teléfono en X/Y. A pesar de estas dificultades nos interesa incorporar un *Smartphone* al microendoscopio para que sea fácil de manejar, portátil y compacto. Además, permite compartir imágenes a tiempo real y es un *gadget* que tiene la mayor parte de la población.

A diferencia de estudios recientes, adquirimos imágenes de células y tejidos diferentes. Uno de los cultivos realizados en el laboratorio fueron células SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) que debido a su alta tasa de división celular y al uso de medio celular no completamente adecuado, la mayoría sufrieron apoptosis. No obstante, en uno de los cultivos realizados en el que sobrevivieron algunas células, pudimos visualizarlas y tomar algunas imágenes, pero debido a esta alta proliferación celular, se acoplaban unas sobre otras, dificultando el tratamiento de la imagen. Además, los resultados podrían estar afectados por la distinta morfología de las células muertas y vivas que contenía una misma imagen de fluorescencia. El otro cultivo que elaboramos fue de células NPE, con el que obtuvimos resultados favorables como se ha podido observar en este trabajo, ya que visualizamos los núcleos celulares y obtuvimos información cuantitativa desarrollando unos *Scripts* en MATLAB.

La dificultad para la separación de los núcleos celulares de las diferentes capas que conforman el tejido sano y tumoral hace necesario una división de las capas o la aplicación de un contraste para distinguir las células más superficiales de las del fondo. Como con nuestro Script no fuimos capaces de discriminar los núcleos de los tejidos, desarrollamos otro Script con el que analizar la entropía (medida del desorden molecular) y diferenciar el tejido sano (menor entropía) del tejido tumoral (mayor entropía); pero no obtuvimos resultados concluyentes. Por lo que consideramos que se requiere una ampliación del estudio para poder detectar los cambios estructurales precozmente, ya que es crucial para lograr un tratamiento exitoso y también de

este modo poder analizar los posibles falsos negativos para poder buscar métodos con los que solventarlos.

A parte, en el caso clínico pudimos observar los tejidos de alrededor: el tejido conectivo y el tejido adiposo, y contrastarlo con las correspondientes imágenes tomadas por un histopatólogo, lo que fomenta el uso de la fluorescencia para la visualización de todo tipo estructuras. Tras la observación de diferentes tejidos *in vitro* proponemos la posibilidad de poder visualizarlos *in vivo* como se expone en la bibliografía consultada^{33,34}.

Tras realizar una toma de imagen de estas estructuras, era necesario la limpieza de la fibra óptica con alcohol por el cúmulo de restos celulares entre las fibras del mazo, lo que era bastante laborioso. Para evitar este inconveniente y que la toma fuera lo más rápida y cómoda posible convendría el empleo de la lente GRIN o un sistema de lentes en el extremo distal de la fibra.

Durante la experimentación nos dimos cuenta de la importancia de la concentración y método de instilación del fluoróforo para obtener contraste adecuado de la imagen de fluorescencia, ya que altas concentraciones e instilaciones con pipetas sobre tejido producen hiperfluorescencias que impiden la observación sea óptima. El método que nos resultó más efectivo fue la instilación mediante un hisopo impregnado en Proflavina al 0.01% masa-volumen.

Como ampliación de nuestro estudio nos planteamos la búsqueda de nuevos fluoróforos para la visualización de diferentes estructuras celulares como los quantum dots, que son nanopartículas semiconductoras que según su tamaño emiten a una longitud de onda determinada. Para ello, emplearíamos varias fuentes de iluminación, filtros multiespectrales y nanopartículas de diferentes tamaños que se adhirieran al núcleo, citoplasma y orgánulos, con la finalidad de visualizarlos al mismo tiempo³⁵. Así como, métodos con los que obtener imágenes con las que poder analizar áreas más extensas, recurriendo a la técnica del *mosaicig* que permite el acoplamiento de imágenes.³⁶

5.- CONCLUSIÓN

Hemos construido y caracterizado un microendoscopio de fibra para la observación de imágenes de fluorescencia de diferentes estructuras celulares; visualizando los núcleos en primer lugar de las células NPE, SIRC y de los tejidos tumoral y sano del caso clínico, la membrana plasmática de los adipocitos y las fibras de colágeno.

