



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias

Posgrado en Ciencias Aplicadas

**Métodos Ópticos No-Invasivos para Monitoreo de Enfermedades
Dermatológicas.**

Tesis que presenta:

M.S.Eng. Fernando Sebastián Chiwo González.

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Aplicadas opción Nanociencias, Nanotecnología y Energías
Alternativas (NNEA).**

Bajo la dirección de:

Dr. Francisco Javier González Contreras.

San Luis Potosí, San Luis Potosí, México, a 11 de marzo de 2022





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
 Universidad Autónoma de San Luis Potosí
 Av Karakorum No. 1470 C.P 78295, Col. Lomas 3ª Seccion
 San Luis Potosí, S.L.P México
 Teléfono 01(444) 825.08.92
 www.fc.uaslp.mx

San Luis Potosí, S.L.P a 01 de marzo del 2022.

Dr Raúl Eduardo Balderas Navarro
 Coordinador del Posgrado en Ciencias Aplicadas
 Presente

ASUNTO: Examen Doctoral
Fernando Sebastian Chiwo González

Por la presente le solicito sus amables gestiones para efectuar todos los trámites conducentes para que se programe el examen de grado de Doctorado en Ciencias Aplicadas, en la opción en **NNEA**, de la estudiante **Fernando Sebastian Chiwo González** de la tesis denominada. **“Métodos Ópticos No Invasivos para Enfermedades Dermatológicas”** Quien solicita se programe tal examen para el día 11 de marzo del 2022 a las 19:00 Hrs, en la Sala de usos Múltiples de la CIACYT

Atentamente:

Asesor: Dr Francisco Javier González Contreras

Sinodal: Dr Gabriel González Contreras

Sinodal: Dr Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez

Sinodal: Dr Miguel Ghebré Ramírez Elías

Sinodal Externo: Dr Jorge Luis Flores Núñez



POSGRADO EN
 CIENCIAS
 APLICADAS

www.uaslp.mx

Av. Chapultepec No. 1570
 Privadas del Pedregal CP 78295
 San Luis Potosí, S.L.P, México
 Tel. 8 26 23 00 Ext. 5644

"So where do we go?...Where do we go from here?...I'm just dreaming in Big Colors now..."

Ryan Adams, Big Colors 2021

Dedicatoria

A mis padres, Fernando Chiwo Niño y Marilu González González, como muestra de mi agradecimiento infinito por la vida otorgada, por las oportunidades brindadas y sobre todo, por el amor incondicional recibido día a día. Este y todos mis logros, van por ustedes, los amo papas.

A mi hermano, Dr. Daniel Alejandro Chiwo González, como muestra de un aprendizaje, dedicación y un esfuerzo constante. Tu camino, aunque diferente al mio, sigue todas las bases y principios de nuestros padres y abuelos. Por tu comprensión y apoyo, muchas gracias hermano, estoy muy orgulloso de ti y estoy seguro de que llegarás mucho más lejos que yo.

A mis tíos, primos y sobrinos de las familias Chiwo Niño y González González, por todo lo recibido, por todos los consejos y sobre todo, por hacerme parte de su familia.

A mis amigos Raúl Ornelas, Armando Cervantes, Hector Chavez, Luis Gabriel Gutierrez, Victor Rangel, Luis Roriguez, Issac Trejo, Christopher Cornu, Eduardo Cervantes, Efraín Cervantes, Juan Carlos Zapata, Julio Cesar López, Raúl Facundo, Ricardo Gaitan, Jorge Alfaro, Ivan Colorado, Edmundo Torres y Agustín Salazar. Por todas esas risas, locuras y aventuras, muchas gracias amigos.

A mi pequeña traviesa, a mi niña preciosa, a mi compañera inseparable y mejor amiga, a mi novia Alethia Rivera. Muchas gracias por la paciencia, por el apoyo, por las risas, por las lagrimas, por estar siempre ahí, por hacerme entrar en razón y sobre todo, por haber llegado a mi vida. Te amo tanto, tanto, tanto, mi niña hermosa.

A los que ya no están, allá en donde quiera que se encuentren, muchas gracias por todo. Jamás los defraudaré, se los prometo.

Finalmente, y no menos importante...A ese joven impulsivo, a ese joven agresivo, a ese joven roto, a ese joven confundido, a ese joven desesperado, a ese joven humillado, a ese joven deprimido, a ese joven en desgracia, a ese joven arrepentido de sus errores, a ese joven que jamás perdió la esperanza...lo lograste muchacho!!! Por favor, te lo suplico, jamás vuelvas a dudar de ti...eres ahora un hombre completo, por favor se siempre de bien para el mundo...a ti Dr. Fernando Sebastián Chiwo González.

FSC

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Javier González Contreras por todo el apoyo profesional y personal otorgado a lo largo de estos estudios de maestría y doctorado. Formar parte de su equipo dentro del Laboratorio Nacional de Ciencia y Tecnología en Terahertz (LANCYTT) ha sido la experiencia mas enriquecedora para mi en todos los aspectos, ayudándome a ser mas disciplinado y determinado con mi vida. En especial quisiera agradecerle infinitamente por la paciencia que me tuvo cuando, en innumerables ocasiones, perdí el rumbo de mi camino. Por ser mi asesor, maestro, mentor y amigo, muchas gracias Dr. Javier.

A mis amigos y compañeros del LANCYTT, Dr. Javier Méndez Lozoya, Dr. Bhrayllan Mora Ventura, Dr. Juan Carlos Torres, Dra. Karen Hernández Vidáles, Dra. Alejandra Loyola Leyva, M.C. Isaac Lugo Pérez, M.C. Juan Roberto Moreno Garcia, M.C. Jose Antonio Cuevas Lara, M.C Rodrigo Cabrera Alonso, M.C. Gustaavo Torres, Lic. Maria Leticia Rico y Dr. Edgar Guevara Codina. A todo el personal del que fue mi segundo hogar por muchos años, el edificio de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT).

Agradecimientos especiales a mis sinodales, Dr. Miguel Ghebré Ramírez Elías, Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vazquez, Dr. Gabriel González Contreras y Dr. Jose Luis Flores Nuñez por sus comentarios, sugerencias y sobre todo, las correcciones realizadas a esta tesis. Sin su valioso apoyo, este proyecto no se hubiera podido concretar, muchas gracias a todos.

De forma especial, quisiera agradecerle al Dr. Walter C.P.M. Blondel y a todo su equipo de investigación en el Departamento de Biología, Señales y Sistemas (BioSiS) dentro del Centro de Investigación en Automatización de Nancy (CRAN) por brindarme una oportunidad única en la vida, para realizar una estancia académica en la Universidad de Lorraine (UL), Nancy, Francia durante el otoño del 2019.

Al personal académico y administrativo de las instituciones Universidad Marista Campus San Luis Potosí (UMA-SLP), Universidad de Tecnologías Avanzadas Campus San Luis Potosí (UNIAT-SLP), Universidad del Valle de México Campus San Luis Potosí (UVM-SLP) Universidad Cuauthémoc Campus San Luis Potosí (UC-SLP) por creer en mi y brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 559382 otorgada para realizar estudios de doctorado y por la beca mixta otorgada para realizar la estancia académica en la Universidad de Lorraine, y finalmente al Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología (COPOCYT) por los apoyos especiales otorgados para la participación en congresos internacionales así como el apoyo para la estancia académica.

Índice general

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	XI
1 Introducción	1
1.1 Métodos Ópticos para el Diagnóstico Médico	1
1.1.1 Espectroscopía Raman	4
1.1.2 Espectroscopía de Reflectancia Difusa	7
1.1.3 Imagenología por Termografía Infrarroja Digital	9
1.2 Métodos Ópticos para Tratamiento	11
1.2.1 Tratamiento Láser	13
1.2.2 Terapia Fotodinámica	14
1.3 Aplicaciones de la Óptica en la Dermatología	14
2 Dermatosis Mas Comunes - Diagnóstico y Tratamiento	19
2.1 Dermatosis Mas Comunes	19
2.2 Transtornos de la Pigmentación	23
2.3 Acné	27
2.4 Rosácea	30
2.5 Otros	31

3	Espectroscopía Raman de la Piel	32
3.1	Anatomía y Fisiología de la Piel	32
3.2	Espectroscopía Raman de la Piel	33
3.3	Colágeno Tipo-I	37
3.4	Colágeno Tipo-III	37
3.5	Colágeno Tipo-IV	38
3.6	Colágeno Tipo-V	38
3.7	Conclusiones	39
4	Diagnóstico y Monitoreo Óptico de Cicatrices de Acné bajo Cirugía Láser Fraccional Ablativa CO_2	40
4.1	Cicatrices de Acné	40
4.2	Tratamientos para las Cicatrices de Acné	41
4.3	Regeneración de la Piel	45
4.4	Monitoreo de los Incrementos de Temperatura Inducidos por la Cirugía Láser Fraccional Ablativa utilizando Imagenología por Termografía Infrarroja Digital	47
4.5	Valoración de la Piel Regenerada por medio de Espectroscopía Raman In Vivo	54
4.6	Clasificación y Discriminación de Cicatrices de Acné utilizando Mediciones de Espectroscopía de Reflectancia Difusa In Vivo	76
4.7	Evaluación de la Pigmentación y del Eritema Inducido por medio de Espectroscopía de Reflectancia Difusa In Vivo	85
4.8	Conclusiones	91
5	Métodos Ópticos en Pacientes con Rosácea	93
5.1	Tratamientos para el Manejo de Rosácea	93
5.2	Patrón Térmico de Individuos Sanos	96
5.3	Patrón Térmico de Pacientes con Rosácea	96

5.4	Método de Clasificación No-Invasivo para Pacientes con Rosácea basado en el Patrón Térmico Facial	98
5.5	Método de Diagnóstico No-Invasivo para Pacientes con Rosácea utilizando Espectroscopía Raman	101
5.6	Conclusiones	106
6	Discusión	108
7	Conclusiones y Trabajo a Futuro	110
8	Productividad Académica	112
8.1	Artículos Indexados	112
8.2	Participación en Concursos	113
8.3	Presentación en Congresos Nacionales e Internacionales	113
8.4	Artículos de Divulgación	114
	Bibliografía	115

Índice de figuras

1.1	Ventana Terapéutica	2
1.2	Diagrama de Niveles de Energía	5
1.3	Espectro Raman	6
1.4	Espectro Raman	7
1.5	Aproximación Kubelka-Munk	8
1.6	Espectro DRS del SiO ₂	9
1.7	Imagen Infrarroja de la Transferencia de Calor de Cuerpo Humano a la Superficie de la Muestra	11
1.8	Medicina Láser	12
1.9	Mecanismo de la Terapia Fotodinámica	14
1.10	Propagación de la Luz en un Medio Turbio	15
1.11	Instrumentación Requerida para la Espectroscopía Raman	16
1.12	Instrumentación Requerida para la Espectroscopía de Reflectancia Difusa (DRS)	17
1.13	Instrumentación Requerida para la Imagenología por Termografía Infrarroja Digital (DITI)	18
2.1	Reporte de la GBD de Enfermedades de la Piel	20
2.2	Representación Gráfica del Reporte de la GBD de Enfermedades de la Piel	21
2.3	Incidencia de Enfermedades de la Piel	22

2.4	Incidencia de Enfermedades de la Piel	23
2.5	Diagnóstico de Desordenes de la Pigmentación	24
2.6	Lesión con Hiperpigmentación	25
2.7	Lesión con Hipopigmentación	26
2.8	Presencia del Acné	27
2.9	Folículos Capilares y Glándulas Sebáceas	28
2.10	Representación de los Microcomedones	29
2.11	Tipos de Rosácea	30
3.1	Anatomía de la Piel	33
3.2	Procesado de un Espectro Raman	35
3.3	Espectro Raman de la Piel	37
3.4	Espectro Raman de la Piel y de los Colágenos	39
4.1	Típos de Cicatrices de Acné	41
4.2	Tipos de Cirugía Láser.	43
4.3	Regeneración de la Piel.	46
4.4	Sistema Láser Lutronic eCO_2	48
4.5	Paciente con Cicatrices de Acné Antes y Después de la Cirugía Láser Fraccional Ablativa (AFLS)	49
4.6	Cámara Infrarroja FLIR T600	49
4.7	Termogramas Adquiridos Antes de la AFLS (Medición PS)	50
4.8	Termogramas Adquiridos Durante la AFLS (Medición S)	51
4.9	Termogramas Adquiridos Durante el Primer Seguimiento a la AFLS (Medición FU)	51
4.10	Termogramas Adquiridos Durante el Segundo Seguimiento a la AFLS (Medición FU2)	52

4.11 Comparación de los Patrones Térmicos Faciales	53
4.12 Sistema Portátil Ocean Optics IDRaman Mini	55
4.13 Espectros Raman In Vivo	56
4.14 Espectro Raman de la Piel Antes y Después de la AFLS, y de los Colágenos	57
4.15 Análisis de Perfil de Bandas	58
4.16 Coeficientes del LCA entre los espectros Raman de la Piel Sana y los Espectros de las Proteínas de Referencia (LCA-Ctrl)	60
4.17 Coeficientes del LCA entre los Espectros Raman de la Piel con Cicatrices de Acné y los Colágenos I, III, IV y V	62
4.18 PCA Scree Plot	64
4.19 AFLS-RS-LCA-PCA	65
4.20 PCA Score Plot	66
4.21 PCA Score Plot Seleccionado	67
4.22 Abordaje PCA-QDA para la Reducción y Clasificación de Variables con el Score Plot Seleccionado (PC1 vs PC3)	68
4.23 Matriz de Confusión para el Abordaje PCA-QDA	69
4.24 Score Plot de los Valores LCA entre los PC1 y PC3 con los Espectros Originales de la Piel (PCA QDA LCA)	72
4.25 Matriz de Confusión para la Aproximación PCA-QDA-LCA	73
4.26 Análisis del Perfil de Bandas con PCA	74
4.27 Espectrómetro Ocean Optics Jaz	77
4.28 Espectro DRS de la Piel Sana	78
4.29 Espectros DRS para la Pre-Cirugía (PS) y el Seguimiento (FU)	79
4.30 Scree Plots DRS	80
4.31 Score Plot DRS	81

4.32	Loadings Plot DRS	82
4.33	Score Plot PCA-LDA para los Espectros DRS	83
4.34	Matriz de Confusión para los Espectros DRS Procesados con PCA-QDA	84
4.35	Espectros de Reflectancia Difusa y Absorbancia Aparente	86
4.36	Espectros de Reflectancia Difusa y Absorbancia Aparente	87
4.37	Espectro de Absorbancia Corregido	88
4.38	Espectro de Absorbancia para la deoxy-Hb y oxy-Hb	89
4.39	Índices de Melanina	90
4.40	Índices del Eritema Inducido	91
5.1	Patrón Térmico de los Individuos Sanos y Pacientes con Rosácea	94
5.2	Cámara Infrarroja FLIR T400	95
5.3	Score Térmicos por Lado Derecho (RS) e Izquierdo (LS) para las Zonas de Interés en la Superficie Facial	99
5.4	Patrón Térmico de Individuos Sanos y Pacientes con Rosácea	100
5.5	Espectro Raman de la Piel Sana y de la Piel con Rosácea	101
5.6	PCA de los Espectros Raman de la Piel Sana y con Rosácea	103
5.7	LDA Aplicado a los PC's Seleccionados para el Análisis de Rosácea	104
5.8	Clasificador LDA Aplicado a los Scores de los PC's Seleccionados para el Análisis de Rosácea	105
5.9	Análisis de la Forma de los Loadings Correspondientes PC's Seleccionados para el Análisis de Rosácea	106

Índice de tablas

3.1	Componentes Raman de la Piel Humana	34
4.1	Scores Térmicos	52
4.2	Bandas de los Colágenos	75
4.3	LCA-Loadings	75
5.1	Patrón Térmico de Sujetos Sanos	96
5.2	Patrón Térmico de Pacientes con Rosácea	97
5.3	Temperaturas Promedio en el Lado Derecho Facial	98
5.4	Temperaturas Promedio en el Lado Izquierdo Facial	98

Abstract

Las aplicaciones médicas de la luz han permitido el acceso a técnicas cuantitativas más precisas y confiables que los estándares de oro utilizados por el personal médico para la detección temprana de enfermedades, así como la aplicación y valoración de tratamientos basados en la luz. A la fecha, diversas técnicas de espectroscopía e imagenología se han utilizado en conjunto con técnicas numéricas de análisis multivariado y estadístico para el procesamiento e interpretación de datos, dando como resultado, nuevas herramientas de apoyo que presentan como ventajas el hecho de que son de naturaleza no-invasiva y que pueden obtenerse resultados de forma individualizada. De esta forma se obtiene un resultado más confiable para los pacientes ya que se evitan falsos positivos y/o negativos en el diagnóstico de enfermedades así como reincidencias de las enfermedades una vez tratadas y un manejo más óptimo de los tratamientos. Como forma de seguimiento a la investigación previamente realizada, el trabajo de investigación presentado en esta tesis versa sobre la aplicación de métodos ópticos no-invasivos para la valoración de tratamientos dermatológicos basados en la luz, cubriendo los dos abordajes utilizados en la óptica biomédica. En particular se estudian los efectos de una cirugía láser fraccional ablativa como tratamiento para cicatrices de acné utilizando técnicas de espectroscopía e imagenología para obtener una valoración de las interacciones luz/tejido y de esta forma darle un seguimiento individualizado y no-invasivo a los pacientes que se sometieron a dicho tratamiento. Además, se incluye un estudio para detección temprana de rosacea, así como un estudio para valorar los efectos de un tratamiento tópico, el cual es comúnmente utilizado por el personal dermatológico para el manejo de la enfermedad.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Métodos Ópticos para el Diagnóstico Médico

Las aplicaciones de la luz dentro de la medicina han incrementado de forma considerable debido al óptimo aprovechamiento de las interacciones de la radiación electromagnética con el tejido biológico, teniendo como principal interés el desarrollo de tecnologías innovadoras, mas rápidas, mas precisas y de menor coste para procedimientos médicos. Entre las principales ventajas de estas tecnologías con respecto a los métodos clínicos tradicionales esta la naturaleza no-invasiva de la radiación utilizada, la posibilidad de obtener estudios de forma individualizada, el aprovechamiento de poderosas herramientas de computo y análisis numérico que ofrecen la posibilidad de obtener resultados mas confiables, de mayor resolución y de fácil reproducción.

