

Espectroscopia óptica de fluorescencia usando luz tipo LED en tejidos *ex-vivo* del cuello uterino

Optical fluorescence spectroscopy using LED-type light in *ex-vivo* cervical tissues

Nidia A. Cifuentes - Rodriguez^{§1}, Edinson R. Benavides – Cuestas¹, Sofia G. Chacon-Chamorro¹, Belarmino Segura – Giraldo¹

¹ Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Facultad de ciencias exactas y naturales, Grupo de investigación en Instrumentación Física, Manizales Caldas Colombia.

§ nacifuentesr@unal.edu.co, erbenavidesc@unal.edu.co, sgchacconc@unal.edu.co, bsegurag@unal.edu.co

Recibido: 10 octubre de 2022 **Aprobado:** 26 abril de 2023

Cómo citar: Cifuentes-Rodríguez, N.A, Benavides-Cuestas, E.R, Chacón-Chamorro, S.G, Segura-Giraldo. B. Espectroscopia óptica de fluorescencia usando luz tipo LED en tejidos *ex-vivo* del cuello uterino. *Ingéneria y Competitividad* 2023; 25(2): e-20912532. doi: <https://doi.org/10.25100/iyc.v25i2.12532>

Resumen

Realizar estudios de tejidos biológicos como el del cérvix con técnicas alternativas permite dirigirse a un soporte al diagnóstico médico del cáncer de cuello uterino (CCU), el cuarto más común a nivel mundial y la primera causa de muerte en mujeres de 30-59 años en Colombia. En el tejido del cuello uterino se encuentran presentes diferentes fluoróforos como: NADH, flavina, elastina y colágeno; moléculas que generan fluorescencia gracias a su capacidad para absorber energía electromagnética, lo cual les permite emitir fotones de menor energía a una longitud de onda determinada. En las etapas iniciales de la displasia, las células cambian sus velocidades metabólicas, características físicas y estructurales; con esto se altera la respuesta espectral de las moléculas presentes en el tejido cervical. En la investigación se realizó el análisis de los espectros de fluorescencia utilizando luz LED ultravioleta en el rango de 335 a 340 nm como fuente de radiación electromagnética y se verificó que al interactuar en el tejido biológico de las biopsias del cuello uterino, proporcionadas por el instituto caldense de patología de la ciudad de Manizales-Colombia, se generan espectros con respuestas activas en los rangos de las longitudes de onda de los fluoróforos evidenciando la interacción y excitación de los mismos. Dichos espectros son similares a los obtenidos con la espectroscopia óptica de fluorescencia tradicional aplicada con fuente de luz láser. Lo anterior permite concluir que el uso de tecnología LED de menor costo que los láseres convencionales es viable como fuente



Este trabajo está licenciado bajo una licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-CompartirIgual4.0

de luz para obtener los espectros del tejido del cuello uterino, continuar con el procesamiento y generar una clasificación según su patología.

Palabras clave: Diodo emisor de luz (LED), Espectroscopía óptica de fluorescencia (EOF), Ultravioleta, Cáncer de cuello uterino, Fluoróforos.

Abstract

Doing studies of biological tissues as the one of cervix with alternative techniques allows to direct to a medical diagnosis support of cervix cancer, the fourth more common in the world and the first cause of death in women between 30 and 59 years old in Colombia. In the cervix tissue there are found different fluorophores such as: NADH, flavine, elastin and collagen; molecules that generates fluorescence thanks to the capacity of absorb electromagnetic energy, this allows the emission of photons of less energy at a certain wavelength. In the initial steps of the dysplasia, the cells change their metabolic velocities, physical and structural characteristics; with that the spectral response of the molecules present in the cervical tissue is altered. In the research, an analysis of the fluorescence spectrum was made by using LED ultraviolet light in the range between 335 and 340 nm as source of electromagnetic radiation and was verified when interacting with the biological tissue of the cervix biopsies given by the Caldas Pathology Institute of the city of Manizales-Colombia, spectra with active responses are generated in the wavelength ranges of the fluorophores emission, showing the interaction and excitation of the same. Those spectra are similar to the ones obtained with the traditional optical fluorescence spectroscopy applied with a laser light source. The previous fact lets conclude that using LED technology of lower cost than the lasers used usually is viable as a light source for obtaining spectra of cervical tissue, continuing with the processing, and generating a classification based on its pathology.

Keywords: Light-emitting diode (LED), Optic fluorescence spectroscopy (OFS), Ultraviolet, Cervical cancer, Fluorophores.

1. Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) es el cuarto cáncer más común en mujeres a nivel mundial. En Colombia, es la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres de 30 a 59 años. Su principal agente causal es el virus del papiloma humano (VPH). Según el Ministerio de Salud colombiano, la alta mortalidad por cáncer de cuello uterino está asociada a condiciones socioeconómicas bajas, así como a la ubicación geográfica; encontrándose en mayor riesgo las poblaciones que se encuentran en zonas rurales, con acceso

limitado a los servicios de salud y con menor nivel educativo (1).

Pruebas de tamizaje preventivas como la citología permitirían disminuir la cantidad de muertes por cáncer de cuello uterino, debido a que la mayoría de los casos se presentan en estados avanzados y solo el 18% de los casos notificados con inicio de tratamiento oportuno registran una oportunidad alta de cura (2). Esto indica que un diagnóstico temprano y un inicio de tratamiento a tiempo

brindaría mayores posibilidades de recuperación de la paciente.

El contexto anterior expone la importancia de implementar nuevas técnicas de tamización que apoyen el diagnóstico médico de esta patología en etapas tempranas (precánceres) para reducir la tasa de mortalidad de las mujeres.