Hemos desarrollado varios programas en MATLAB para realizar un procesamiento de imágenes con la finalidad de extraer información cuantitativa de parámetros morfológicos de las células *in vitro* tales como el área, la excentricidad, la solidez y la relación ratio núcleo-citoplasma.

Calculamos estos parámetros dado que durante el desarrollo del cáncer los núcleos celulares experimentan cambios morfológicos, detectables a partir de ellos.

Ello abre la posibilidad de realizar biopsias ópticas, es decir, distinguir de acuerdo a dichos parámetros tejidos normales de tejidos cancerosos. Tratándose de un método menos invasivo y más rápido, no se requiere de la extracción de un tejido para su posterior análisis, sino que se puede efectuar directamente dentro y fuera del cuerpo a tiempo real gracias a la fibra óptica que cuenta con un diámetro de 800 μ m, es flexible y resistente. Como no es necesaria la extracción de tejido, podemos analizar toda la zona sospechosa para evitar falsos negativos.

6.-AGRADECIMIENTOS.

Queremos dar nuestro agradecimiento a OCUPHARM, en concreto a Fernando Huete Toral por ayudarnos en la elaboración del cultivo celular y cedernos el instrumental necesario.

A la empresa alemana BRESSER por su disposición inmediata para solventar las dudas sobre los diferentes parámetros de la CCD.

A la clínica veterinaria EL RESTÓN, en especial; a Sonia Ortega por su entrega con nuestro estudio al donarnos las muestras utilizadas en el caso clínico, así como; al histopatólogo de VET PATÓLOGOS por hacer un examen histopatológico completo y cedernos las imágenes de las muestras.

Al departamento de Óptica de la Facultad de Óptica y Optometría (Universidad de Complutense) por cedernos las instalaciones adecuadas y el instrumental empleado en la elaboración de nuestro microendoscopio de fluorescencia.

A la Facultad de Óptica y Optometría de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID por la formación especializada adquirida durante estos cuatro años, que nos ha permitido realizar este estudio.

A nuestros queridos tutores: Miguel Antón Revilla y Eduardo Cabrera Granado por su entrega y dedicación, así como; por sus innumerables palabras de aliento en las diversas situaciones vividas a lo largo del estudio. De igual modo queremos agradecer su propuesta de este trabajo fin de grado que nos ha hecho ver varias de las aplicaciones estudiadas a lo largo del grado en Óptica y Optometría.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018: World Health Organization. 2018 Septiembre. Press Release N° 263.
2. Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. El cancer; [actualizado 9 febrero 2015]. Instituto Nacional de Salud de EE.UU. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
3. Keereweer S, Van Driel P, Snoeks T, Kerrebijn J, Baatenburg de Jong R., Vahrmeijer A, et al. Optical Image-Guided Cancer Surgery: Challenges and Limitations. *Clinical Cancer Research*. 2013 May 14; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3598.
4. Santos E. El cáncer como resultado de alteraciones de señalización celular. Real Academia de Medicina de Salamanca, editora. *Biología molecular del cáncer: del laboratorio a la clínica*. Disponible en: <http://www.cicancer.org/es/el-cncer-como-resultado-de-alteraciones-de-senalizacion-celular>
5. Utsuki S, Oka H, Fujii K. Intraoperative photodynamic diagnosis of Brain tumors using 5-Aminolevulinic acid. En: Abujamra AL, editora. *Diagnostic Techniques and Surgical Management of Brain Tumors*. Japón: Intechopen;2011. p. 227-244.
6. Santos de Vera A. Manejo Quirúrgico en la Recidiva de Gliomas. Universidad de Navarra. 2014.
https://www.unav.edu/documents/29044/3857481/P9.T7T+Santos+De+Vera,%20Alonso_posterTFG.pdf
7. Gebro Pharma. Acido 5- aminolevulínico. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceuticos. 2010.
8. Tonn JC, Stummer W. Fluorescence-guided Resection of Malignant Gliomas Using 5-aminolevulinic Acid: Practical Use, Risks, and Pitfalls. *Clinical Neurosurgery*. 2008;55:20-26.
9. Oliver Ayats Institute [Internet]. Resección de gliomas malignos guiados por fluorescencia. [publicado 2012 Feb 29]. Disponible en: <https://www.oliverayatsinstitute.com/reseccion-de-gliomas-malignos-guiada-por-fluorescencia/>
10. Sasikala WD and Mukherjee A. Structure and dynamics of proflavine association around DNA†. *Royal Society of Chemistry*. 2016 Apr 21;18(15):10383-91. PubMed;PMID: 27030311.