La *Óptica Biomédica* es la disciplina que versa sobre las interacciones de la luz con la materia biológica para aplicaciones médicas, la cual se divide en dos ramas: los *Métodos Ópticos para Diagnóstico Médico No-Invasivo*, donde se busca cuantificar las propiedades histológicas de los tejidos y estudiar las posibles variaciones que se originen en ellos debido a la presencia de alguna enfermedad, y en las *Terapias Basadas en la Luz*, donde se busca erradicar la presencia de enfermedades, al originarse efectos complejos como resultado de las interacciones luz/tejido que puedan utilizarse con fines terapéuticos [1, 2, 3, 4, 5, 6].

El concepto de utilizar la luz para diagnóstico temprano de enfermedades fue propuesto en 1984 por Robert Alfano et Al., donde se establece que los tejidos sanos presentan diferencias considerables con los tejidos enfermos al ser irradiados por una fuente de luz [7], iniciando una serie de investigaciones que sigue creciendo a la fecha bajo el concepto de *Biopsia Óptica* [8], el cuál, es el conjunto de técnicas experimentales utilizadas para la detección temprana de enfermedades y la valoración de tratamientos médicos de forma no-invasiva e individualizada [9]. Este abordaje de la óptica biomédica presenta diversas ventajas en comparación con la *Biopsia*, considerada como el estándar de oro en el diagnóstico de enfermedades [10].

Las mediciones se realizan directamente sobre la superficie del cuerpo de un ser vivo (*In Vivo*), en un laboratorio a partir de la incisión y preparación previa de la muestra (*In Vitro*) o bien, sobre el estado de origen de la muestra (*In Situ*) [11, 12, 13, 14, 15]. Para realizar la detección de patrones característicos de las muestras biológicas, también conocidos como *Biomarcadores*, es necesario que la muestra no sufra daño alguno al ser expuesta a la fuente de iluminación, es por eso la importancia de utilizar radiación no-ionizante. Por lo tanto, se utilizan fuentes de iluminación que operan en el rango del Visible (*VIS*, por sus siglas en inglés, *Visible*) y del Cercano Infrarrojo (*NIR*, por sus siglas en inglés *Near Infrared*), el cuál es conocido como *Ventana Terapéutica* [16], *Ventana de Diagnóstico* [17] ó *Ventana Óptica de los Tejidos I*, y que va de los $700\text{nm} - 1.2\mu\text{m}$ dentro del *Espectro Electromagnético*, y es en este rango donde la absorción y el esparcimiento de la luz en los tejidos son bajos, la profundidad de penetración es mayor, y sobre todo, la alta disponibilidad de fotodetectores que operan en este rango (Figura 1.1).

En años recientes el término de ventana terapéutica ha sido extendido a diferentes rangos, haciendo de esta forma que las posibilidades de utilizar la luz para fines de diagnóstico médico sean mayores. Las ventanas ópticas propuestas son [18, 19, 20]: *Ventana II* ($1.1 - 1.35\mu\text{m}$), *Ventana III* ($1.6 - 1.87\mu\text{m}$) y *Ventana IV* ($2.1 - 2.35\mu\text{m}$).

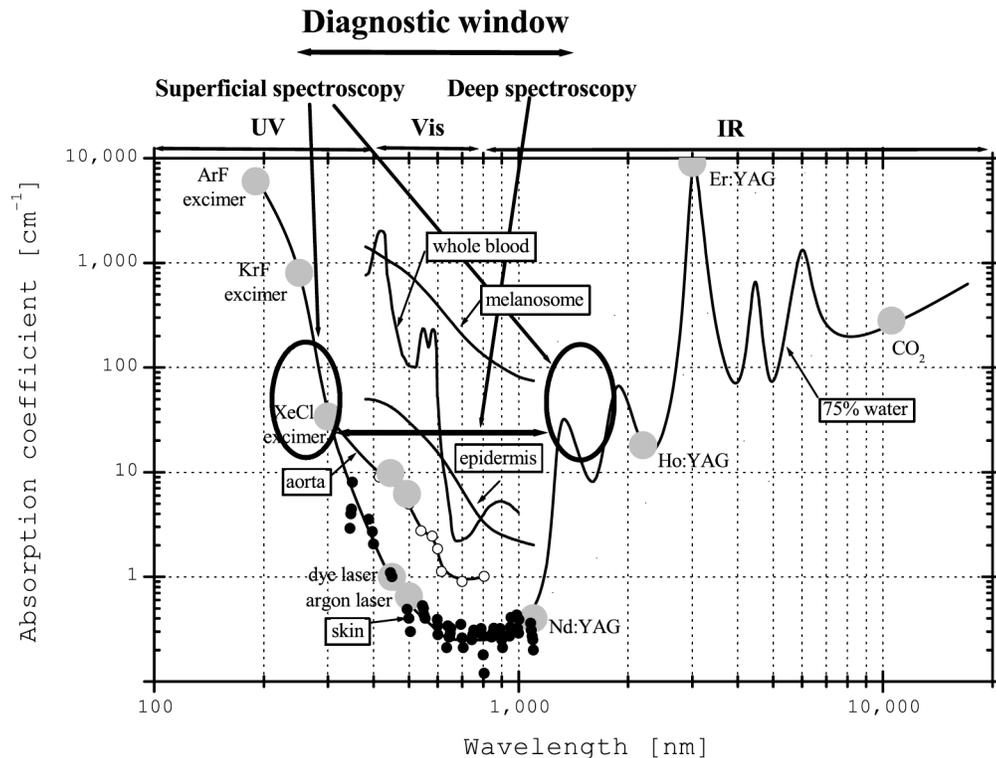


Figura 1.1: Espectros de absorción de la piel humana, la aorta, diversos componentes tisulares (agua, epidermis y los melanomas), y de la sangre [11].

Adicionalmente a los métodos ópticos, las técnicas de simulación numérica son de gran utilidad para modelar y predecir el comportamiento de la radiación utilizada dentro de los tejidos, y de esta forma obtener un marco de referencia [21]. Desde su introducción en la óptica biomédica en 1995 por Steven L. Jacques y Lihong Wang [22], la simulación por el *Método de Monte Carlo (MC)* es considerada como el estándar de oro para modelar la propagación de la luz dentro de los tejidos [23, 24, 25]. Actualmente, a pesar de haber sido llegado a considerarse como un método obsoleto, se han realizado innovadores enfoques de la simulación MC, las cuáles explotan al máximo las nuevas herramientas de computo disponibles en la actualidad, de esta forma las simulaciones MC siguen siendo ampliamente utilizadas en el campo de la óptica biomédica [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]. Recientemente la simulación por el *Método del Elemento Finito (FEM)* ha empezado a utilizarse como herramienta de simulación dentro de la óptica biomédica [33, 34, 35, 36, 37].

Entre los diferentes métodos de diagnóstico médico no-invasivo se pueden mencionar la *Espectroscopía Raman*, la *Espectroscopía de Reflectancia Difusa*, la *Imagenología por Termografía Infrarroja Digital* (comúnmente conocida como *Termografía Infrarroja*), la *Tomografía de Coherencia Óptica*, etc. La principal diferencia entre el tipo de mediciones radica en la complejidad de los instrumentos utilizados para llevar a cabo las medición deseadas, ya que los equipos utilizados para las mediciones *In Vivo* e *In Situ* pueden ser sistemas portátiles, de resolución variable y, de preferencia, de bajo costo, mientras que los equipos para las mediciones *In Vitro* son mas precisos, por lo que su uso esta restringido a los laboratorios especializados. Estas considerables diferencias entre las mediciones dan origen a variaciones considerables en los resultados obtenidos y sobre todo en el costo final del estudio o experimento a realizar [38, 39, 40, 41, 42, 43].

Cuando se realiza un diagnóstico médico temprano de enfermedades es común que se utilicen técnicas de *Análisis Multivariado (MVA)*, para procesado y análisis de datos [44, 45, 46]. En una primera instancia, realizar un *Análisis Univariado* en los datos obtenidos sería la opción mas adecuada, ya que es posible estudiar variaciones de forma independiente sobre la variable de interés, pero debido a que se trabaja con datos de espectroscopía e imagenología, donde se tienen múltiples variables de interés, la aplicación del MVA es mas óptima ya que es posible al procesar y reducir el número de espectros, analizar las variaciones en intensidad, registrar corrimientos en los números de onda, o bien, estudiar las variaciones en los spots térmicos de una imagen, de esta forma el MVA se lleva a cabo de forma general, es decir, de todo el conjunto de espectros/imágenes. Preferentemente se busca realizar el MVA sin tener conocimientos previos (*A Priori*) de los datos debido a que los cambios que se buscan pueden provenir de diferentes procesos. Si se llegara a tener un conocimiento *a priori* de los datos, las técnicas de MVA se utilizan para clasificar los datos en grupos previamente definidos. Aunque en la actualidad se han propuesto metodologías de análisis mas robustas y complejas como el *Deep Learning* o el *Machine Learning*, están basadas en técnicas de MVA y se utilizan con los mismos fines de clasificación de datos o predicción de patrones [47].

1.1.1. Espectroscopía Raman

La *Espectroscopía Raman* (RS por sus siglas en inglés, *Raman Spectroscopy*) es una técnica experimental basada en la interacción luz/materia que fue introducida por primera vez en 1921 por Sir Chandrasekhara Venkata Raman en el artículo *The Color of the Sea* [48], que versa sobre el efecto que tiene el esparcimiento de luz sobre el color del océano, posteriormente en 1928 nombro a la técnica con su nombre la cuál lo hizo acreedor al premio Nobel de Física en 1930 [49].

El esparcimiento de luz, también conocido como *Scattering*, es el efecto del redireccionamiento de un haz de luz ocasionado por las colisiones entre los fotones del haz de luz incidente y las moléculas de la muestra que esta siendo analizada. Este efecto se utiliza principalmente para medir el tamaño o la distribución de partículas a escala nanométrica, y es observado principalmente en medios turbios, como el tejido biológico [9]. Dependiendo de sus características energéticas, el esparcimiento de luz puede ser de dos tipos:

- **Esparcimiento Elástico:** Contiene la misma frecuencia que el haz de luz incidente, por lo tanto es mas intenso. Este tipo de esparcimiento puede ser generado por partículas mas pequeñas (*Rayleigh*) o mas grandes que la longitud de onda del haz de luz (*Mie*) [50, 51].
- **Esparcimiento Inelástico:** Aproximadamente 1 fotón de cada 10^7 del haz de luz incidente es esparcido con un corrimiento en frecuencia, el cuál es producto de las ondas acústicas que están presentes en el medio (*Brillouin*) o por las moléculas de la muestra bajo análisis que esparcen los fotones con menor (*Raman Stokes*) ó mayor (*Raman Anti-Stokes*) energía que los fotones incidentes [52, 53].

El principio básico de la espectroscopía Raman es la generación de esparcimiento inelástico de la luz originado por la interacción entre los fotones del haz de luz incidente con las moléculas de una muestra [9]. El esparcimiento de luz resultante puede tener la misma frecuencia que el haz incidente (*Esparcimiento Elástico*), o bien, puede presentar un corrimiento en frecuencia ocasionado por la ganancia/pérdida de energía (*Esparcimiento Inelástico*), los cuáles son únicos para cada componente de la muestra. Esta representación de niveles de energía se puede observar de forma gráfica en el llamado *Diagrama de Niveles de Energía* (Figura 1.2).

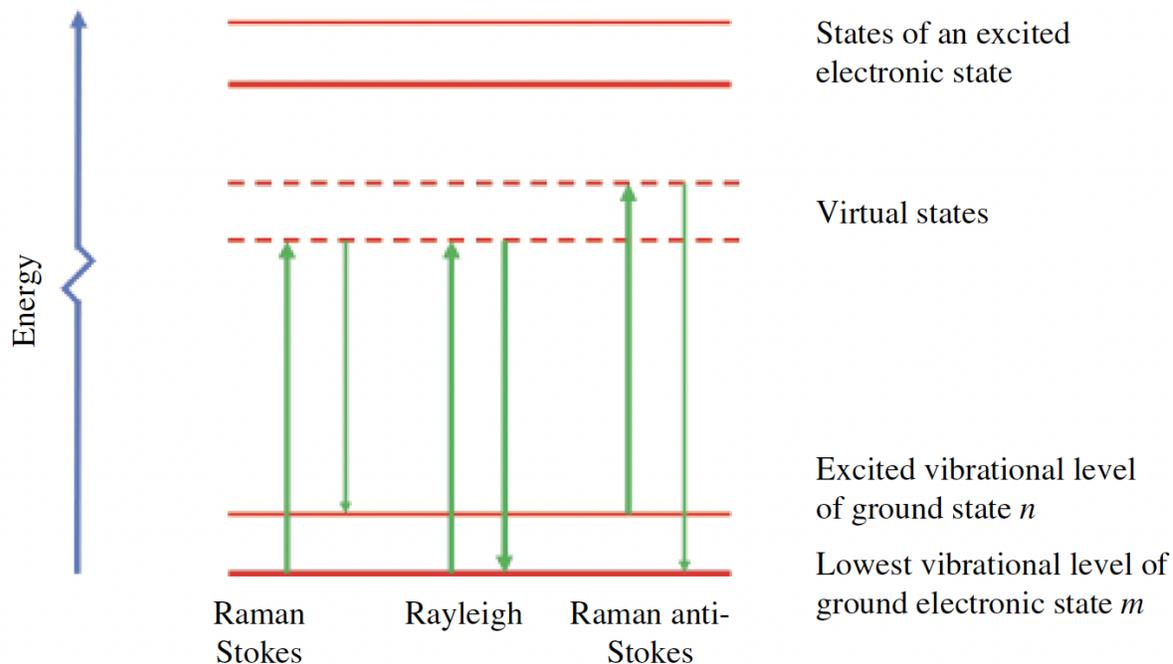


Figura 1.2: Diagrama de Niveles de Energía [52].

En términos de energía, cuando la luz interactúa con las moléculas de la muestra, que se encuentran en un *Estado Basal* con energía m , se produce una polarización en la nube de electrones que rodean el núcleo de las moléculas, dando origen a un nivel energético de corta duración llamado *Estado Virtual*, el cual es alcanzado por los fotones del haz de luz, al ser esparcidos por la molécula, siendo redirigidos a el estado basal con energía m , o a un *Estado Excitado* con mayor energía n . El efecto puede observarse de forma inversa, al estar la molécula en un estado excitado y redirigir los fotones a un estado basal. De esta forma se obtiene una 'huella dactilar' de la muestra bajo análisis, la cuál es posible observar en una gráfica conocida como *Espectro Raman* (Figura 1.3). En dicha gráfica se representa la intensidad de la luz esparcida en función de la diferencia en frecuencia entre el haz de luz incidente y los haces de luz esparcidos por la muestra [9, 16]. El esparcimiento Rayleigh es aquel con mayor intensidad y posee la misma energía y frecuencia que el haz de luz incidente, por lo tanto, se encuentra ubicado en el centro de la gráfica, donde no se observa ningún corrimiento. Cuando se tienen intensidades con menor frecuencia que el haz de luz incidente, estas se observan a la izquierda del espectro Raman. A este tipo de esparcimiento se le conoce como *Esparcimiento Inelástico Raman Anti-Stokes*. cuando el esparcimiento inelástico resultante presenta una ganancia en frecuencia, se observan intensidades a la derecha del espectro Raman. A este tipo de esparcimiento se le conoce como *Esparcimiento Inelástico Raman Stokes*.