La espectroscopía óptica de fluorescencia (EOF) es un método no invasivo que genera una respuesta espectral de fluorescencia de una muestra mediante el uso de un haz de luz, que caracteriza los tejidos biológicos del cuello uterino gracias a los fluoróforos presentes en él. Para el funcionamiento óptimo de la técnica EOF, todos sus componentes deben funcionar de manera adecuada, iniciando con la fuente de luz que es la encargada de generar una excitación en el tejido estudiado. La emisión de la luz se puede producir en diferentes longitudes de onda, dependiendo del objetivo de cada estudio. En tejidos como el cuello uterino se usa la radiación en un rango de longitudes de onda entre 280 nm y 520 nm. En este tejido se encuentran presentes moléculas como el triptófano, FAD, colágeno, elastina, NADH, entre otras, que generan fluorescencia y contribuyen a la emisión del espectro cuando son excitadas. Por lo general la iluminación se realiza por medio de una fibra óptica que conduce la luz proveniente de la fuente hasta el tejido. A su vez, esta fibra va conectada al espectrómetro encargado de recolectar la información espectral proveniente del tejido para su posterior procesamiento (3).

Diferentes estudios abordan la EOF como una técnica para detección de patologías y explican el fenómeno físico y las propiedades de los tejidos biológicos, los cuales, a partir de sus cambios morfológicos y bioquímicos presentes en las etapas iniciales de la displasia, cambian el espectro de fluorescencia y así permiten ser una herramienta de diagnóstico clínico, dando relevancia a los precánceres y cánceres, *in vivo*

(4). En la EOF se evidencia el uso de diferentes tipos de fuentes de luz monocromáticas en diferentes rangos del espectro electromagnético para generar excitación en los tejidos, como es el caso del láser de gas nitrógeno con una longitud de onda de 337.1 nm utilizado en investigaciones para la excitación de tejidos del cuello uterino y mama (5,6). También se ha utilizado el láser de Neodimio para estudiar células de sangre de rata (7) y en los textos académicos para la implementación de la EOF se presentan como fuentes de luz los láseres de argón, neón de helio y iones de criptón; como también, lámparas policromáticas de arco de mercurio y xenón (8, 9). Se realizó la caracterización de una fuente de luz LED con aplicación en la terapia fotodinámica del cáncer de cérvix, la fuente de luz LED utilizada emite en una longitud de onda de 633 y 405 nm, empleada por medio de un adaptador óptico diseñado y construido con el fin de concentrar la luz emitida por el LED. Los resultados obtenidos con esta fuente logran un aumento en la posibilidad de localizar el tratamiento de acuerdo a los requerimientos de neoplasias específicas, teniendo un impacto clínico en el hecho de iluminar zonas puntuales mediante la fibra óptica, aprovechando las cavidades naturales del cuerpo humano como lo es el cuello uterino, otro factor es el socio-económico debido a que la tecnología utilizada es más económica y podría llegar a las pacientes de servicios asistenciales públicos beneficiando a una gran parte de la población (10).

En la implementación de la técnica EOF con dispositivos de emisión de luz LED se observaron márgenes de mejoras con respecto a los precios actuales ofrecidos en el mercado por otras fuentes emisoras de luz, se evidenció el potencial de la luz LED para continuar siendo utilizada en instrumentación para laboratorios ópticos (11). Se prueba que la EOF ha sido ampliamente explorada para aplicaciones como el crecimiento neoplásico temprano en tejidos, si esta técnica no

invasiva se puede aplicar con éxito, puede aumentar el potencial de tamizaje para que las personas puedan acceder a un diagnóstico y tratamiento oportuno y así reducir tasas de mortalidad (12).

Se observa la importancia de analizar la técnica EOF utilizando radiación electromagnética de

tipo LED con una longitud de onda determinada generando la excitación necesaria para que los fluoróforos puedan interaccionar y dar origen a los espectros de emisión característicos para su posterior análisis.

2. Metodología

Equipos e implementos necesarios para ejecutar la técnica espectroscopia óptica de fluorescencia:

- Fuente de luz LED en el rango de 335 a 345 nm perteneciente al espectro ultravioleta con lente colimador.
- Fibra óptica bifurcada.
- Espectrómetro Ocean Optics HR4000 High Resolution.
- Computador con el software Ocean View encargado de la adquisición de las señales espectrales.

Conexiones de los elementos de medida para la técnica Espectroscopia óptica de Fluorescencia: La fibra óptica se compone de dos extremos, y uno de ellos se divide en dos partes. El primero se conectará con el espectrómetro y el segundo se conectará a la fuente de luz LED mediante un lente colimador. El otro extremo de la fibra óptica es un conducto flexible que iluminará las biopsias de tejido de cuello uterino. Posteriormente, se realiza la conexión del espectrómetro con el computador a través de un cable USB. En el computador se realiza la respectiva configuración en el software OceanView para la toma de los espectros del tejido.