11. Prieto SP, Powless AJ, Boice JW, Sharma SG, Muldoon TJ. Proflavine Hemisulfate as a Fluorescent Contrast Agent for Point-of-Care Cytology. PLOS ONE. 2015 May 11;10(5):1-15.
12. Manson WT. Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity. Biological Techniques Series, Londres: Academic Press; 1999. p. 33.
13. Yildiz I, Lee KL, Chen K, Shukla S, Steinmetz NF. Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: cargo-loading and delivery. 2013 Dec 10;172(2):568-78. PubMed PMID:23665254; PubMed Central. PMCID:PMC3815978.
14. Gatasheh MK, Kannan S, Hemalatha K, Imrana N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. ScienceDirect. 2017 Aug 7;3:272-8.
15. Pierce M, Yu D, Richards-Kortum R. High-resolution Fiber-optic Microendoscopy for in situ Cellular Imaging. Journal of Visualized Experiments. 2011 Nov 1; 47(4):1-4.
16. Shin D, Protano MA, Polydorides AD, Dawsey SM, Pierce MC, Kang Kim M, et al. Quantitative Analysis of High Resolution Microendoscopy Images for Diagnosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2015;13:272-279.
17. Hong X, Nagarajan V, Mugler D, Yua B. Smartphone microendoscopy for high resolution fluorescence imaging. University of Akron, Department of Biomedical Engineering, Akron. 2016 Mar 7.1-4.
18. Wei Q, Acuna G, Kim S, Vietz C, Tseng D, Chae J et al. Plasmolec Enhanced Smartphone Fluorescence Microscopy. Scientific Reports. 2017 May 18. 7:2124(10):1-4.
19. ANSI, American National Standard for Safe Use of Lasers. Laser Institute of America. 2014.
20. Sigma-Aldrich [Internet]. DMEM. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/dmem.html>
21. Sigma-Aldrich [Internet]. FBS. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>.
22. Junqueira L. C., Carneiro J. Tejido Conjuntivo. 6ª ed. Histología Básica. Barcelona: Masson; 2005. p. 92-124.

23. Ross M. H., Pawlina W., Barnash T. A. Tejido Conjuntivo. Atlas de Histología Descriptiva. Buenos Aires: Panamericana, 2012. p. 12-14
24. Guarinos M. Blogia: Tejido conjuntivo laxo [Internet]. Murcia: Mónica Guarinos. 2015 Nov. Disponible en: <http://biojcosta.blogia.com/2015/111011-tejido-conjuntivo-laxo.php>
25. Junqueira L. C., Carneiro J. Tejido Adiposo. 6ª ed. Histología Básica. Barcelona: Masson; 2005. p. 125-126.
26. Ross M. H., Pawlina W., Barnash T. A. Tejido Adiposo. Atlas de Histología Descriptiva. Buenos Aires: Panamericana, 2012. p. 26-28.
27. Benito de las Heras M. R. Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. p. 301-305.
28. Megías M., Molist P., Pombal M. A. Conectivo Adiposo. Atlas de Histología Animal y Vegetal: Tejidos Animales. Vigo. 2016 Dic.
29. Junqueira L. C., Carneiro J. Aparato Reproductor Femenino. 6ª ed. Histología Básica. Barcelona: Masson; 2005. p. 449.
30. Ross M. H., Pawlina W., Barnash T. A. Sistema Genital Femenino. Atlas de Histología Descriptiva. Buenos Aires: Panamericana, 2012. p. 332.
31. Gloria. CitopatVeterinaria: Grados Histológicos de los tumores mamarios en perras [Internet]. 2017 Ag. Disponible en: <http://www.citopatveterinaria.com/es/grados-histologicos-los-tumores-mamarios-las-perras/>
32. Kidwai S, Parasher A, Schorn V, Demicco E, Richards-Kortum R, Iloreta A et al. Optical Imaging with a high resolution microendoscope to identify sinonasal pathology. Am J Otolaryngol. 2018 Mar 12. 39(4):383-387.
33. Cha J, Paukert M, Bergles D, Kang J. Fiber optic fluorescence microscopy for functional brain imaging in awake mobile mice. Proceedings of SPIE. 2014 Mar 20. Vol 8928; 1-7.
34. Cha J, Kang J. Video-rate Multicolor Fiber-optic Microscopy. Imaging and Applied Optics. 2013. Paper IM4E.4. 1-3.
35. Krstajic N, Akram A, Choudhary T, McDonald N, Tanner M, Pedretti E et al. Two-color widefield fluorescence microendoscopy enables multiplexed molecular imaging in the alveolar space of human lung tissue. Journal Biomedical Optics. 2016 Abr 27. Vol 21(4);1-12.