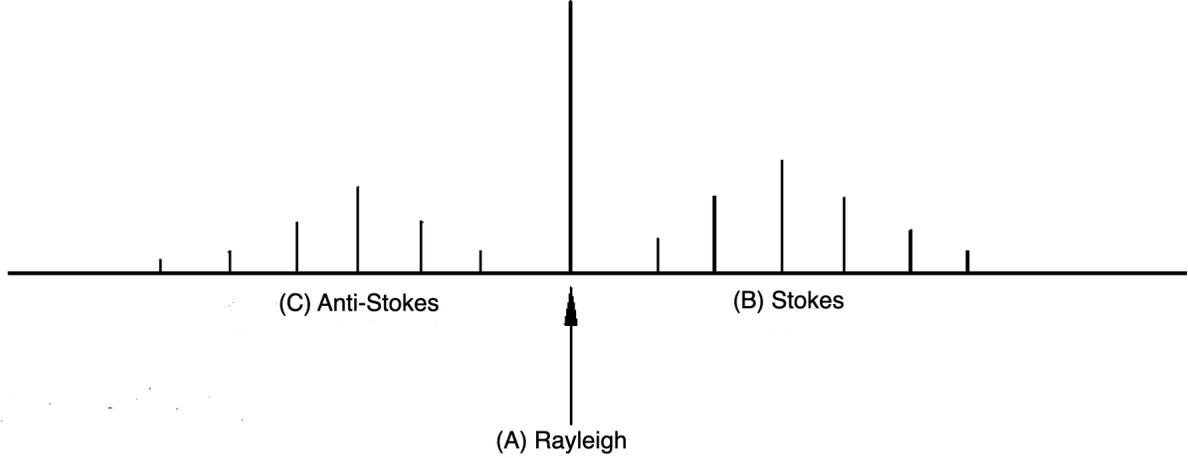


Figura 1.3: Representación de un Espectro Raman [54], donde es posible observar: (A) el esparcimiento Rayleigh, que presenta mayor intensidad y ningún corrimiento en frecuencia, (B) el esparcimiento Raman Stokes, que es el que presenta pérdidas en frecuencia, y (C) el esparcimiento Raman Anti-Stokes, que presenta ganancias en frecuencia [9].

Los corrimientos Raman se obtienen por la relación entre la longitud de onda del haz de luz incidente y la longitud de onda del haz esparcido (Eq.1.1)[9]:

$$\Delta(cm^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_s}\right) * \left(\frac{10^7 nm}{1cm}\right) \quad (1.1)$$

El esparcimiento Raman se origina al inducirse un momento dipolar sobre la componente eléctrica de una onda electromagnética cuando esta interactúa con una molécula, el cuál se describe en la Eq.1.2:

$$\vec{P} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi v_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 E_0 \cos 2\pi(v_0 + v_m t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 E_0 \cos 2\pi(v_0 - v_m t) \quad (1.2)$$

donde α_0 es la polarizabilidad en estado de equilibrio, $(d\alpha/dq)_0$ es la razón de cambio de la polarizabilidad con respecto de la carga q evaluada en el punto de equilibrio, v_0 es la frecuencia de oscilación de la onda electromagnética, v_m es la frecuencia de oscilación de la molécula y t es la variable temporal [9]. El primer término de la Eq.1.2 corresponde a el esparcimiento elástico Rayleigh debido a que el momento dipolar inducido oscila con la misma frecuencia que la onda electromagnética (v_0). El segundo término corresponde a el esparcimiento inelástico Raman Anti-Stokes, donde se observa una ganancia en frecuencia ($v_0 + v_m$). Finalmente el tercer término corresponde a el esparcimiento inelástico Raman Stokes, con una pérdida en frecuencia ($v_0 - v_m$) con respecto a la frecuencia de oscilación de la onda electromagnética. Es importante observar que si no hay una razón de cambio en la polarizabilidad $(d\alpha/dq)_0 = 0$, ningún

esparcimiento inelástico es generado, por lo tanto se dice que la molécula no es activa en Raman. Un espectro Raman característico se observa en la Figura 1.4, el cuál corresponde al silicio y que muestra una banda característica en los 521cm^{-1} con alta intensidad (Figura 1.4).

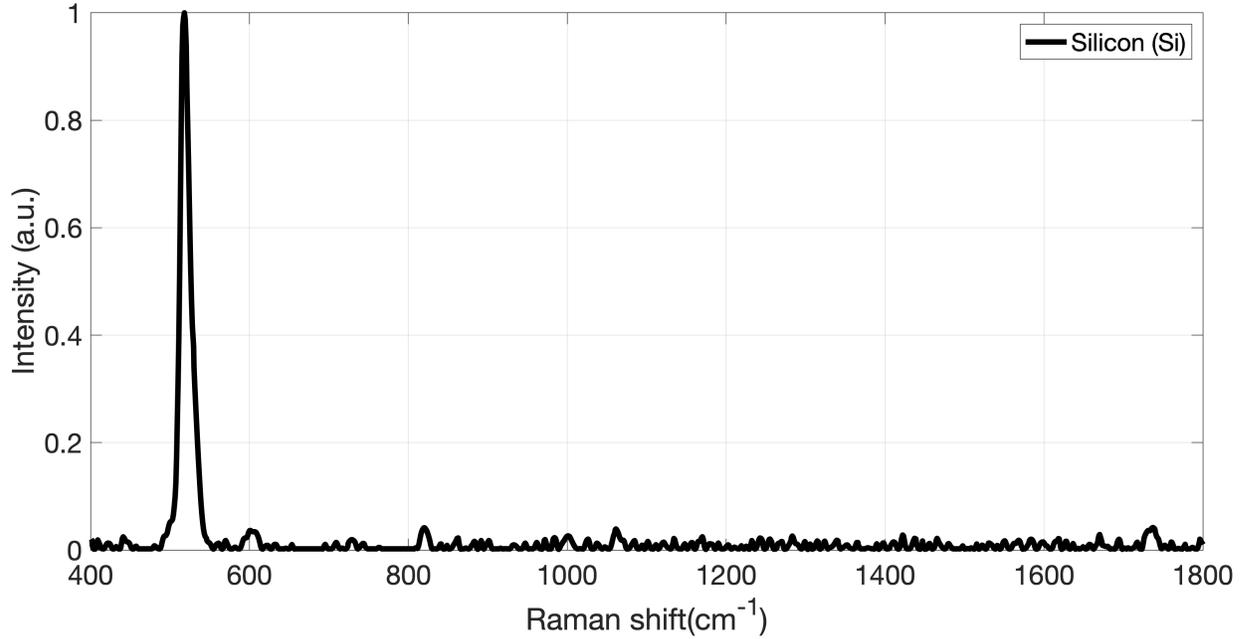


Figura 1.4: La intensidad de las bandas Raman es producto de la razón de cambio del flujo electromagnético con respecto del ángulo sólido ($I = d\Phi/d\Omega$) [53].

1.1.2. Espectroscopía de Reflectancia Difusa

La *Reflectancia Difusa* es una técnica utilizada para estudiar la composición espectral de una superficie a partir de la luz que es reflejada por la misma superficie con respecto del haz de luz que incide sobre ella [55]. Se considera como la mas versátil de todas las técnicas espectroscópicas, en gran parte debido a que opera en el rango del ultra-violeta (UV), visible (VIS) e infrarrojo (IR). En esta técnica se analiza la relación entre la luz esparcida por un medio de grosor infinito y la luz esparcida por un medio ideal no-absorbente, en función de la longitud de onda [56, 57]. Para definir analíticamente el fenómeno de reflectancia difusa es posible utilizar la ecuación de transferencia de radiación (Eq.1.5):

$$\frac{-dI}{\kappa\rho dS} = I - \frac{j}{\kappa} \quad (1.3)$$

donde I es la intensidad del haz de luz incidente sobre la muestra, dI/dS es la razón de cambio de la intensidad con respecto de la longitud de la trayectoria S , ρ es la densidad del medio, κ es el coeficiente de atenuación debido a la absorción y el esparcimiento del haz de luz y j es la función de esparcimiento.

Dicha ecuación puede resolverse utilizando la aproximación *Kubelka-Munk*, donde se considera un flujo incidente I y un flujo esparcido J , ambos perpendiculares a una superficie y con dirección opuesta entre ellos (Figura 1.5).

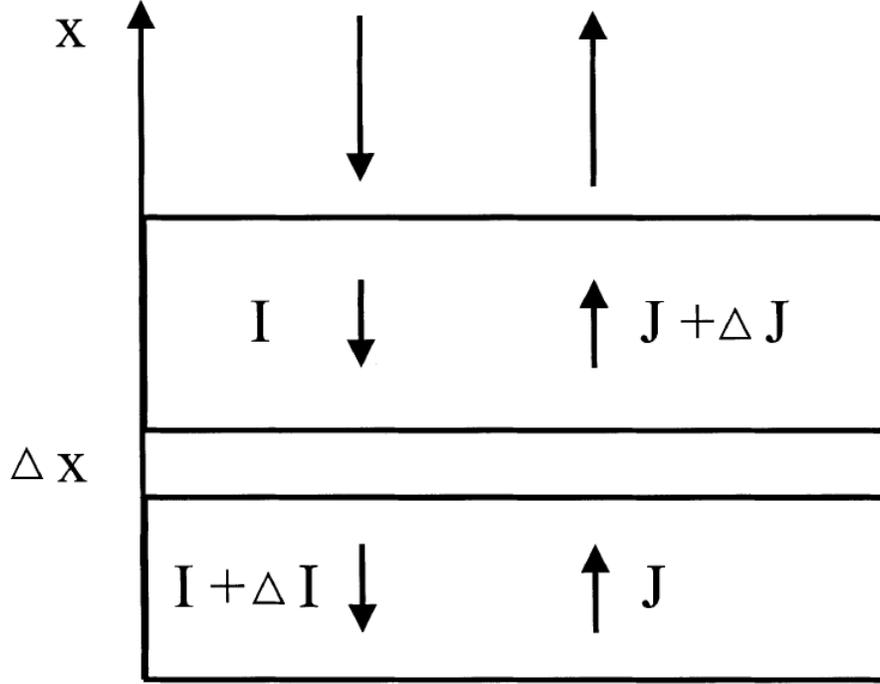


Figura 1.5: Aproximación de Kubelka-Munk para el estudio de reflectancia difusa.

Tomando esta aproximación, la reflectancia difusa esta en función de los coeficientes de absorción K y esparcimiento aparente S :

$$R_{\infty} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad (1.4)$$

La *Espectroscopía de Reflectancia Difusa* (DRS, por sus siglas en inglés, *Diffuse Reflectance Spectroscopy*) es una técnica utilizada para detectar las intensidades de los haces de luz que son reflejados de forma difusa en función de la longitud de onda [58, 59]. Para llevar a cabo las mediciones es necesario realizar mediciones de reflectancia de un blanco estandar y del ruido del detector, ambas mediciones son utilizadas como referencia con respecto de la medición sobre la muestra bajo análisis (Eq. 1.5)

$$R(\lambda) = \frac{S_{meas}(\lambda) - D(\lambda)}{S_{ref}(\lambda) - D(\lambda)} \quad (1.5)$$

donde S_{meas} es la intensidad reflejada por la muestra, S_{ref} es la intensidad reflejada por el blanco standard, D es la intensidad del ruido del detector y λ es la longitud de onda [60, 58]. Un espectro típico de espectroscopía de reflectancia difusa se muestra en la Figura 1.6.

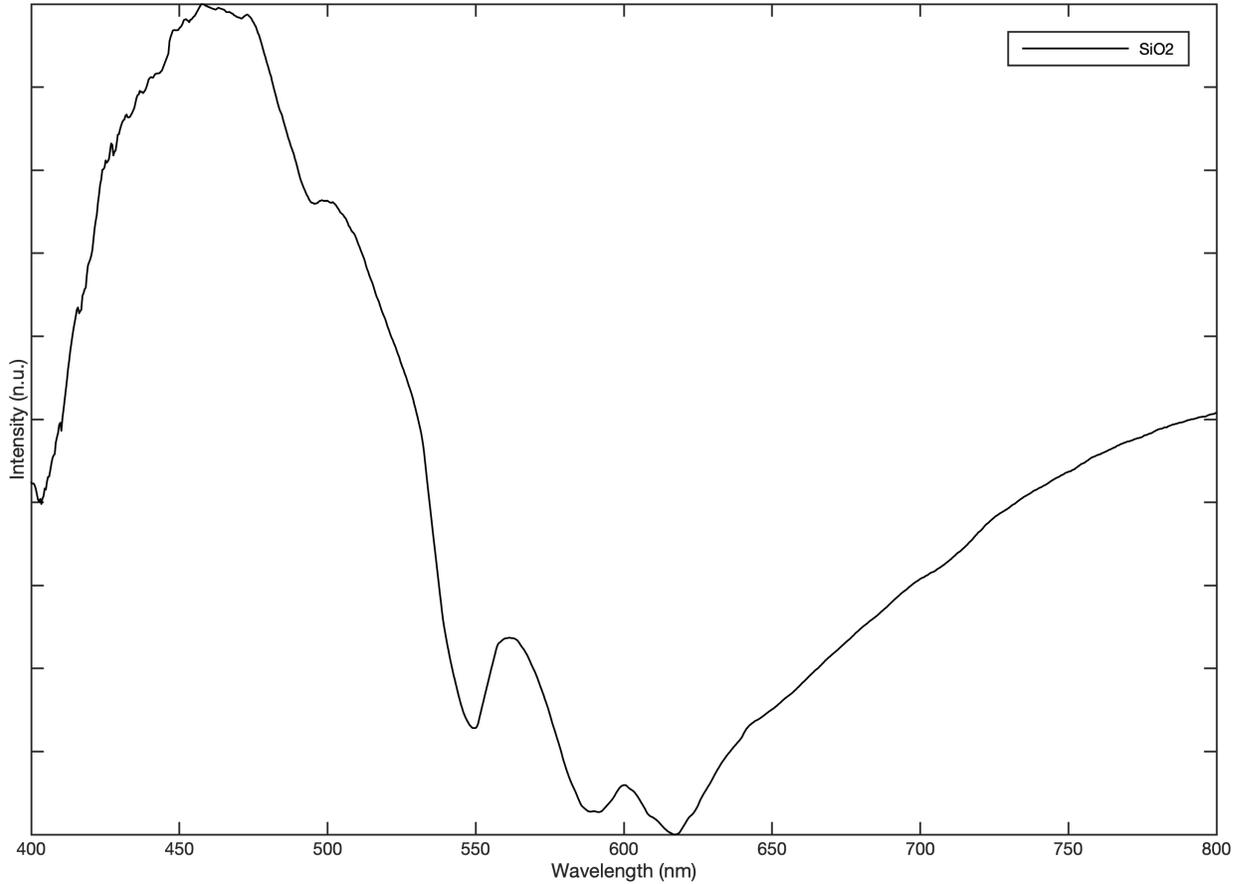


Figura 1.6: Espectro DRS característico para el SiO2 [61].

1.1.3. Imagenología por Termografía Infrarroja Digital

La *Imagenología por Termografía Infrarroja Digital* (DITI, por sus siglas en inglés, *Digital Infrared Thermography Imaging*), comúnmente conocida simplemente como *Termografía Infrarroja*, es una tecnología utilizada para analizar el patrón térmico de un objeto bajo análisis a partir de la adquisición y procesamiento digital de imágenes. El dispositivo utilizado en esta técnica es conocido como *Cámara Termográfica*, el cuál ha alcanzado considerables niveles de resolución debido al constante avance científico y tecnológico para el desarrollo de dispositivos detectores de radiación infrarroja.

Un *Cuerpo Negro* es una superficie que absorbe toda la radiación que incide sobre ella, en todas las direcciones, en todas las longitudes de onda, por lo tanto se considera como un absorbente/emisor ideal.