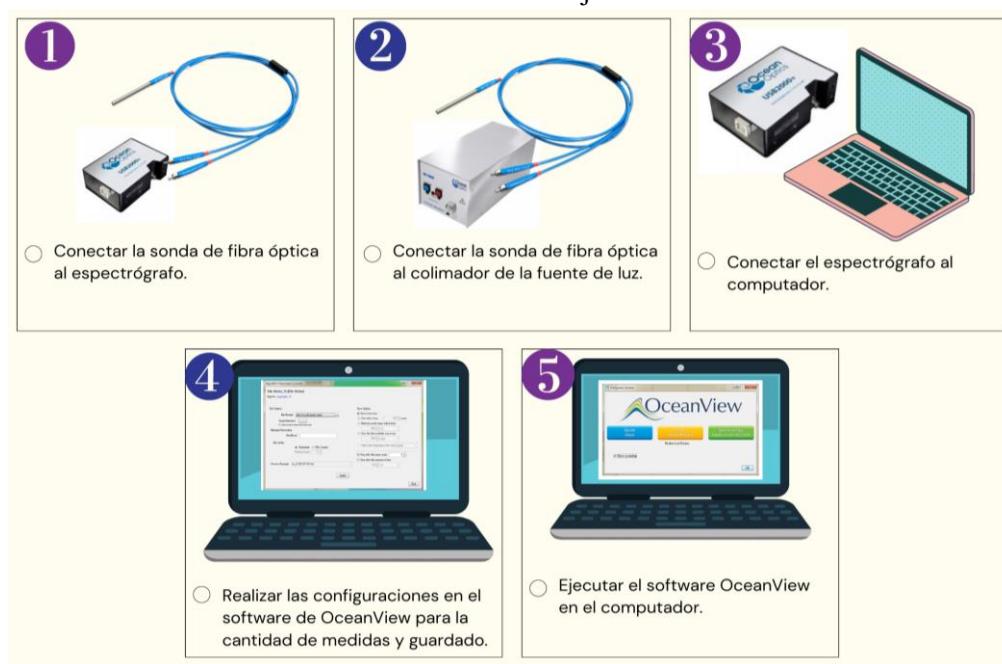
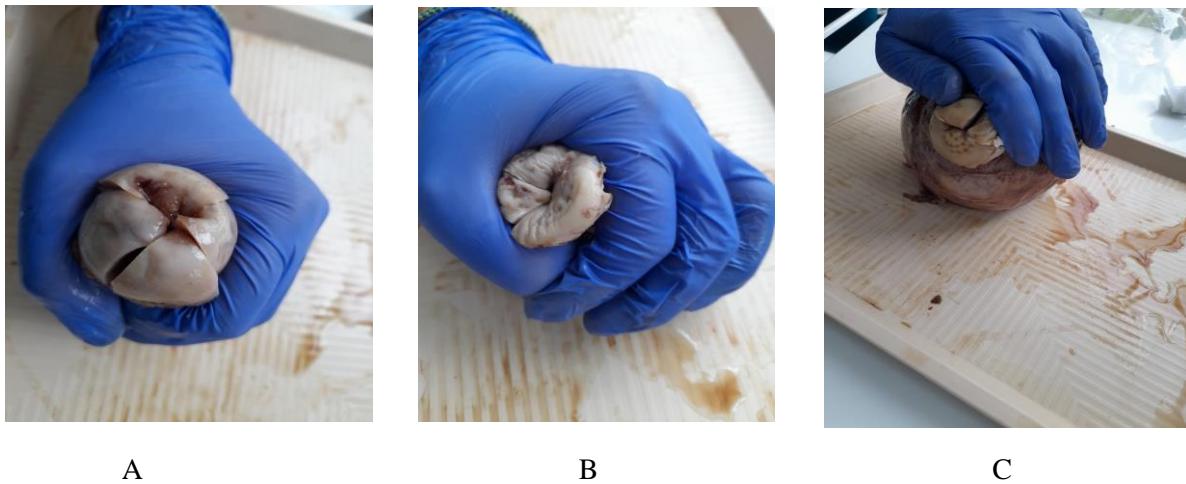


Figura. 1. Esquema para la implementación de la técnica EOF.

Recursos biológicos: Fueron proporcionadas biopsias de útero y cuello uterino por el Instituto Caldense de Patología (ICP) de la ciudad de

Manizales-Colombia, de las cuales se pudo recuperar de manera completa 22 cuellos uterinos con o sin patologías visibles.



A

B

C

Figura 2. Fotografías de los cuellos uterinos para posteriores medidas de EOF. A) cuello uterino totalmente liso y sin anomalías, B) cuello uterino con anomalías de tamaño pequeño y C) cuello uterino con anomalía grande en el extremo inferior.

Posición para medición de biopsias de cuellos uterinos: Se realizan mediciones en cada uno de los cuellos uterinos en 5 puntos de análisis, como se muestra en la Figura 3. Cuatro puntos se toman después de la unión escamosa cilíndrica posterior al orificio cervical externo, donde hay mayor

presencia de células escamosas y se presentan la mayoría de cánceres. Se siguen las manecillas del reloj y se procura mantener el mismo radio de medida. Cabe aclarar que no se toman medidas en las zonas con cortes y el quinto punto es aleatorio o donde el tejido presente anomalías visibles.

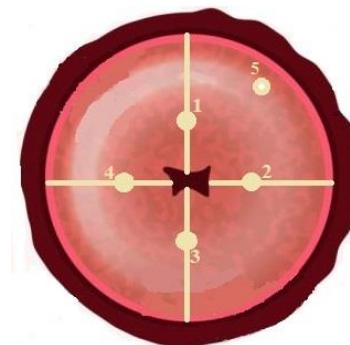


Figura 3. Diagrama para identificar lugar del tejido del cuello uterino donde se realizaron las medidas.

Adquisición de señales espectrales de fluorescencia: Se activa la fuente de luz LED y se realiza una leve presión con uno de los extremos de la sonda de fibra óptica sobre la zona del tejido a medir. Desde el computador, se activa el proceso de guardado de la información

espectral de fluorescencia. La configuración del software para almacenar la información consta de realizar 30 registros espectrales por cada punto de análisis sobre el tejido cervical, los cuales se promedian para obtener un solo espectro por punto medido y luego realizar el procesamiento.



Figura 4. Montaje técnico EOF con fuente de luz tipo LED y espectrómetro Ocean Optics

HR4000.