36. Bedard N, Quang T, Schmeler K, Richards-Kortum R, Tkaczyk T. Real-time video mosaicing with a high-resolution microendoscope. *Biomedical Optics*. 2012 Sep 7. 3(10): 2428–2435. PubMed PMID: 23082285; PubMed Central PMCID: PMC3469983.

8.- ICONOGRAFÍA

I. Winslow T [Internet]: ¿Qué es el cáncer? Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

II. Oliver Ayats Institute [Internet]. Resección de gliomas malignos guiados por fluorescencia. [publicado 2012 Feb 29]. Disponible en: <https://www.oliverayatsinstitute.com/reseccion-de-gliomas-malignos-guiada-por-fluorescencia/>

III. Glentham Life Science [Internet]: GT1397 Proflavine hemisulfate salt hydrate. Disponible en: <https://www.glentham.com/en/products/product/GT1397/>

ANEXO: SCRIPTS DEL TRATAMIENTO DE IMAGEN

```
clear all;
I = imread('NPE.jpg');
imshow(I);
I = rgb2gray(I);
imshow(I);
I=imadjust(I);
imhist(I);
imshow(I);
I=double(I);
I=I./max(max(I));
imshow(I);
Ifilt=imgaussfilt(I,1.5);
Ifilt=imcrop(Ifilt);
imshow(Ifilt)
thr=0.6;
BW=imbinarize(Ifilt,thr);
figure
imshow(BW)
figure
imshowpair(BW,Ifilt)

[labels,n] = bwlabel(BW);
etiquetascolor = label2rgb(labels);
imshow(etiquetascolor);

%Caracterización cuantitativa de los núcleos

props = regionprops(labels,'Area','Centroid','Eccentricity','Solidity');
centroids = cat(1, props.Centroid);
areas=cat(1,props.Area);
solidity=cat(1,props.Solidity);
eccentricity=cat(1,props.Eccentricity);
imshow(etiquetascolor);hold on;
plot(centroids(:,1), centroids(:,2), 'r*');
hold off

regionprops('table',labels,'Area','Centroid','Eccentricity','Solidity')

areasutiles=[];
centroidssutiles1=[];
centroidssutiles2=[];
eccentricitysutiles=[];
solidityutiles=[];

for (i=1:size (areas))
    if (200<areas(i) && areas(i)<900)
        areasutiles(end+1)=areas(i);
        centroidssutiles1(end+1)=centroids(i,1);
        centroidssutiles2(end+1)=centroids(i,2);
        eccentricitysutiles(end+1)=eccentricity(i);
        solidityutiles(end+1)=solidity(i);
    end
end
centroidesutiles=[centroidssutiles1;centroidssutiles2];
```

```

%Cálculo de relación ratio N/C

[n,m]=size (centroidesutiles);
dist=zeros(1,m);
dismin=zeros(1,m);
cu=centroidesutiles
for (i=1:m)
    for (j=1:m)
        x=cu(1,j);
        x0=cu(1,i);
        y=cu(2,j);
        y0=cu(2,i);
        dist(j)=sqrt((x-x0)^2 + (y-y0)^2);
    end
    dist_ord=sort(dist);
    dismin(i)=dist_ord(2)
end
areascitoplasma=(pi*(dismin/2).^2)-areasutiles;
racionucleocitoplasma=areasutiles./areascitoplasma;

```