De esta forma se toma como referencia para analizar la radiación emitida por superficies reales [62]. La radiación emitida por un cuerpo negro ($E_{b,\lambda}(\lambda T)$) a cierta temperatura se analiza utilizando la ley de Plank, la cuál describe la potencia emitida por unidad de área, por unidad de longitud de onda:

$$E_{b,\lambda}(\lambda T) = \frac{2\pi hc^2}{\lambda^5 \left(\exp\left(\frac{hc}{\lambda kT}\right) - 1 \right)} \quad (1.6)$$

donde $h = 6.62 \times 10^{-34} Js$ es la constante de Plank, $c = 2.9979 \times 10^8 m/s$ es la velocidad de la luz, λ es la longitud de onda, $k = 1.3807 \times 10^{-23} J/K$ es la constante de Boltzman. Para determinar la intensidad máxima de una longitud de onda a una temperatura específica, es necesario tomar la derivada de la ley de Plank (1.6) con respecto de λ . A esta relación se le conoce como la ley de Wien [63]:

$$\lambda_{max} * T = 2829 \mu m K \quad (1.7)$$

El principio básico de la termografía infrarroja esta basado en la ley de Stefan-Boltzman, la cuál se obtiene al integrar la ley de Plank (Eq.1.6) en todo el rango del espectro electromagnético [64]. La ley de Stefan-Boltzman relaciona la temperatura con la radiación emitida por un objeto cuya temperatura es mayor al cero absoluto, la cuál es conocida como *Radiación Térmica*, o bien, *Radiación Infrarroja* [65, 63, 66]:

$$P = \varepsilon \sigma A T^4 \quad (1.8)$$

donde P es la potencia radiada, ε es la medición de la radiación emitida por el objeto bajo análisis con respecto a un cuerpo negro, conocida como *Emisividad*, σ es la constante de Stefan-Boltzman con un valor de $5.67 \times 10^{-8} W/m^2 K^4$, A es el área de la superficie radiante y T es la temperatura del objeto [65]. Los sistemas de imagenología por termografía infrarroja están contruidos a base de dispositivos bolométricos de *VOx*, los cuales sirven como detectores de radiación infrarroja, produciendo así imágenes y videos con información radiométrica acerca del objeto bajo análisis [67]. En la Figura 1.7 se muestra una imagen infrarroja, donde se observa la distribución de la radiación emitida por una superficie después de estar en contacto con el cuerpo humano.

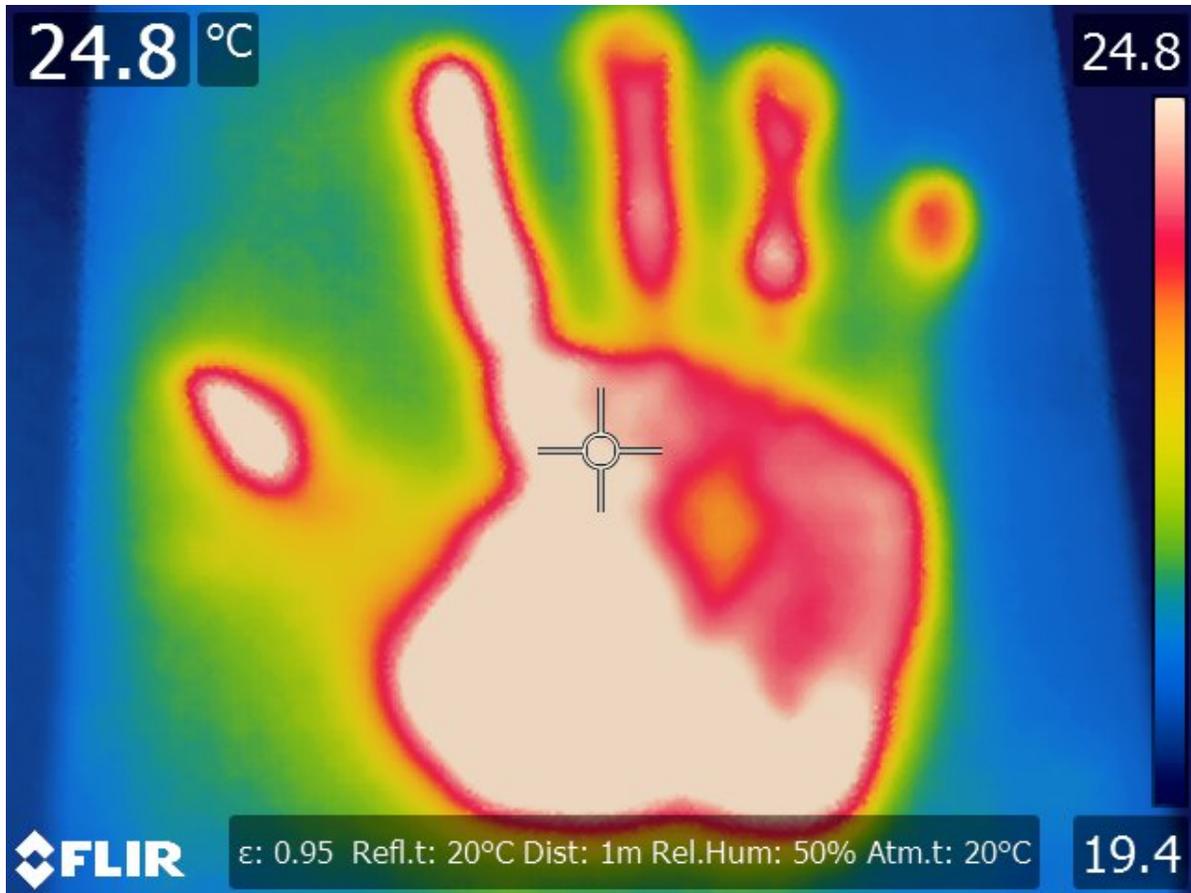


Figura 1.7: Imagen adquirida con una cámara termográfica. La escala de colores de la imagen esta mapeada con respecto de la escala de las temperaturas detectadas.

1.2. Métodos Ópticos para Tratamiento

El primer registro del uso terapéutico de la luz lo dio el médico francés Henri de Mondeville (1260-1320), quien utilizó luz roja para el tratamiento de viruela. Posteriormente, en el siglo XX, y basándose en los estudios realizados por Mondeville, el médico danés Niels Ryberg Finsen (1860-1904) recibió el premio Nobel por su trabajo en el tratamiento de la viruela con la luz. En 1888 se observó por primera vez el efecto *Fotoquímico* en células animales y en 1898 se descubrió el efecto de la *Acción Fotodinámica* para el mejoramiento de la citotoxicidad de la eosina en la piel activado por la luz. Posteriormente a este mecanismo se le conocería como *Terapia Fotodinámica*. En el periodo de 1903 a 1907 se reportaron trabajos innovadores acerca del uso de la luz para el tratamiento de cáncer de piel y posteriormente para tumores en los ojos por medio del efecto de *Fotocoagulación* utilizando la luz del sol [1].

Durante la época donde surgieron las primeras aplicaciones de la óptica biomédica, se utilizaban fuentes de iluminación incoherente y de amplio rango, como la luz del sol, lámparas incandescentes o

lámparas de gas, hasta la década de 1950, cuando fueron reemplazadas por fuentes de luz de alta potencia óptica. El uso terapéutico más importante de la luz es el efecto de fotocoagulación por medio de radiación Láser, la cuál es seleccionada para actuar sobre la superficie de interés de un órgano o tejido, la cuál es selectiva a cierta longitud de onda, produciendo a múltiples mecanismos originados por la interacción luz/tejido. En 1960 Theodore Harold Maiman reportó por primera vez de forma experimental, una fuente de iluminación monocromática, mejor conocida como radiación Láser (*Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación*, por sus siglas en inglés, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) [68], la cuál había sido propuesta teóricamente por Arthur Leonard Schawlow y Charles Hard Townes en 1958 como una mejora a la fuente de radiación Máser (*Amplificación de Microondas por Emisión Estimulada de Radiación*, por sus siglas en inglés, *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) [69]. A la par del descubrimiento de la radiación láser, las aplicaciones en la medicina fueron emergiendo, especialmente en áreas como la dermatología y la oftalmología y fue hasta inicios de la década de 1990, cuando se estableció que el uso de los láseres en la medicina eran una practica segura y efectiva, consolidándose así como estándares de oro en el tratamiento médico de enfermedades en diferentes áreas como la odontología, la neurología, la oncología, la cardiología y en muchas otras mas áreas de la medicina [70]. A el conjunto de las aplicaciones terapéuticas del laser se le denomina *Cirugía Láser* o *Medicina Láser*. En la Figura 1.8 se establecen las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico de los láseres, ambas incluidas dentro del concepto de óptica biomédica.

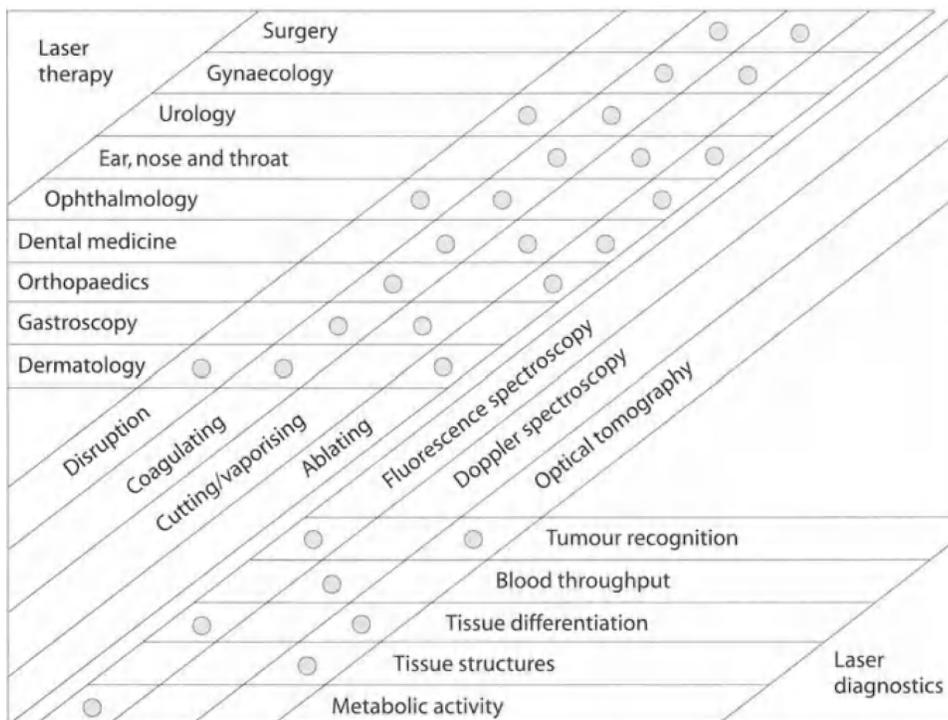


Figura 1.8: Aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de los láseres [70].

1.2.1. Tratamiento Láser

La cirugía láser se utiliza para manipular tejidos, de forma mínimamente invasiva, por medio de los mecanismos de:

- *Fototermólisis Selectiva*: Esta basada en la absorción de pequeños pulsos de radiación al generar y confinar calor en determinados tejidos con pigmentos [71, 72].
- *Fotoablación*: Al tener un alto nivel de irradiación y periodos cortos de exposición a la radiación, conocidos como *Pulsos*, se origina una ruptura del tejido dando como resultado la destrucción y eliminación del tejido [73].
- *Fotosoldado*: Consiste en aprovechar la energía del láser incidente sobre el tejido para fundirlo directamente o para activar agentes biológicos que enlazan tejidos, permitiendo así el cierre de heridas o lesiones sin necesidad de realizar una suturación. Los mecanismos detrás del fotosoldado son la desnaturalización y la homogenización de colágeno con fibrilos a partir del calentamiento del tejido a partir de la absorción de la energía del láser en el tejido [74].
- *Fotoruptura*: Es producto de una *Descomposición Óptica*. Se utiliza para romper o evaporar materia dura que se forma en los tejidos e interfiere con el correcto funcionamiento de estos [75].
- *Fotocoagulación*: Se utiliza para eliminar tejidos dañinos sin afectar la integridad del órgano. En este proceso, la energía del laser utilizado es menos intensa que en el efecto de la fotoablación, por lo tanto la absorción es menor [76].

Las aplicaciones de los láseres en la medicina crecen cada día mas. Un factor crucial en la medicina láser es el tiempo de recuperación del tratamiento sobre el paciente, idealmente se espera que este sea cada vez menor y que la efectividad del tratamiento sea tan alta que no suponga algún impacto negativo en la vida diaria del paciente. Otro factor importante es el hecho de emplear láseres cuyos efectos sean mínimamente invasivos para los tejidos, de forma similar a los utilizados en el diagnóstico médico no-invasivo, de ahí el innovador concepto conocido como *Terapia Láser a Bajo Nivel (Low Level Laser Theraphy)* [77].

Las interacciones luz/tejido aún continúan en estudio para encontrar técnicas mas óptimas, así como configuraciones de los láseres adecuadas para la aplicación deseada. A la fecha existen seis diferentes tipos de láseres: *Láseres químicos*, *Diodos Láser*, *Láseres Colorantes*, *Láseres de Electrones Libres*, *Láseres de Gas* y *Láseres de Estado Solido* [1, 2]. En secciones posteriores se profundizara sobre las interacciones luz/tejido y las técnicas de modelado teórico utilizadas en la actualidad.

1.2.2. Terapia Fotodinámica

La *Terapia Fotodinámica* (PDT, por sus siglas en inglés, *Photo-Dynamic Theraphy*) es una terapia basada en la luz donde se busca la erradicación de enfermedades de forma no-invasiva, principalmente de enfermedades cancerígenas. La principal innovación de la terapia fotodinámica esta en su alta efectividad, selectividad y especificidad, además de la posibilidad de integrar nuevos materiales y tecnología a escala nanométrica para optimizar su mecanismo de operación. El término de terapia fotodinámica fue propuesto en 1900 por el médico alemán Oscar Raab en su artículo "Ueber die Wirkung Fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien (Sobre el efecto de las sustancias fluorescentes sobre los infusorios)", que versaba sobre la toxicidad en el microorganismo *Paramecium caudatum* y sus variaciones al ser expuesta a la luz del sol [78, 79, 80, 81, 82, 83].

El mecanismo de operación de la terapia fotodinámica es la administración de un compuesto conocido como *Fotosintetizador*, el cuál tiene las propiedad de adherirse a tejidos que presenten alguna patología en específico, y que es fotosensible, es decir, sus moléculas absorben energía, al ser expuestas a la luz, originando así la erradicación de las células inapropiadas del tejido que presenta la patología de interés [84].

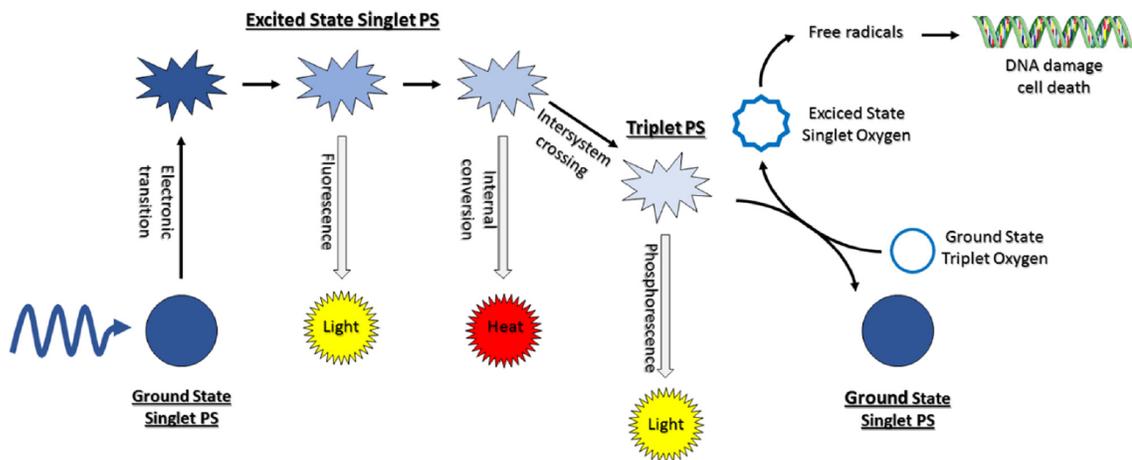


Figura 1.9: Mecanismo de operación de la terapia fotodinámica [84, 85, 86].