Procesamiento de las señales espectrales obtenidas: para el procesamiento se desarrollaron e implementaron algoritmos en lenguaje de programación Python. A todas las señales obtenidas se les realizó un filtrado digital aplicando un filtro Savitzky-Golay y un ajuste gaussiano. Este ajuste se integra a partir de las

ecuaciones presentadas en la sección 7, titulada: simulación del espectro de fluorescencia y de células biológicas (6), donde la intensidad total del espectro está en función de diferentes parámetros como se refleja en la siguiente ecuación:

$$I_{tm} = \sum_{k=1}^4 I_k c_k 10^{-A_\lambda} 10^{-A_x} e^{-2(\frac{\lambda - \lambda_k}{W_k})^2} CF_{kx} - I_{tr} \quad (1)$$

Donde CF_{kx} son los factores de contribución como una función de longitud de onda en función de la longitud de onda de excitación presentados en la ecuación 2.

$$CF_{kx} = I_{kx} e^{-2(\frac{\lambda - \lambda_{kx}}{W_{kx}})^2} \quad (2)$$

k depende de cada uno de los fluoróforos ($k=1$: colágeno $k=2$: elastina, $k=3$: NADH y $k=4$: flavinas), λ_{kx} es la longitud de onda de excitación, I_{kx} es la

intensidad y W_{kx} es el ancho de la gaussiana a la mitad de la altura mayor de la curva. A_λ y A_x son la transmitancia de emisión y excitación respectivamente.

Finalmente c_k es la contribución de cada fluoróforo y λ_k es la longitud de onda media de los picos de emisión de cada uno de los fluoróforos presentes en la información espectral de fluorescencia

obtenida de los tejidos de cuello uterino *ex-vivo*. I_{tr} es una banda de dispersión Raman del agua y otra variable de ajuste dentro del sistema que se calcularán bajo un medio descrita por:

$$I_{tr} = c_{rr} I_{rr} 10^{-A\lambda} 10^{-A_x} e^{-2(\frac{\lambda-\lambda_{rr}}{W_{rr}})^2} \quad (3)$$

I_{rr} , λ_{rr} , W_{rr} y c_{rr} son la intensidad, la longitud de onda central, el ancho de la gaussiana a la mitad de la altura mayor de la curva y la contribución de la banda de dispersión respectivamente. Para obtención de las anteriores variables se aplicó al espectro de emisión de fluorescencia el método de mínimos cuadrados no lineales para ajustarlo a la Ec.1.

Resultados y discusión

Se utilizó la técnica de espectroscopia óptica de fluorescencia con una longitud de onda en el rango de 335 a 345 nm como fuente de luz electromagnética para excitar la muestra. Se aplicó a 22 tejidos de cuello uterino proporcionados por el ICP, se tomaron medidas en 5 puntos de cada una de las biopsias de cuellos uterinos, lo que resultó en un total de 110 puntos analizados. La Figura 5 muestra el espectro de emisión seleccionado al azar de una de las biopsias en estudio y en la Figura 6 muestra el espectro promedio de los 110 puntos de análisis. Preliminarmente, se observa una respuesta activa en el rango de 380 a 560 nm.

Se hizo una revisión bibliográfica para buscar espectros de emisión del tejido del cuello uterino con características similares de excitación, en el rango de 335 a 345 nm, con el fin de encontrar similitudes o diferencias con los obtenidos. Se analizan los espectros en el rango de 350 a 600 nm, donde se evidencia la formación de tres picos: la primera banda con su pico de emisión en los aproximadamente 350 nm, la segunda banda

en los aproximadamente 440 nm y es la de mayor ancho a la mitad de la altura. Finalmente, la última banda se encuentra alrededor de los 500 nm, coincidiendo con los espectros de la literatura (13,14,6).

Sin embargo, en la Figura 7 se evidencia un cuarto pico que pertenece a los 500 a 550 nm en los espectros con algún tipo de carcinoma. En dichas longitudes de onda el espectro obtenido con radicación LED sigue activo y es posible que dependa del estado en el que se encuentra la biopsia o esté circunscrita en la tercera banda. Se hace énfasis en que, el espectro obtenido guarda un alto grado de similitud con los de la literatura y reaccionan según lo esperado, además, dependiendo del punto de análisis cambia la intensidad de la respuesta debido a las propiedades inherentes del tejido cervical que varían según la etapa de la displasia en la que se encuentre presente o no en el tejido. Lo anterior permite aseverar que la fuente de Luz LED funcionó de manera adecuada para excitar los tejidos.

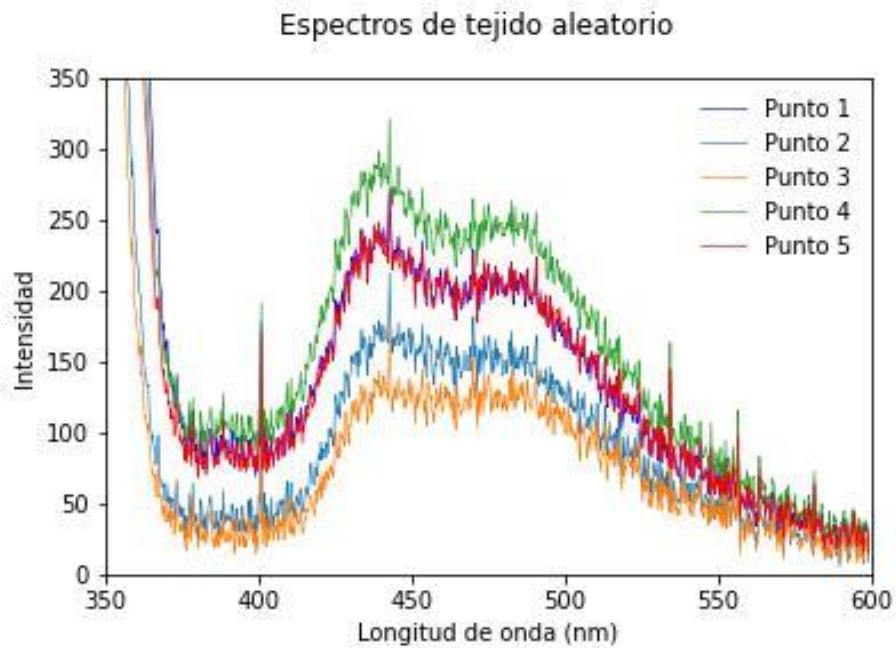


Figura. 5. Espectro de emisión del tejido de cuello uterino con fuente de excitación de 335-345 nm.