1.3. Aplicaciones de la Óptica en la Dermatología

La *Dermatología* es la rama de la medicina que se encarga de estudiar la piel, así como el diagnóstico y tratamiento de las patologías que se originan en ella. La piel, al ser un tejido biológico, presenta efectos de absorción y esparcimiento al interactuar con la luz, por lo tanto es considerada como un *Medio Turbio*

(Figura 1.10). La fracción de la radiación que es absorbida por el la piel puede utilizarse como herramienta terapéutica, mientras que la fracción de la radiación que es esparcida, puede utilizarse como herramienta de diagnóstico [87, 88, 89].

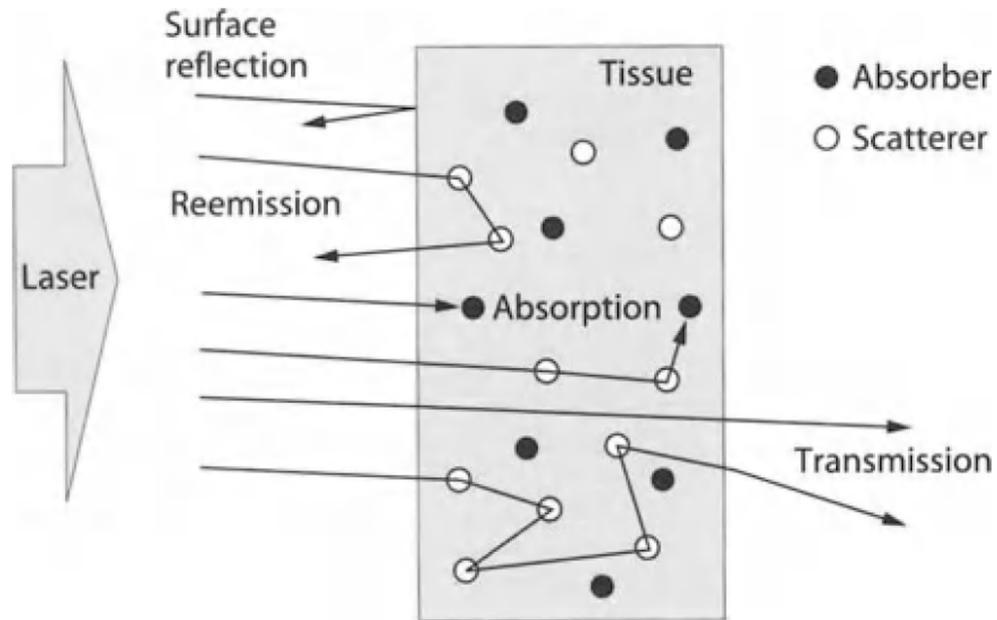


Figura 1.10: Propagación de la luz en un medio turbio [70].

La propiedad de la luz de penetrar en un tejido, interactuar con los componentes del mismo tejido, y después salir del tejido para ser detectada y procesada es la clave para las aplicaciones de diagnóstico médico. Por otro lado, la propiedad de la luz para penetrar un tejido y depositarle energía ocasionando procesos químicos y/o térmicos es fundamental para las aplicaciones terapéuticas de la luz. Por lo tanto, dentro de la óptica biomédica, como primer paso es importante especificar las propiedades ópticas de los tejidos para diseñar dispositivos basados en la luz para aplicaciones médicas, interpretar mediciones de diagnóstico y elaborar protocolos terapéuticos. El paso siguiente es utilizar las propiedades ópticas de los tejidos en un modelo de transporte para modelar y predecir teóricamente la propagación de la luz y la deposición de energía en los tejidos [90, 91].

Previamente se ha utilizado la espectroscopía Raman como herramienta en aplicaciones dermatológicas, entre las que se pueden mencionar la detección temprana de enfermedades como la dermatitis atópica [92, 93], la alergia al níquel [94], la diabetes mellitus [95, 96, 97], melasma [98, 99], la fibrosis hepática [100], etc. También se ha utilizado como herramienta de valoración no-invasiva para terapias basadas en la luz [101, 38] y tratamientos tópicos [102], evaluación del envejecimiento de la piel por efectos foto-inducidos [103, 104, 105], monitoreo de la humedad en la piel [106], diagnóstico temprano de cáncer

[107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115] y psoriasis [116]. Una de los principales atractivos de la espectroscopía Raman es la posibilidad de poder realizar mediciones in vivo, evitando así realizar procesos que estén restringidos a un laboratorio [9, 38, 3, 39, 117, 118]. La configuración típica para aplicaciones médicas in vivo de la espectroscopía Raman *in vivo* se muestra en la Figura 1.11.

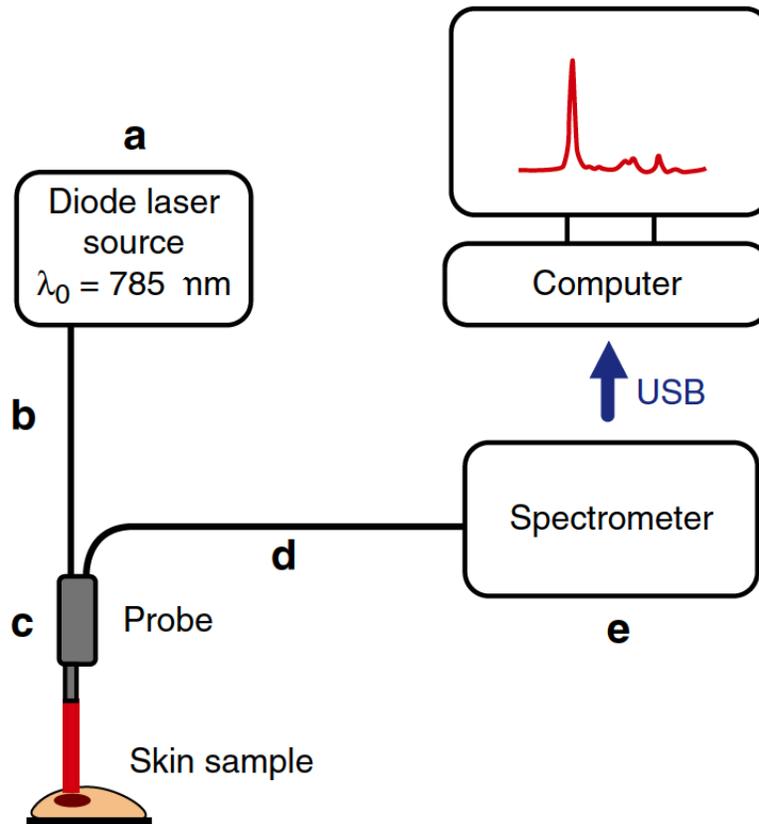


Figura 1.11: Instrumentación Raman requerida para aplicaciones biomédicas *in vivo* [16].

Por otro lado, la espectroscopía de reflectancia difusa se ha utilizado ampliamente para estudiar las variaciones pigmentación de la piel [87], daños en la piel inducidos por la exposición al sol [119], cicatrización de heridas [120], quemaduras [121] evaluación de eritemas [122], monitoreo de niveles de glucosa en la sangre [123], cáncer de piel [124, 125] así como la determinación cuantitativa del foto-tipo de la piel [126, 60, 127]. Debido a que dichas patologías son reconocibles a simple vista, la espectroscopía de reflectancia difusa sirve como herramienta cuantitativa para determinar las propiedades ópticas de la piel [57, 128] y establecer márgenes de superficie entre tejidos sanos y enfermos [58]. Aunque son técnicas complementarias, una ventaja de la espectroscopía de reflectancia difusa con respecto a la espectroscopía Raman es que la instrumentación requerida es mas accesible, lo cuál ha permitido el desarrollo de innovadores prototipos que ya están, o se encuentran en proceso de, estandarización por el personal médico

[129, 130, 125]. Un factor que podría considerarse como una desventaja es la fuente de iluminación utilizada, ya que las lámparas de halógeno-tungsteno y xenón utilizadas operan en una parte de la región UV del espectro electromagnético, la cuál es dañina para los tejidos. En la Figura 1.12 se muestra la configuración basada en fibras ópticas que se ha estandarizado para aplicaciones de la espectroscopía de reflectancia difusa en la dermatología [58].

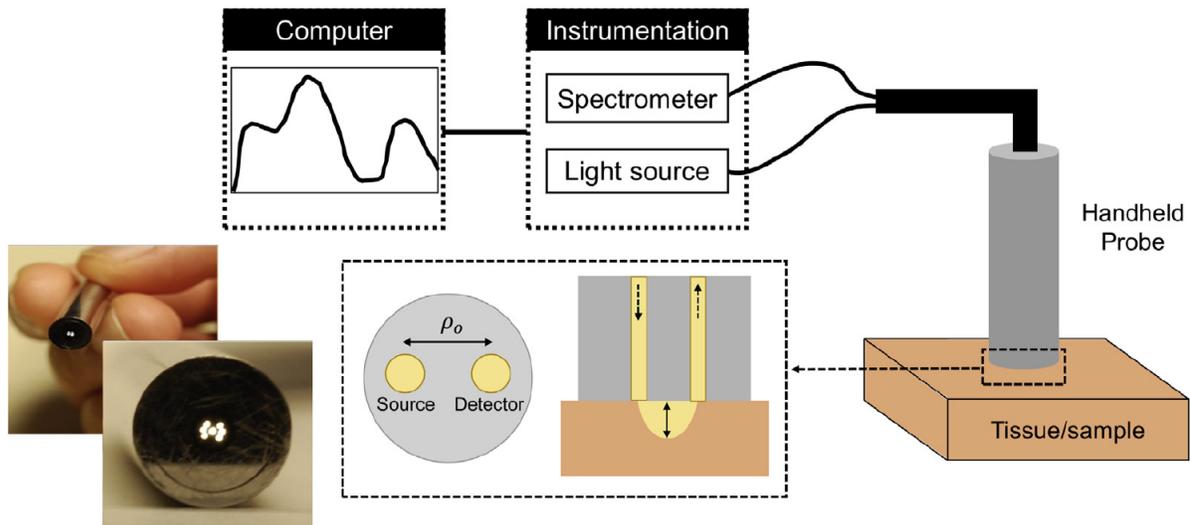


Figura 1.12: Instrumentación requerida para aplicaciones biomédicas utilizando espectroscopía de reflectancia difusa *in vivo* [58].

La piel, al ser el tejido biológico que se encuentra mas expuesto al exterior, tiene la función de proteger a los tejidos internos del cuerpo humano y absorber energía exterior, por lo tanto, el patrón térmico de la piel puede utilizarse como herramienta de diagnóstico y monitoreo. Las variaciones en la temperatura pueden ser ocasionadas por cambios en la distribución espacial de la superficie de la piel o por cambios en la dinámica de sub-áreas de la piel, ambos considerados como biomarcadores para determinadas patofisiologías [65, 131, 132, 66]. En cuanto a las aplicaciones de la imagenología por termografía infrarroja digital en la dermatología, esta se ha utilizado para analizar y clasificar el patrón térmico de tumores cancerígenos [133, 134], profundidad de quemaduras [135], pie diabético [136] y psoriasis [137]. La principal ventaja de la imagenología por termografía infrarroja digital es el hecho de que no se requiere un contacto directo con el cuerpo humano, a diferencia de la espectroscopía Raman o de reflectancia difusa, donde la interacción luz/tejido se lleva a cabo por medio de una sonda, la cuál sirve como fuente de conducción para la fuente de iluminación. De esta forma, las mediciones de termografía infrarroja pueden realizarse, si la aplicación lo permite, a metros de distancia del paciente, garantizando así la integridad y seguridad del paciente. Ahora, al utilizar la temperatura como biomarcador, la principal desventaja de la imagenología por infrarroja digital radica en la alta variabilidad que existe entre las mediciones, que recurrentemente

resulta en resultados erróneos o poco precisos. Por lo tanto, es importante mencionar que las mediciones de termografía infrarroja deben de llevarse a cabo en un ambiente aislado, sin interferencias de iluminación o térmicas, preferentemente con un ambiente controlado y con el equipo de imagenología calibrado correctamente (Figura 1.13).

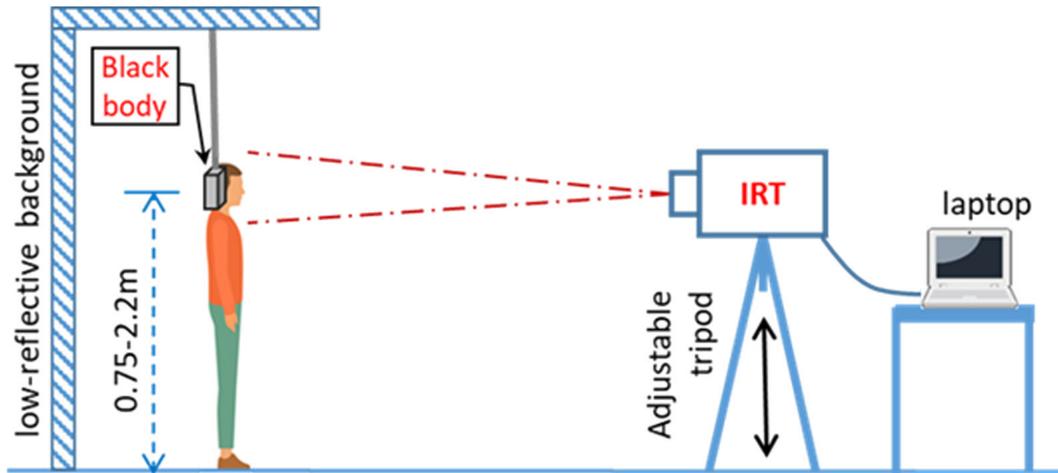


Figura 1.13: Entorno de mediciones de imagenología por termografía infrarroja digital para aplicaciones biomédicas [66].

Capítulo 2

Dermatosis Mas Comunes - Diagnóstico y Tratamiento

2.1. Dermatosis Mas Comunes

Las *Enfermedades de la Piel* son el conjunto de todas aquellas manifestaciones anormales que están presentes en la piel y todos sus componentes. Tanto la prevalencia como la severidad de las enfermedades varia de acuerdo a sus diferentes manifestaciones en los pacientes. Aunque no se pueden considerar mortales, a excepción del cáncer de piel, una enfermedad de la piel puede ser el disparador para el desarrollo de enfermedades mas peligrosas. Este tipo de enfermedades afectan a aproximadamente un tercio de la población mundial, específicamente son el 4to tipo de enfermedades mas comunes a nivel global. Las enfermedades de la piel se manifiestan en los individuos independientemente de su edad, genero, etnicidad, etc. Se ha estimado que todos los individuos han experimentado la manifestación de una enfermedad en la piel, así como haberse sometido a algún tratamiento para erradicarla, por lo menos una vez en la vida [138, 139, 140].

Una *Dermatosis* es un tipo de manifestación superficial de una enfermedad en la piel la cual también puede observarse en la superficie de las uñas y del cabello. La principal característica de una dermatosis es que su manifestación no incluye características inflamatorias, a diferencia de una *Dermatitis*. Las causas de las dermatosis son variables, como por ejemplo, respuestas del sistema autoinmune, la presencia de bacterias y hongos, contaminación ambiental, presencia de virus, o bien, factores genéticos. Aunque en épocas recientes las causas de las dermatosis han sido bien caracterizadas para su estudio, muchas de ellas aun permanecen siendo desconocidas para el personal dermatológico, haciendo complejo el diagnóstico y el subsecuente tratamiento. Como se menciona en el capítulo 1, la biopsia es el estándar de oro para el diagnóstico de las enfermedades de la piel, y una vez que se tiene información específica es posible someter la lesión a un tratamiento, el cuál va a ser variable dependiendo de las características de la lesión.

De acuerdo a los reportes de la Carga Mundial de la Enfermedad (GBD, por sus siglas en inglés, *Global Burden Disease*), hasta el año 2019 las 3 enfermedades de la piel mas investigadas eran la dermatitis (38%), el acné (29%) y en igual proporción la psoriasis y la urticaria (19%) utilizando una escala de medición conocida como *DALY* (Años de Vida Ajustados por una Discapacidad, por sus siglas en inglés, *Disability-Adjusted Life Years*), la cuál cuantifica el número de muertes debido a una enfermedad con los años que se vive con dicha enfermedad. En la Figura 2.1 se observan el reporte de la GDB en un lapso de tiempo de 2015-2020. El Melanoma, al ser de las enfermedades de la piel mas peligrosas, tuvo un mayor porcentaje en cuanto a las publicaciones realizadas (1995 publicaciones) en este lapso de tiempo, seguida por la psoriasis (1936 publicaciones) y posteriormente por la dermatitis (1927 publicaciones). El acné, a pesar de ser la enfermedad infecciosa de la piel mas común, tuvo un porcentaje menor en la literatura (477 publicaciones), debido a que se puede considerar una enfermedad mas controlable. Es importante mencionar que dicho reporte se realizó utilizando referencias exclusivamente del área médica, sin contar con referencias en el área de la óptica biomédica o ingeniería biomédica.

Skin disease search term	Global burden of skin disease rank	Rank by percentage of total publications	Percentage of global burden of disease (measured in disability-adjusted life years) ^b	Proportion of global burden of skin disease measured in disability-adjusted life years, fraction (%) ^c	Publications in 2015-2020 (N=19,727), n (%)	Percentage of total publications/Percentage of global burden of skin disease
Dermatitis	1	3	0.38	0.38/1.70 (22.35)	1927 (9.77)	0.44
Acne	2	4	0.29	0.29/1.70 (17.06)	477 (2.42)	0.14
Psoriasis	3	2	0.19	0.19/1.70 (11.18)	1936 (9.81)	0.88
Urticaria ^d	3	7	0.19	0.19/1.70 (11.18)	139 (0.70)	0.06
Viral skin disease	5	5	0.16	0.16/1.70 (9.41)	283 (1.38)	0.15
Fungal skin disease	6	6	0.15	0.15/1.70 (8.82)	193 (0.98)	0.11
Scabies	7	10	0.07	0.07/1.70 (4.12)	54 (0.27)	0.07
Melanoma	8	1	0.06	0.06/1.70 (3.53)	1995 (10.11)	2.86
Pyoderma	9	8	0.05	0.05/1.70 (2.94)	124 (0.63)	0.21
Cellulitis	10	9	0.04	0.04/1.70 (2.35)	81 (0.41)	0.17
All other skin and subcutaneous diseases	N/A ^e	N/A	0.12	0.12/1.70 (7.00)	N/A	N/A

Figura 2.1: Reporte de la GBD para las enfermedades de la piel de acuerdo a el número de publicaciones realizadas durante 2015-2020.

Alternativamente, la carga de las enfermedades de la piel reportada por la GBD se representa como histograma en la Figura 2.2, en donde se observa un patrón similar por año en la mayoría de las enfermedades analizadas, a excepción del acné y la sarna (conocida como *Scabies*), que presentaron un incremento durante 2019, y la pioderma, que presento un incremento durante 2018.

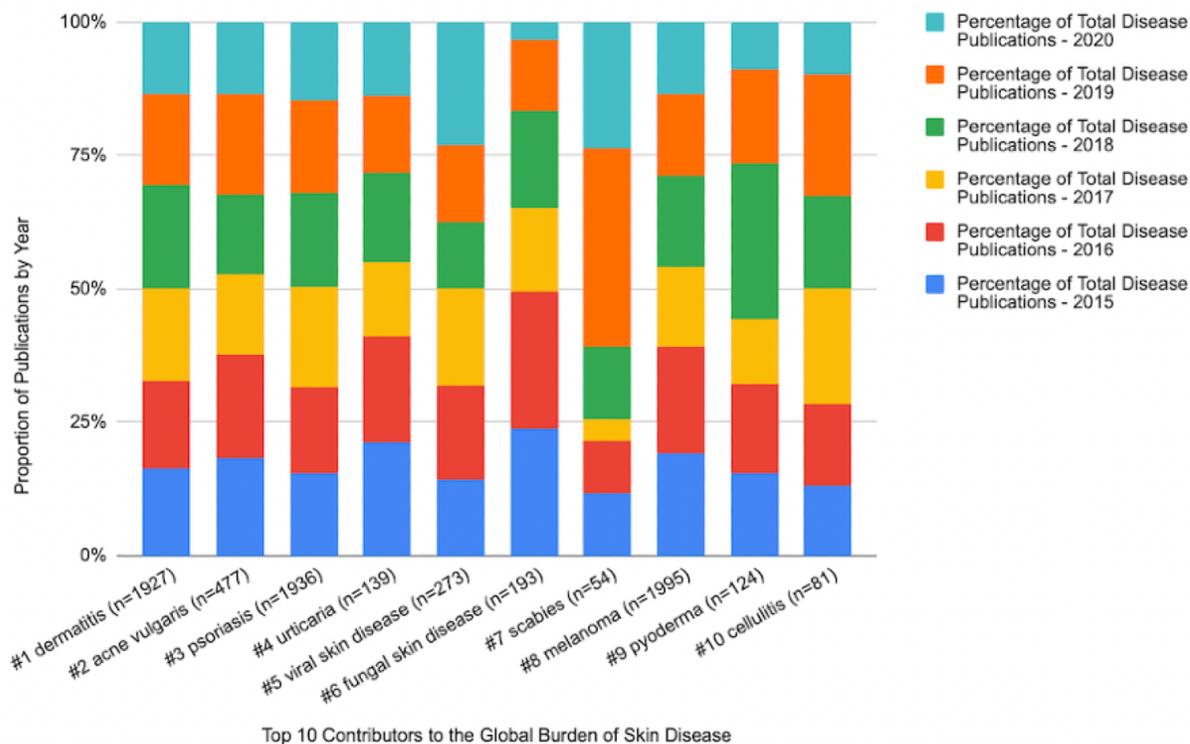


Figura 2.2: Representación Gráfica del Reporte de la GBD para las enfermedades de la piel de acuerdo a el número de publicaciones realizadas durante 2015-2020.

Vale la pena mencionar que los estudios tomados como referencia son anteriores al 2020 debido a la situación mundial de la pandemia originada por el virus SARS-Cov-19, conocida como COVID-19, lo cuál implico realizar cambios drásticos en todos los aspectos de la vida diaria. En un estudio reportado por Kutlu y Metin [141] se analizó el impacto de la pandemia en las visitas al dermatologo, observándose una considerable variación en la presencia de las enfermedades de la piel, la cuál puede utilizarse como trabajo a futuro [142, 143, 144, 145, 146, 147, 148]. De forma similar, en un estudio a gran escala reportado por Tizek et Al. [149], se encontró una variación en el porcentaje de de las enfermedades de la piel mas comunes, siendo la *Queratosis Actínica* aquella con mayor porcentaje (64.5%), seguida por la rosácea (25.5%), eczema (11.6%), acné (5.7%), carcinoma (3.1%) y la psoriasis (1.2%) (Figura 2.3). El estudio se construyó utilizando un cuestionario acerca de las características demográficas de cada individuo participante, para finalmente ser valorados por personal dermatológico. Aquellos individuos con conocimiento o diagnóstico previo de alguna enfermedad de la piel fueron atendidos de forma mas detallada por un grupo especializado de dermatólogos, el cuál se centro en diferentes zonas de la cabeza, el cuello y las extremidades, así como aquellas zonas que se encontraban expuestas a la radiación UV. Información como la profesión y antecedentes familiares es de gran importancia para los estudios de las enfermedades de la piel.

	All skin diseases (64.5%, n = 1662) n (%)	AK (26.6%, n = 685) n (%)	KC (3.1%, n = 79) n (%)	Rosacea (25.5%, n = 657) n (%)	Eczema (11.6%, n = 298) n (%)	Psoriasis (1.2%, n = 30) n (%)	Acne (5.7%, n = 148) n (%)
Age group							
18–39 years (n = 531)	249 (46.9)	10 (1.9)	2 (0.4)	43 (8.1)	51 (9.6)	1 (0.2)	126 (23.7)
40–49 years (n = 383)	221 (57.7)	50 (13.1)	5 (1.3)	94 (24.5)	58 (15.1)	7 (1.8)	13 (3.4)
50–59 years (n = 718)	475 (66.2)	177 (24.7)	17 (2.4)	209 (29.1)	97 (13.5)	11 (1.5)	7 (1.0)
60–69 years (n = 661)	492 (74.4)	276 (41.8)	36 (5.4)	223 (33.7)	70 (10.6)	8 (1.2)	2 (0.3)
70 years + (n = 225)	187 (83.1)	147 (65.3)	15 (6.7)	74 (32.9)	18 (8.0)	2 (0.9)	0 (0.0)
Missing (n = 59)	38 (64.4)	25 (42.4)	4 (6.8)	14 (23.7)	4 (6.8)	1 (1.7)	0 (0.0)
Sex							
Women (n = 1376)	798 (58.0)	198 (14.4)	26 (1.9)	356 (25.9)	116 (8.4)	21 (1.5)	108 (7.8)
Men (n = 1193)	863 (72.3)	487 (40.8)	52 (4.4)	301 (25.2)	182 (15.3)	9 (0.8)	40 (3.4)
Missing (n = 8)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Profession							
Farmers (n = 1379)	945 (68.5)	439 (31.8)	50 (3.6)	414 (30.0)	202 (14.6)	13 (0.9)	39 (2.8)
Other outdoor workers (n = 169)	118 (69.8)	49 (29.0)	6 (3.6)	40 (23.7)	23 (13.6)	1 (0.6)	9 (5.3)
Indoor workers (n = 972)	543 (57.2)	160 (16.9)	18 (1.9)	184 (19.4)	68 (7.2)	16 (1.7)	100 (10.5)
Missing (n = 80)	56 (70.0)	37 (46.3)	5 (6.3)	19 (23.8)	8 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Figura 2.3: Incidencia de Enfermedades de la Piel durante 2019 [149].

En el resultado de este estudio se observó que la presencia de eczema fue constante en los diferentes grupos analizados, separados principalmente por la edad, mientras que la presencia del acné esta mas presente en los individuos cuya edad esta entre los 18 y 50 años. Es esta enfermedad una de las cuáles se estudiara a profundidad utilizando métodos ópticos para su monitoreo, y que se vendrá desarrollando a lo largo de esta tesis. También se observó que la presencia de la psoriasis y el carcinoma, es mas latente en los individuos de mayor edad. Por otro lado, la presencia de la rosácea, que frecuentemente es pasada por alto, esta mas pronunciada en las mujeres cuya edad es mayor a los 50 años. Esta enfermedad también se analizará utilizando técnicas ópticas a lo largo de esta tesis. Otro resultado de este estudio fue la observación de que aproximadamente el 70% de los pacientes que sufren una enfermedad de la piel se someten a tratamientos sin acudir a valoración médica, debido a que las enfermedades con mayor presencia no requieren de una hospitalización, lo que puede desencadenar el riesgo de desarrollar infecciones o bien, efectos adversos a los tratamientos por los cuales se optó. Aunque se observan resultados diferentes en ambos trabajos tomados como referencia, el estudio tomado en una gran cantidad de individuos realizado por Tizek et Al. [138] dio como resultado una estimación mas realista en un conjunto de individuos con la misma etnicidad, el cuál puede ser implementado en regiones diferentes para poder realizar inferencias sobre la presencia de las enfermedades de la piel en una determinada zona. Estos trabajos se utilizaron como referencia para estudiar diferentes enfermedades con técnicas ópticas de forma no-invasiva para un diagnóstico temprano o bien para un tratamiento individualizado.

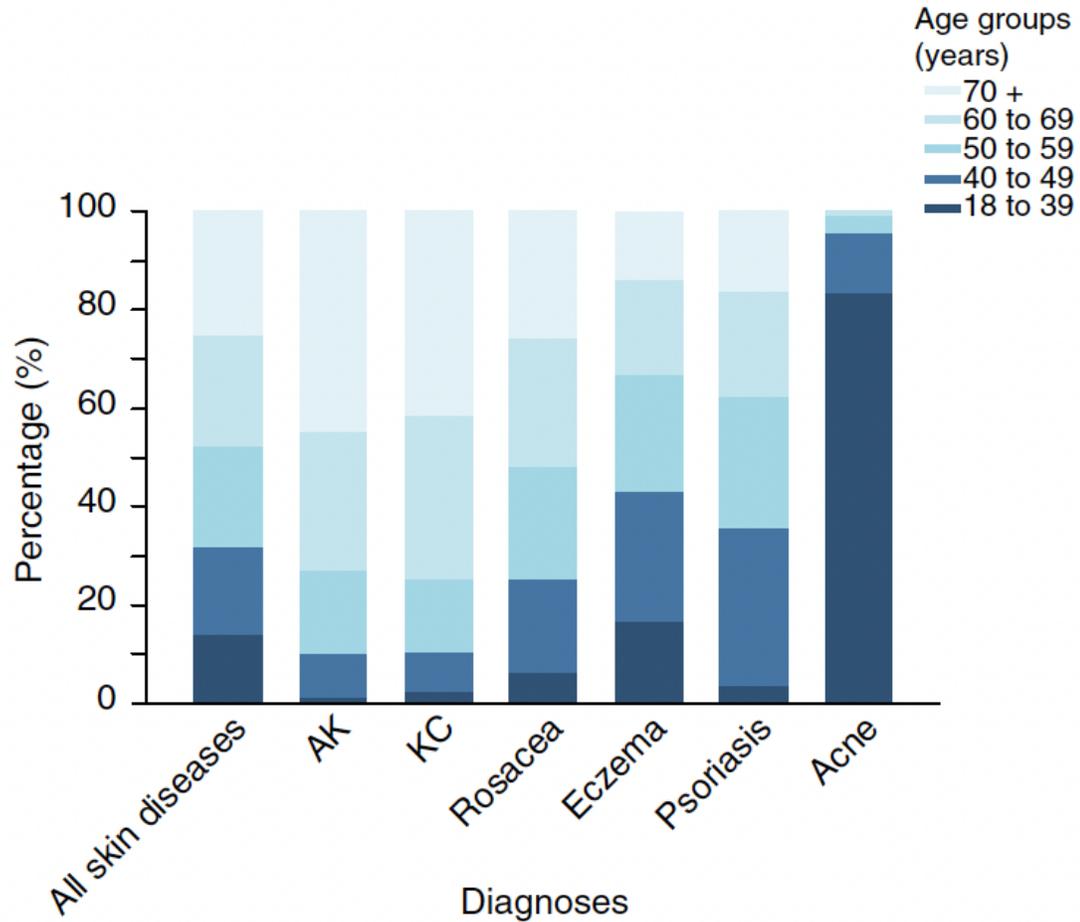


Figura 2.4: Incidencia de Enfermedades de la Piel durante 2019 [149].

2.2. Transtornos de la Pigmentación

La *Pigmentación* de la piel ha sido utilizada, aunque de forma subjetiva, como herramienta de detección y diagnóstico de enfermedades [87]. Con el creciente desarrollo de aplicaciones de la óptica biomédica, la subjetividad de la pigmentación de la piel ha ido reduciendo, a favor del desarrollo de técnicas más robustas y precisas que permiten extraer información relevante acerca del estado de la piel. Entre los estudios que se pueden realizar a partir de la cuantificación de la pigmentación de la piel se puede mencionar la determinación del fototipo [60, 150], las dimensiones de las venas [151], la concentración de hemoglobina y melanina, saturación de oxígeno en la sangre [152], el proceso de cicatrización de heridas [153], etc. La pigmentación de la piel está determinada por una variedad de factores, en donde se incluyen la melanina, la hemoglobina, los carotenoides y colágeno [154].

La *Melanina* en específico, es un cromóforo producido por células llamadas *Melanocitos*, que se encuentran embebidas en organelos conocidos como *Melanomas*. Los trastornos de la pigmentación son anomalías producidas por el número y tamaño de los melanomas, resultado de anomalías en la formación de los melanocitos durante el proceso de embriogénesis, que incluye la presencia de hiper pigmentación é hipo pigmentación [155, 156, 157].