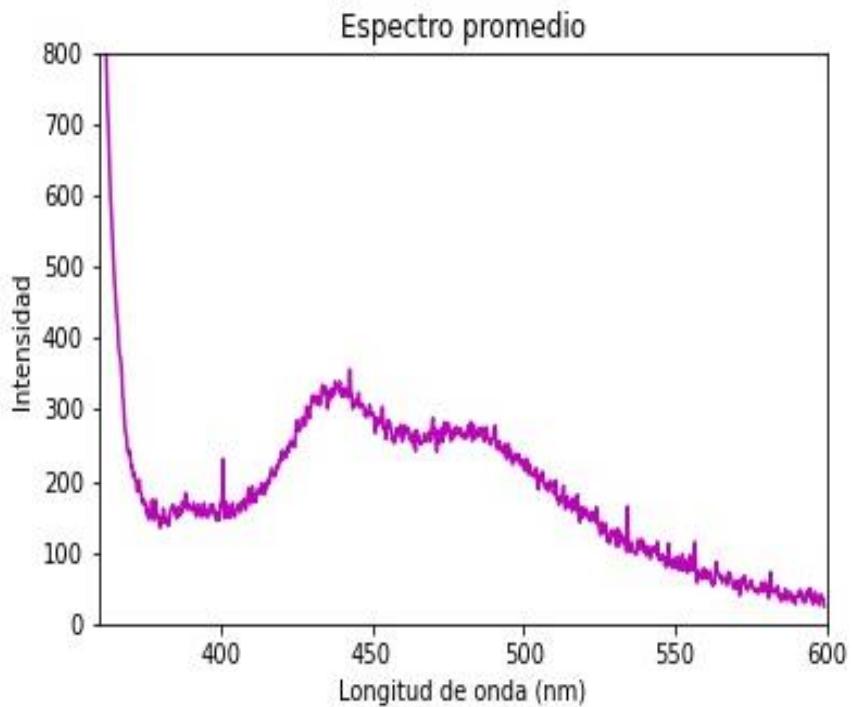


Figura 6. Espectro promedio de los 110 puntos de análisis.

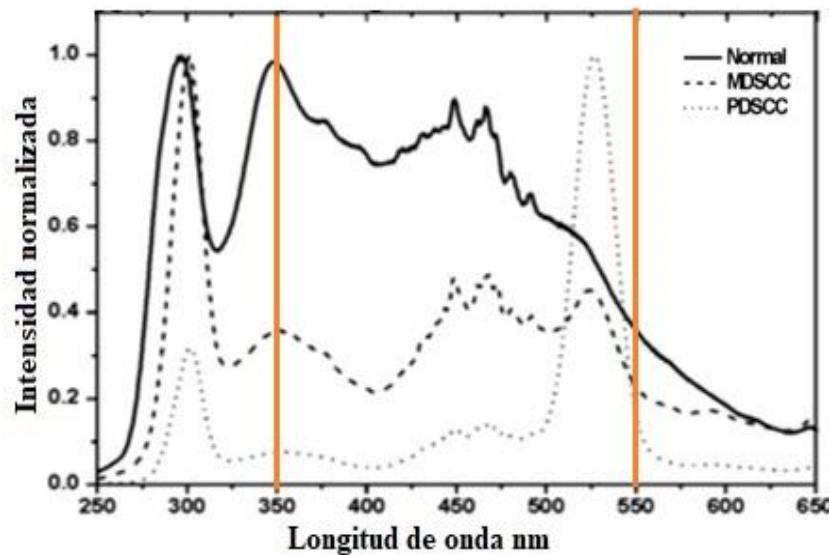


Figura. 7. Espectro de emisión de fluorescencia de tejido del cérvix, con 3 tipos de espectros Normal, carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (MDSCC) y carcinoma de células escamosas poco diferenciado (PDSCC), Tomada y adaptada de (14).

Posteriormente, siguiendo la metodología se hace un procesamiento de la señal a fin de seguir estudiando el comportamiento del espectro, se realizó el ajuste que permite calcular la contribución de cada fluoróforo y descomponer el espectro en gaussianas simulando los valores obtenidos del ajuste con la Ec. 2.

Se permite identificar más fácil el comportamiento de los fluoróforos presentes en el tejido del cuello uterino y comprobar que su ubicación pertenezca a los rangos de emisión encontrados en (4, 6, 15) y reportados en la tabla 1 donde se presenta la longitud de onda de absorción y de emisión de algunas moléculas presentes en el tejido del cuello uterino.

Tabla.1 Longitudes de onda de absorción y emisión de algunos fluoróforos presentes en el tejido de cuello uterino tomada de (4,6,15).

Molécula	Longitud de onda de absorción	Longitud de onda de emisión
Triptófano	280nm	350-356 nm
Colágeno	325 nm	390-400 nm
Elastina	320 nm	400-410 nm
NADH	365 nm	440-470 nm
Flavinas	440 nm	520-535 nm

A continuación, se presentan las gaussianas obtenidas relacionadas con la función de onda de la contribución de las moléculas que se encuentran en el tejido de cuello uterino y que debido a la longitud de onda utilizada en la técnica EOF realizan emisión, como son: el colágeno, la elastina, el NADH y flavinas. Se presenta a la izquierda los 110 puntos de análisis y a la derecha el promedio de estos.