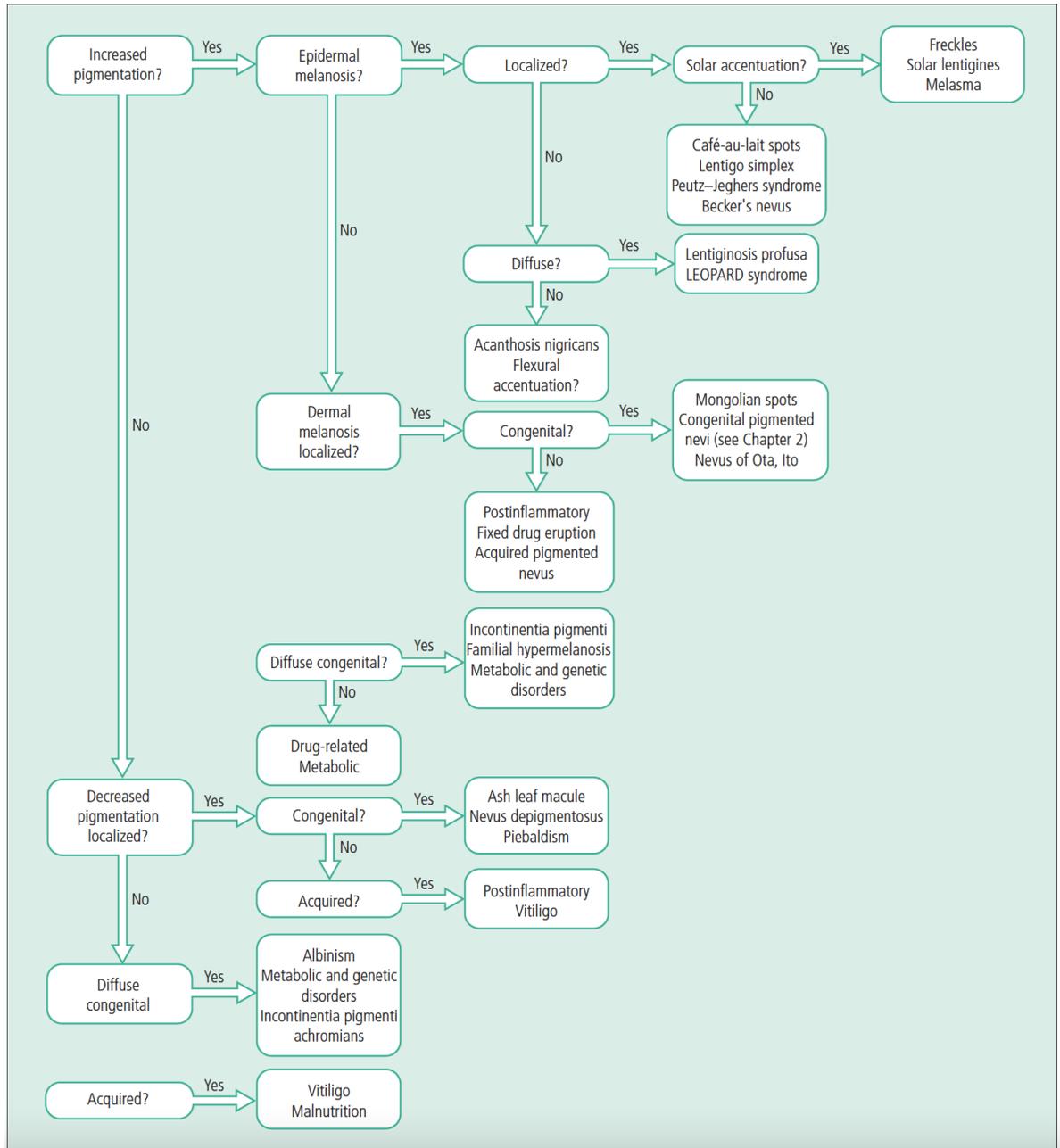


Figura 2.5: Metodología estándar para evaluar los trastornos de la pigmentación [158].

La *Hiperpigmentación* es ocasionada por una elevada producción de melanina, producto de una actividad anormal de la actividad de los melanocitos [155]. También es atribuida a la exposición a la radiación ultra-violeta (UV) [157] y recientemente a la exposición a la radiación visible y a la vascularización ocasionada por la radiación infrarroja [159, 160]. Entre las enfermedades relacionadas con la hiperpigmentación están la melasma [161], la melanosis de Riehl [162], la eritromelanosis folicular [163], eritema dyschromicum [164], poikiloderma de Civatte [165], dermatitis foto-tóxica [166], etc. Físicamente, una hiperpigmentación se observa como una superficie oscura sólida en la piel, cuyo tamaño y forma pueden variar (Figura 2.6).



Figura 2.6: Ejemplo de una lesión con hiperpigmentación, donde se observa un oscurecimiento notable debido a niveles altos de melanina [167].

La *Hipopigmentación* esta caracterizada por un decremento en la presencia de los melanocitos y melanomas ó por alteraciones en el proceso de transferencia de los melanomas a queratinocito [155]. Las enfermedades relacionadas son el vitíligo [168], la hipo melanosis post-inflamatoria [169], pitiriasis alba [170], piebaldismo [171], etc. Aunque en su mayoría, las lesiones relacionadas con la hipopigmentación son benignas y asintomáticas, un descuido en una lesión de hipopigmentación puede resultar en graves consecuencias a nivel psicológico y cosmético, así como económico y social en los pacientes que la padecen [172]. Físicamente, una lesión con hipopigmentación es mas clara que el resto de la superficie de la piel, y de igual forma que las lesiones de hiperpigmentación, su tamaño y distribución varia de paciente a paciente.



Figura 2.7: Ejemplo de una lesion con hipopigmentación, caracterizada por su tonalidad clara de forma anormal, indicando un decremento en la presencia de la melanina [167].

Las lesiones de hiperpigmentación pueden manifestarse por factores hereditarios o externos, que a menudo se presentan durante la niñez, como por ejemplo la prolongada exposición a la radiación solar, quemaduras, exposición a algún químico, etc. [158]. Típicamente el tratamiento para las enfermedades relacionadas con la hiperpigmentación está basado en sustancias tópicas como retinoides ácido azelaico o

hidroquinona, la cuál es considerada como el estándar de oro para el tratamiento y manejo de melasma. Además, el uso de bloqueadores solares con alto contenido en dióxido de titanio y oxido de zinc es recomendable así como disminuir el tiempo de exposición a la radiación UV [173]. En estudios recientes se han propuesto el uso de terapias basadas en la luz, como la cirugía láser, para el tratamiento de lesiones relacionadas con la hiperpigmentación, principalmente aquellas que son producto de enfermedades inflamatorias, como el acné o el eczema, conocidas como *Hiperpigmentación Post-Inflamatoria* [169]. Por otro lado, los tratamientos utilizados para las lesiones relacionadas con la hipopigmentación son la cirugía láser [174], la crioterapia [175], peeling [176] y los tratamientos tópicos [176].

2.3. Acné

El *Acné* es las enfermedad de la piel mas común en el mundo [177, 178]. La prevalencia del acné varia dependiendo del país o de la edad del paciente, en un rango de 35 – 100% principalmente en la adolescencia y en un 9.38% a nivel global [178, 179, 180, 181, 182, 183]. Aunque su origen no tiene un patrón característico, la principal característica crónicas/inflamatoria de las enfermedades que se presenta en la unidad pilo sebácea durante la pubertad y a menudo en la edad adulta (Figura 2.8).



Figura 2.8: Presencia del Acné [183].

La fisiopatología del acné implica complejos procesos dentro de la unidad pilo sebácea que dan como resultado un cambio en el microambiente cutáneo que posteriormente conduce a reacciones inflamatorias [184, 185, 186]: h́iper seborrea [187], queratinizaci3n folicular anormal (H́iper-queratinizaci3n) [188], incremento en la presencia de la bacteria *Propionibacterium Acn3s* (*P.acnes*) [189], influencia hormonal [190], producci3n anormal de sebo [191], secreci3n de mediadores inflamatorios [192].

El acné se manifiesta principalmente en zonas donde existe una mayor presencia de f3liculos capilares, y por lo tanto, mayor presencia gl3ndulas seb3ceas. Entre estas zonas se pueden mencionar la superficie facial, la parte superior del torso (pecho), la espalda y la parte superior de los brazos [193]. Aunque la enfermedad presenta patrones muy espec3ficos, existen diferentes manifestaciones del acné, a partir de las cuales la enfermedad puede ser clasificada de acuerdo al tipo de lesi3n que se presente, siendo el *Acné Vulgaris* el tipo mas com3n del acné ya que muestra el 99% de prevalencia [194]. Los *F3liculos Capilares* son ductos que se encuentran en la superficie de la epidermis, y es en ellos donde se presenta el generaci3n de cabello. Alrededor de los f3liculos capilares est3n localizadas las *Gl3ndulas Seb3ceas*, las cu3les producen una sustancia de consistencia grasosa/aceitosa conocida como *Sebo*, la cu3l es excretada a la superficie de la piel por medio del f3liculo capilar sirviendo como protector y humectante para la piel y el cabello (Figura 2.9).

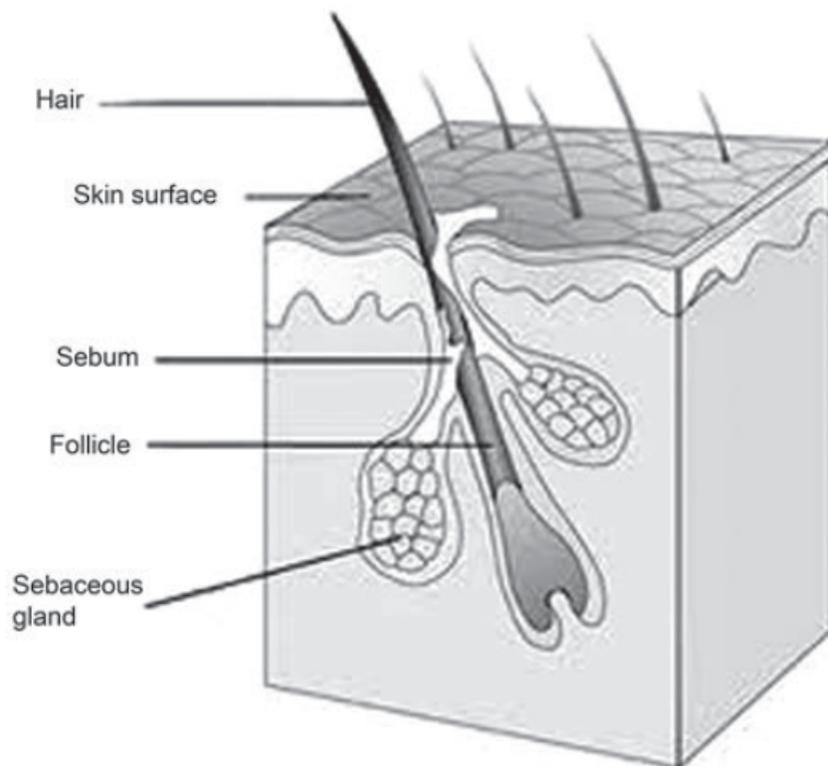


Figura 2.9: Folículos capilares y las glándulas sebáceas dentro de la piel [194].

La manifestación del acné ocurre cuando los folículos capilares se bloquean debido a la hiperqueratinización formando una lesión conocida como *Micro-comedón* [195], la cuál ocasiona que el sebo y la queratina queden estancados dentro de los poros de la piel dando como resultado una hinchazón, inflamación e inclusive una irritación de la piel. A medida que el folículo capilar continua bloqueado, el micro-comedón se expande debajo de una apertura folicular donde visiblemente es posible clasificarlo como cerrado o abierto [196] (Figura 2.10). Estas reacciones inflamatorias son resultado de un incremento en la presencia de *Propionibacterium Acnés* (*P. acnés*), la cuál es la bacteria predominante en la manifestación del acné y que se presenta como una defensa contra el sebo acumulado [194, 196]. Otros factores que estimulan la aparición del acné son las hormonas, en especial la *Di-hidrotestosterona* y el *Estrógeno* [197].

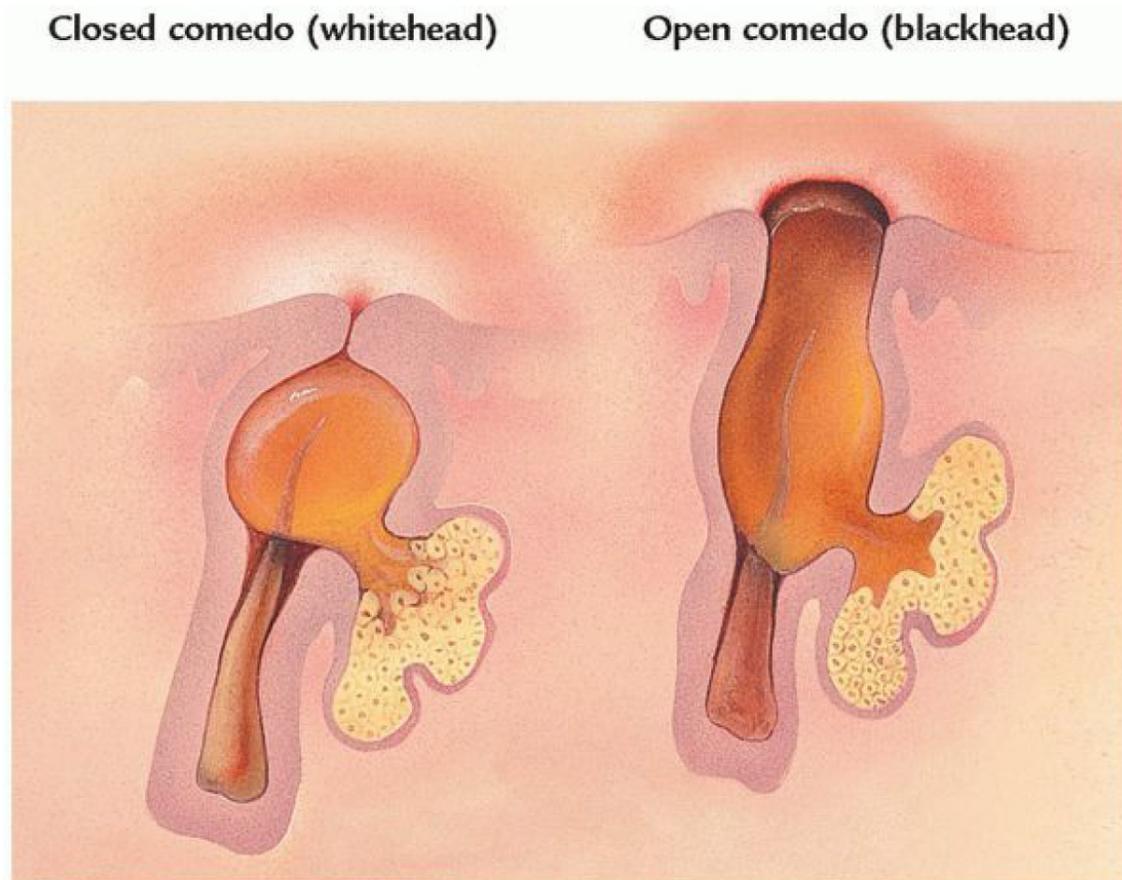


Figura 2.10: Micro-comedón cerrado: Superficie inflamada fija (*Pápula*) de color amarillo/blanco también conocida como *Punto Blanco*. Esta lesión se considera como la precursora de todas las lesiones inflamatorias relacionadas con el acné. Micro-comedón abierto: Apertura en la piel ocasionada por la hiper-queratinización, esta lesión es comúnmente conocida como *Punto Negro*. Figura adaptada de [198]

2.4. Rosácea

La *Rosácea* es una enfermedad de la piel con características inflamatorias, entre las cuales se pueden mencionar la irritación de la piel, pústulas, vasos sanguíneos anormales y enrojecimiento notable en la superficie facial, principalmente en las mejillas, la frente y la nariz, lo cual puede resultar en trastornos psicológicos en el paciente, como estrés o ansiedad. Aunque se han considerado la desregulación neurovascular o alteraciones inmunológicas, la fisiopatología de la rosácea no ha sido totalmente determinada, a diferencia de otras enfermedades de la piel como el acné [199, 200]. Factores como la presencia del ácaro *Demodex* [201, 202, 203], exposición a la radiación UV [204] [205] han sido estudiados como posibles disparadores para el desarrollo de la enfermedad. La principal limitante para el diagnóstico de rosácea es que la biopsia no es específica, de esta forma la necesidad de implementar técnicas no-invasivas basadas en la luz es crucial para el estudio de la rosácea [205, 206, 207]. El estándar de oro para el diagnóstico y manejo de la rosácea es el criterio de clasificación establecido por la Sociedad Nacional de Rosácea donde se proponen 4 tipos de manifestaciones [208, 209] (Figura 2.11) y recientemente de acuerdo al fenotipo [205].