La primera gaussiana es el ajuste que corresponde a información de dispersión y no se la debería considerar dentro de las respuestas de las moléculas del tejido, Figura 8. Las posteriores tres gaussianas mostradas en la Figura 9, 10 y 11 están dentro de su respectivo rango de emisión de los fluoróforos correspondiendo respectivamente al Colágeno, Elastina y NADH. Se esperaría encontrar una quinta gaussiana correspondiente a

las flavinas, pese a ello en el rango de 520-535 nm no se obtiene una respuesta clara, si bien la gaussiana 5 mostrada en la Figura 12 está asociada a las flavinas, el promedio de todos los puntos de análisis está corrido en el rango, pero se observan algunos puntos dentro de este. El comportamiento se asocia a la presencia o no de patologías, al tener una intensidad de emisión baja el ajuste no es capaz de reconocerla en el rango adecuado y la asocia a la gaussiana correspondiente al NADH o la contribución de las flavinas se deba a una banda de menor absorción, pero presente, entre los 350 a 400 nm, como se observa en la figura 2.3 de (6). Para hacer más detalle en lo anterior se examina un espectro que tenga una contribución de la flavina más clara y en su rango de longitud de onda de emisión, Figura 13.

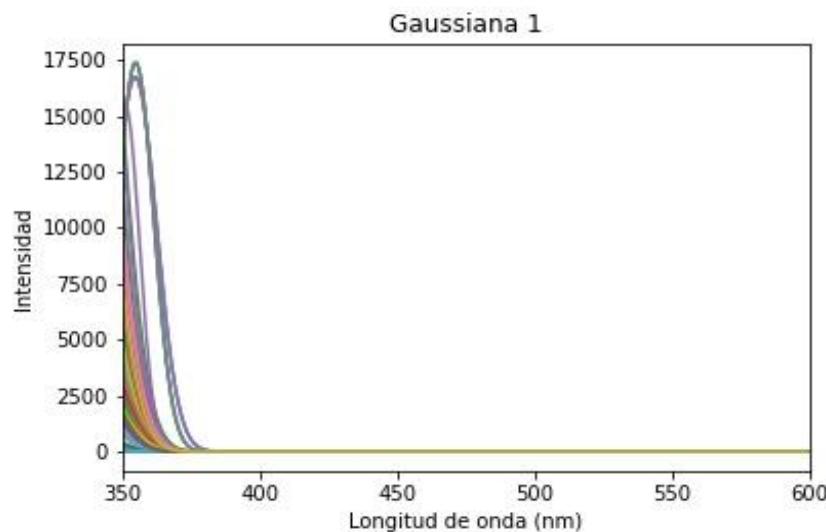


Figura 8. Gaussiana 1 contribución de la dispersión de la luz

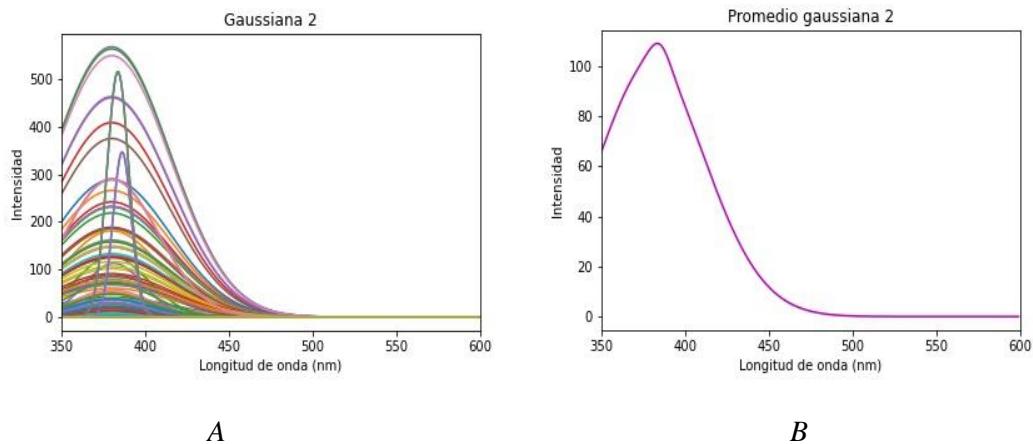


Figura. 9. Gaussiana 2 del espectro de emisión de fluorescencia, contribución del colágeno. B Promedio gaussiana 2.

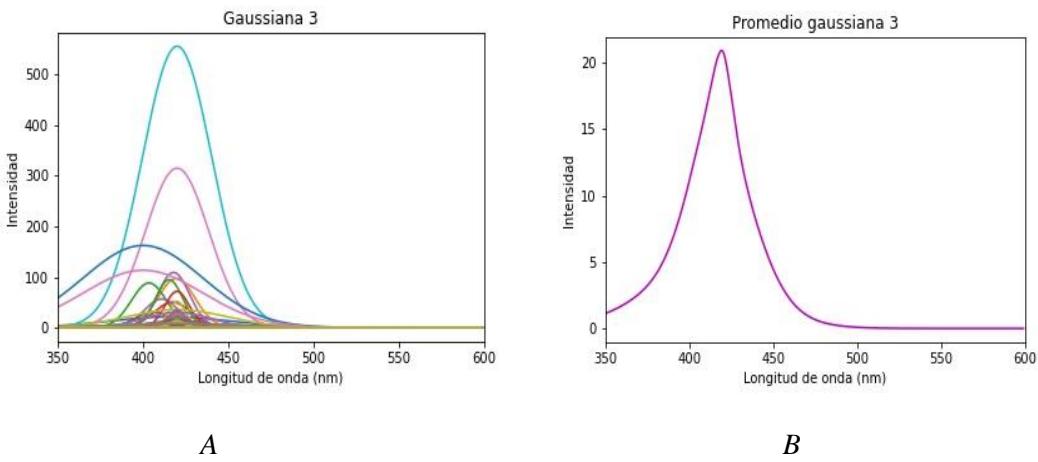


Figura. 10. A. Gaussiana 3 del espectro de fluorescencia contribución de la elastina B. Promedio gaussiana 3.

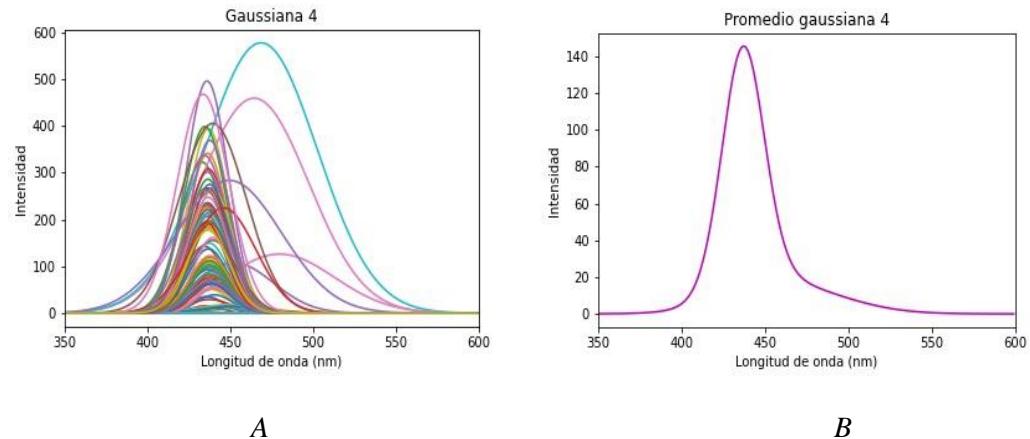


Fig. 11. A. Gaussiana 4 del espectro de fluorescencia, contribución del NADH. B. Promedio gaussiana 4.

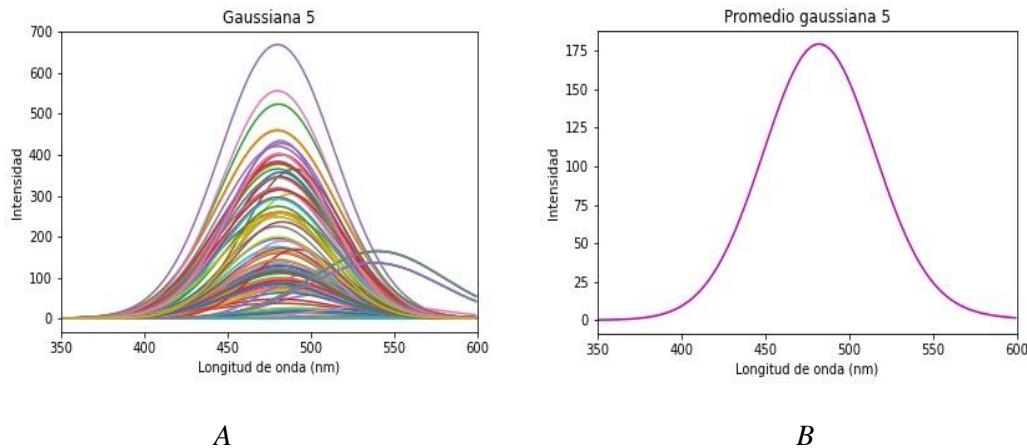


Fig. 12. A. Gaussiana 5 del espectro de fluorescencia, contribución de la flavina. B. Promedio Gaussiana 5

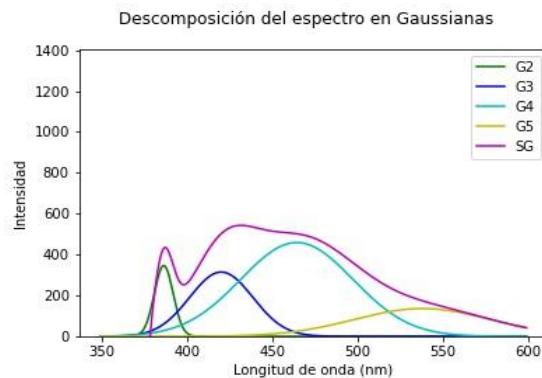


Figura 13. Punto de análisis con todas las gaussianas G2, G3, G4, G5 en el rango de longitud de onda de emisión correspondiente a los fluoróforos Colágeno, Elastina, NADH, Flavinas respectivamente.

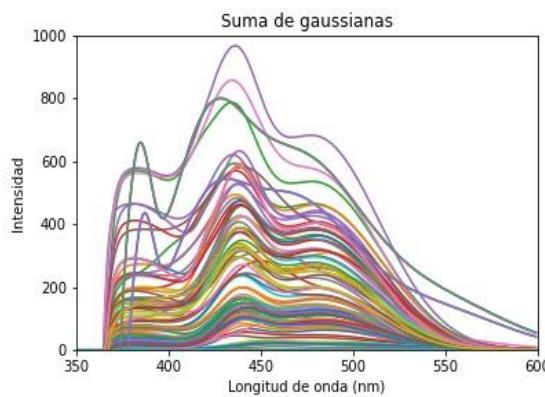


Fig. 14. Suma de las gaussianas S_G .

Finalmente, en la Figura 14 se muestra la suma de las gaussianas S_G que dan el espectro ajustado y filtrado y está relacionada con la Ec. 4

$$S_G = (G2 + G3 + G4 + G5 - G1) \quad (4)$$

3. Conclusiones

Los espectros generados por la EOF aplicada en tejido de cuello uterino con luz tipo LED son similares a los obtenidos con la espectroscopía óptica de fluorescencia tradicional aplicada con fuentes de luz láser, generando viabilidad para continuar con el procesamiento de los espectros del tejido del cuello uterino con una fuente de excitación de este tipo y generar posteriormente una clasificación según su patología, además, de reducir costos en la aplicación de la técnica, debido a la diferencia de precio que manejan las fuentes láseres con las LED.

Después de realizar el análisis de los espectros, tanto filtrado como ajuste, se ha determinado la contribución de cada fluoróforo y se ha observado que su respuesta se encuentra dentro del rango de longitud de onda de emisión que se espera para el caso del Colágeno, Elastina y NADH. Sin embargo, en el caso de las flavinas, no se ha

esta gráfica junto con las anteriores se utilizará para posteriores procesamientos, para clasificar un punto de análisis en patológico o no patológico.

logrado obtener una contribución en su rango esperado (espectro corrido). Esto se podría deber a que las flavinas tienen su mayor pico de absorción se encuentra entre los 440 a 500nm, pero conservan una menor absorción entre 335 y 345 nm. Por lo anterior, la contribución puede ser menor, no nula y correr la banda del espectro. Para mejorar la excitación del tejido y obtener mejores respuestas espectrales se podría considerar añadir un segundo LED en el rango de mayor excitación de las flavinas.

La EOF aplicada con tecnología LED a tejido de cuello uterino cuenta con potencial aplicación como soporte al diagnóstico médico del cáncer de cuello uterino, debido a que el análisis de los espectros indicó la excitación de los fluoróforos presentes en el tejido cervical y estos cambian su contribución a medida que se cambia la posición de medida en el tejido que puede estar ligado a la presencia o no de la displasia y al estado de esta.

4. Agradecimientos

El presente artículo fue desarrollado bajo la financiación del proyecto investigativo “Metodología para el soporte al diagnóstico médico *in-vivo* de cánceres de cuello uterino y mama en estadios tempranos usando la técnica de espectroscopía de impedancia bioeléctrica complementada por las técnicas de

espectroscopía óptica de fluorescencia y termografía infrarroja” de la convocatoria 874 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación-MINCIENCIAS. Gracias a la Universidad Nacional de Colombia- Sede Manizales y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

5. Referencias bibliográficas

1. Ministerio de salud y protección social colombiano. Cáncer de cuello uterino [Internet]. Ministerio de salud y protección social. [citado el 14 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx>
2. Instituto nacional de salud (CO). 2018 jun [citado el 14 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%ADa%20g%C3%ADco%20semana%2023.pdf>
3. Ebenezar J, Ganesan S, Aruna P, Muralinaidu R, Renganathan K, Saraswathy TR. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy for the diagnosis of oral neoplasia in vivo. *Journal of Biomedical Optics* [Internet]. 2012 Sep 21;17(9):0970071. Disponible en: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.9.097007>
4. Ramanujam N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. En: Encyclopedia of Analytical Chemistry [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470027318.a0102>
5. Pradhan A, Pandey PK, Singh P. Overview of fluorescence spectroscopy and imaging for early cancer detection. En: Alfano RR, Shi L, editores. *Neurophotonics and Biomedical Spectroscopy*. Elsevier; 2019. p. 253–328
6. Giraldo BS. Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino. [sede manizales]: universidad nacional de colombia; 2009.
7. Tiburcio Moreno J, Hernández F. Estudio del proceso de foto degradación de β -caroteno en una solución de tetrahidrofurano (thf) usando espectroscopía de absorción óptica y fluorescencia. *cyd* [Internet]. 30 de abril de 2019 [citado 14 de octubre de 2022];(20):12-5. Disponible en: <https://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/cyd/article/view/502>
8. Lakowicz JR. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. En: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 27–61.
9. Sikorska E, Khmelinskii I, Sikorski M. Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation. En: Zhong J, Wang X, editores. *Evaluation Technologies for Food Quality*. Elsevier; 2019. p. 491–533. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00019-6>
10. Etcheverry ME, Pasquale MÁ, Garavaglia MJ. Caracterización del acoplamiento de una fuente de luz LED a una fibra óptica con aplicación en la terapia fotodinámica (TFD) del cáncer cérvix. En: III Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería [Internet]. 2015 [citado el 14 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/47957>

11. Álvarez AC, Corrés Sanz JM. Diseño y fabricación de fuente de luz blanca LED acoplada a fibra [Internet]. [PAMPLONA]: UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA; 2001 [citado el 15 de octubre de 2022]. Disponible en: https://academicae.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/19114/TFG_Cilveti_Alvarez_Ander.pdf?sequence=1&isAllowed=y
12. Organización mundial de la salud. Cáncer cervicouterino [Internet]. Organización mundial de la salud. 2022 [citado el 14 de octubre de 2022]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
13. Pradhan A, Pandey PK, Singh P. Overview of fluorescence spectroscopy and imaging for early cancer detection. En: *Neurophotonics and Biomedical Spectroscopy*. Elsevier; 2019. p. 253–328 Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/neurophotonics-and-biomedical-spectroscopy/alfano/978-0-323-48067-3>.
14. Ebenezar J, Aruna P, Ganesan S. Synchronous fluorescence spectroscopy for the detection and characterization of cervical cancers in vitro. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2010;86(1):77–86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00628.x>
15. Alfano RR, Yang Y. Stokes shift emission spectroscopy of human tissue and key biomolecules. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* [Internet]. 2003;9(2):148–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1109/JSTQE.2003.811285>