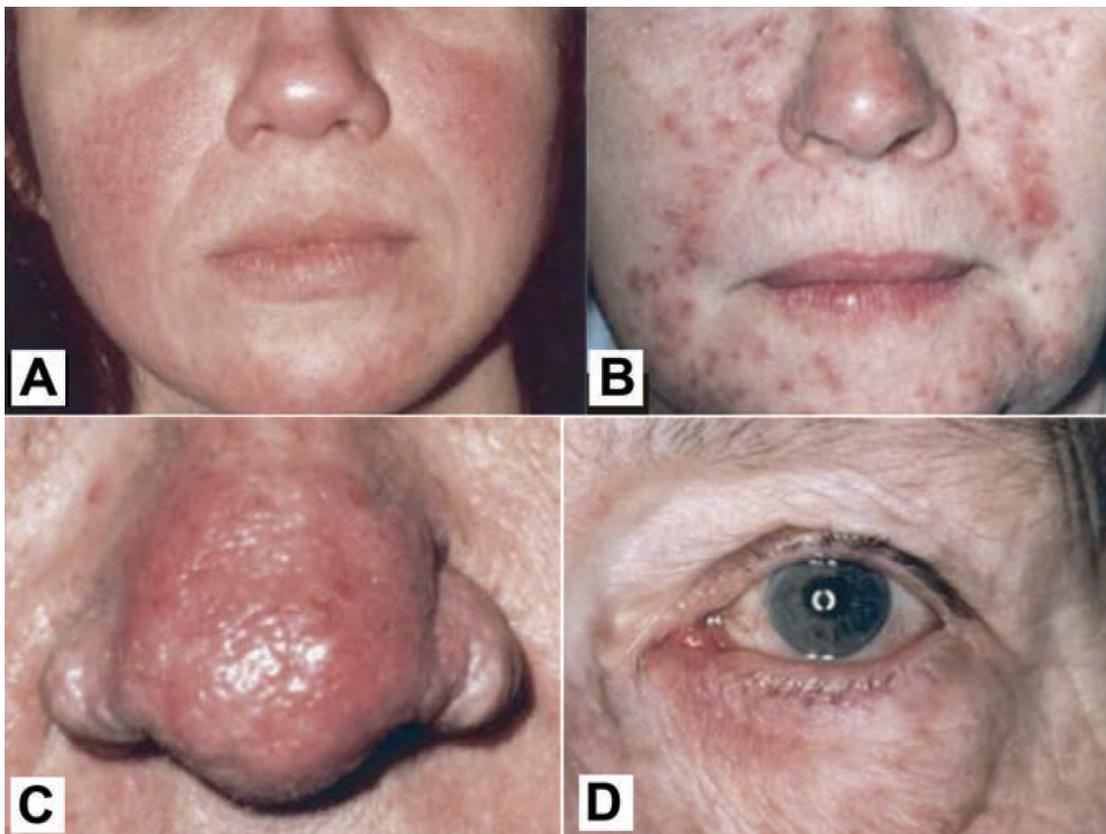


Figura 2.11: Clasificación de los sub-tipos de rosácea: (A) Eritematotelangiectatics (B) Papulopustular (C) Fimatosa y (D) Ocular[209].

2.5. Otros

Además de las dermatosis relacionadas con los trastornos de la pigmentación, la piel puede presentar múltiples enfermedades originadas por diferentes causas internas o externas. Al ser el tejido humano más externo al medio ambiente, la valoración de las erupciones en la piel se utiliza para determinar si existe o no alguna enfermedad. Es importante recalcar que la valoración visual de las zonas con las erupciones no es suficiente y que es necesario monitorear toda la piel para poder proporcionar un diagnóstico adecuado y posteriormente aplicar un tratamiento de forma efectiva. Para realizar el diagnóstico de enfermedades de la piel es necesario realizar una valoración del historial médico del paciente, antecedentes familiares, etc. Las erupciones de la piel se deben clasificar de acuerdo a su pigmentación, morfología, áreas cercanas, ubicación de la lesión y como es la distribución de las erupciones en ella [210].

Capítulo 3

Espectroscopía Raman de la Piel

3.1. Anatomía y Fisiología de la Piel

La *Piel* es el órgano mas grande del cuerpo humano, ocupa aproximadamente el 16% del peso total del cuerpo humano y cubre un área de aproximadamente $2m^2$ en un adulto. Su principal función es cubrir y proteger los órganos internos. De forma anatómica, la piel se compone de dos capas: la *Dermis* y la *Epidermis* [211, 106, 212]:

- *Epidermis*. Es un tejido epitelial compuesto por capas de células epiteliales, conocido como *Epitelio Estratificado*. Su grosor esta en un rango de $40 - 150\mu m$. Su función principal es producir el Estrato Corneo (SC por sus siglas en inglés, *Stratum Corneum*), que es la capa mas externa de la piel. Esta capa esta conformada por células cornificadas, que sirven como protección para pérdidas de agua, así como infecciones ocasionadas por la presencia de microbios o la exposición a sustancias tóxicas.
- *Dermis*. Es un tejido conectivo fibroelástico, responsable de la elasticidad de la piel. Su grosor esta en un rango de $1 - 4mm$. Dentro de su estructura se encuentran nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, folículos, músculos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Es en esta capa donde se encuentran proteínas como el colágeno y la elastina, que están directamente relacionadas con la elasticidad y la resistencia de la piel. Aproximadamente el 90% de la dermis esta conformada por colágeno, que es la proteína estructural de mayor proporción, y se encuentra distribuida en la piel en diferentes tipos: el 80% es de tipo 1, el 15% de tipo 3 y un 15% es de tipo 4, 5 y 6.

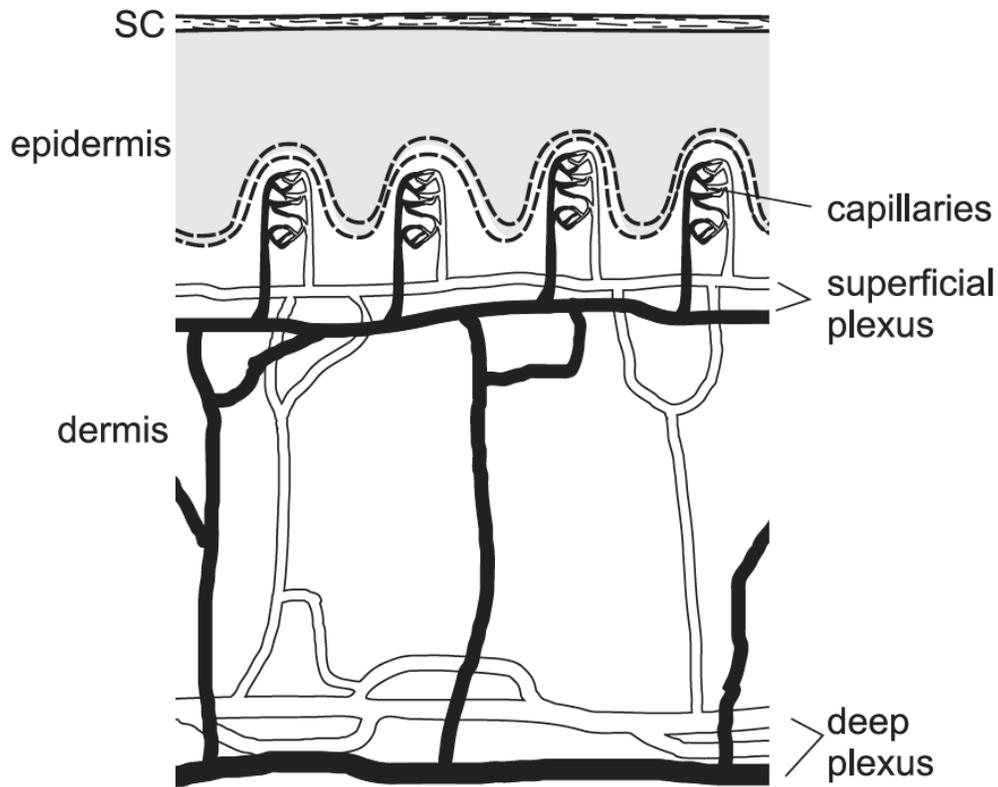


Figura 3.1: Anatomía de la piel: epidermis y dermis. Figura adaptada de [106].

3.2. Espectroscopía Raman de la Piel

El primer espectro Raman de la piel fue reportado en 1992 por B.W. Barry, donde se propuso la espectroscopía Raman como una herramienta complementaria a la espectroscopía infrarroja para el estudio y análisis de enfermedades de la piel [213]. Actualmente se tiene reportado un registro con las bandas características del espectro Raman de la piel (Tabla 3.1), y se ha propuesto que cualquier variación en intensidad, forma y corrimientos sean considerado como un biomarcador [214]. Es importante mencionar que dicho registro debe utilizarse como referencia, ya que las mediciones de espectroscopía Raman pueden variar dependiendo de las especificaciones del equipo utilizado para realizar la medición (longitud de onda, resolución, etc.), de la condición del paciente y las técnicas de procesado y análisis de datos espectroscópicos. Por lo tanto, es importante realizar siempre mediciones de prueba sobre piel sana, es decir, sin ninguna manifestación de alguna enfermedad. Para aplicaciones biomédicas de la espectroscopía Raman es común realizar esta medición en la zona del antebrazo o la parte interna superior del brazo, mientras que para las aplicaciones mas comunes de la técnica, como la caracterización de materiales se utiliza una muestra de silicio.

Raman-Shift (cm^{-1})	Asignación	Componente
936	C-C (Estiramiento de Prolina-Valina-Backbone)	Queratina
940	C-C (Estiramiento de Backbone)	Colágeno-Elastina
1003	C-C (Vibración de Fenilo)	Colágeno-Elastina-Queratina
1063	C-C (Estiramiento Asimétrico de Lípidos)	Ceramida
1080	C-C (Estiramiento Esquelético en Lípidos)	Trioleína
1093	O-P-O (Vibración de Estiramiento Simétrico de ADN-Backbone)	Núcleo
1128	C-C (Estiramiento Esquelético Simétrico)	Ceramida
1248	Amida-III (Lámina- β y conformación de Bobina Aleatoria)	Colágeno-Elastina
1254	Lámina- β / Thymina/Citosina (Base ADN/ARN)	Núcleo
1269	Amida-III (Hélice- α), Estiramiento C-N, Doblaje N-H	Colágeno-Elastina-Queratina
1301	Modos C-H (CH_2) de lípidos, Bandas CH_2/CH_3	Trioleína
1336	Amida-III, Estiramiento C-N y N-H	Elastina
1337	Adenina, Guanina (Base ADN\RNA)	Núcleo
1378	Estiramiento Lineal del Enlace C-C bonds dentro de los anillos	Melanina
1440	Bandas CH_2/CH_3	Trioleína-Ceramida
1450	Estiramiento C-H de proteínas	Queratina
1454	Estiramiento C-H, Deformación Asimétrica C-H	Colágeno-Elastina
1573	Estiramiento de los Anillos Aromáticos	Melanina
1645	Modo vibracional O-H del Agua	Agua
1653	Modo de estiramiento C-O de la Amida-I	Queratina
1656	Lípidos C-C	Trioleína
1665	Vibración C-O de la Amida-I	Colágeno-Elastina

Tabla 3.1: Bandas Raman características de la piel [114].

La *Fluorescencia* es uno de los principales problemas que se presentan en las mediciones Raman de muestras biológicas. Este efecto es producido por la absorción de la radiación, principalmente por la radiación visible, interfiriendo considerablemente con el esparcimiento Raman. Además de la fluorescencia hay factores como el ruido provocado por los artefactos de movimiento, tanto del paciente como del personal médico, errores en la adquisición del equipo, además del ruido proveniente del detector y la resolución limitada del sistema de medición. Por lo tanto, antes de realizar el análisis de los espectros Raman es necesario contar con una etapa de pre-procesado, que incluya la substracción de la fluorescencia, filtrado y normalización de los espectros [215]. Aunque existen diversas técnicas para la substracción de fluorescencia en una señal Raman ya sea por técnicas experimentales como la espectroscopía Raman de excitación desplazada (SERDS, por sus siglas en inglés, *Shifted-Excitation Raman Spectroscopy*) [216, 217, 218], o bien, por técnicas computacionales como el ajuste polinomial, aproximación por derivadas, análisis por medio de las transformadas de Fourier o Wavelet, etc. para aplicaciones biomédicas, el algoritmo propuesto por Zhao et Al. 2007 [219], conocido como el Algoritmo Vancouver, es ampliamente utilizado debido a su alta precisión y simple manejo, por lo tanto fue utilizado en la etapa del pre-procesado de los análisis presentados en esta tesis. La substracción de fluorescencia de un epectro Raman proveniente de una muestra biológica durante la etapa del pre-procesado se observa en la Figura 3.2.

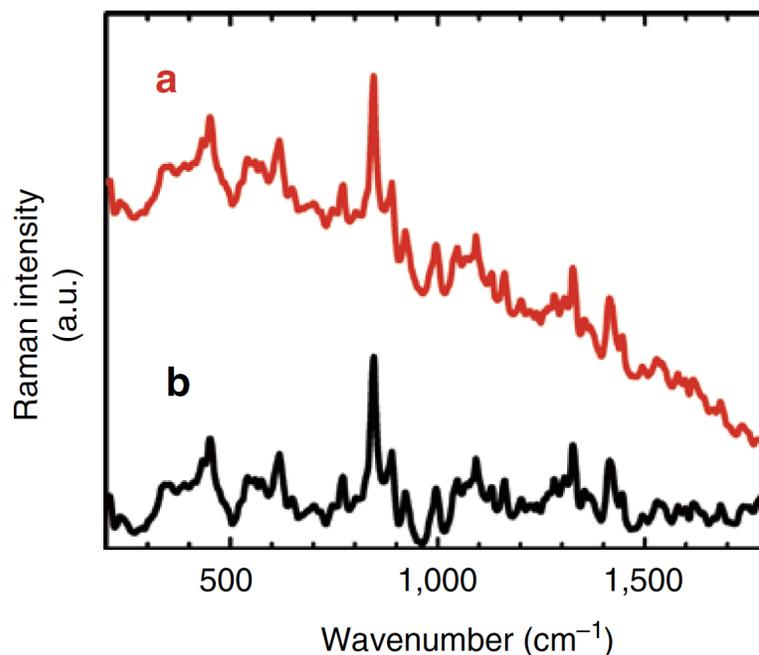


Figura 3.2: Espectro Raman de la glutamina (A) con fluorescencia y (B) sin fluorescencia [16]. Se puede apreciar como la señal de fluorescencia es ordenes de magnitud mayor que la señal Raman.

El filtrado es la etapa del pre-procesamiento de datos muy importante, ya que en ella se descartan las contribuciones ocasionales por diferentes fuentes de ruido, como pueden ser el ruido térmico, la interferencia de rayos cósmicos, efectos de ruido blanco, ruido del detector ó bien por efectos de error en la adquisición y muestreo. Como herramienta de filtrado, en esta tesis se utilizó el filtro digital Savitzky-Golay donde a partir de un polinomio generado por un conjunto de puntos de datos basado en el método de los mínimos cuadrados [220, 221, 222]. Finalmente, debido a la aleatoriedad de las intensidades observadas en un espectro Raman, es muy importante incluir una normalización de datos, es decir, restringir todos los valores de las intensidades a un rango específico. Como métodos de normalización se pueden mencionar el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés *Area Under Curve*), o la normalización tomando como referencia alguna banda característica, como bien puede ser la del Metileno (1440cm^{-1} aproximadamente) o la de la Amida-III (1660cm^{-1} aproximadamente) [215]. Es importante mencionar que en este último método de normalización se asume que la banda tomada como referencia es invariante, es decir, esta presente en todas las mediciones, por lo tanto, su uso está más restringido que el método AUC. En el presente trabajo se utilizó el método de normalización por AUC para los espectros Raman y de reflectancia difusa.

Dentro del espectro Raman se encuentra la región baja conocida como *Fingerprint Region*, la cual va de los $200 - 2000\text{cm}^{-1}$. Es en esta región donde las bandas obtenidas pueden ser asignadas a diferentes moléculas de acuerdo a sus vibraciones. Para muestras biológicas, la región baja se considera en $800 - 1800\text{cm}^{-1}$. Por otro lado existe la región alta, cuyos números de onda son $> 2000\text{cm}^{-1}$, donde es posible caracterizar muestras orgánicas que contengan pequeños átomos de hidrógeno. El estudio de las señales obtenidas en la región alta ha sido menos explorado, debido a la complejidad en la instrumentación requerida. Dentro de las aplicaciones biomédicas de la región alta están los estudios en la dermatología y odontología, aunque debido a la complejidad de la instrumentación requerida para obtener señales en este rango de números de onda, las aplicaciones son menores. Por lo tanto, es en la región baja donde se encuentran las bandas correspondientes a los componentes de las muestras biológicas y la selección de la región de interés va a depender de los parámetros y configuración del sistema Raman utilizado, como la longitud de onda utilizada como excitación, la resolución espectral, la relación señal a ruido, el grating y el tipo de detector utilizado [9, 223, 217, 224].

Finalmente, para el procesado y análisis de espectros se han venido utilizando técnicas de *Ciencia de Datos*, *Machine Learning* o *Deep Learning*. En secciones posteriores se profundizará en el procesado y análisis de espectros. En la Figura 3.3 se muestra el espectro Raman característico de la piel humana tomado de forma *in vivo* con una longitud de onda en el rango del NIR después de las etapas de pre-procesado y procesado. El espectro fue tomado en la superficie flexural del codo y muestra bandas reportadas por [114], como se muestran en la Tabla 3.1.

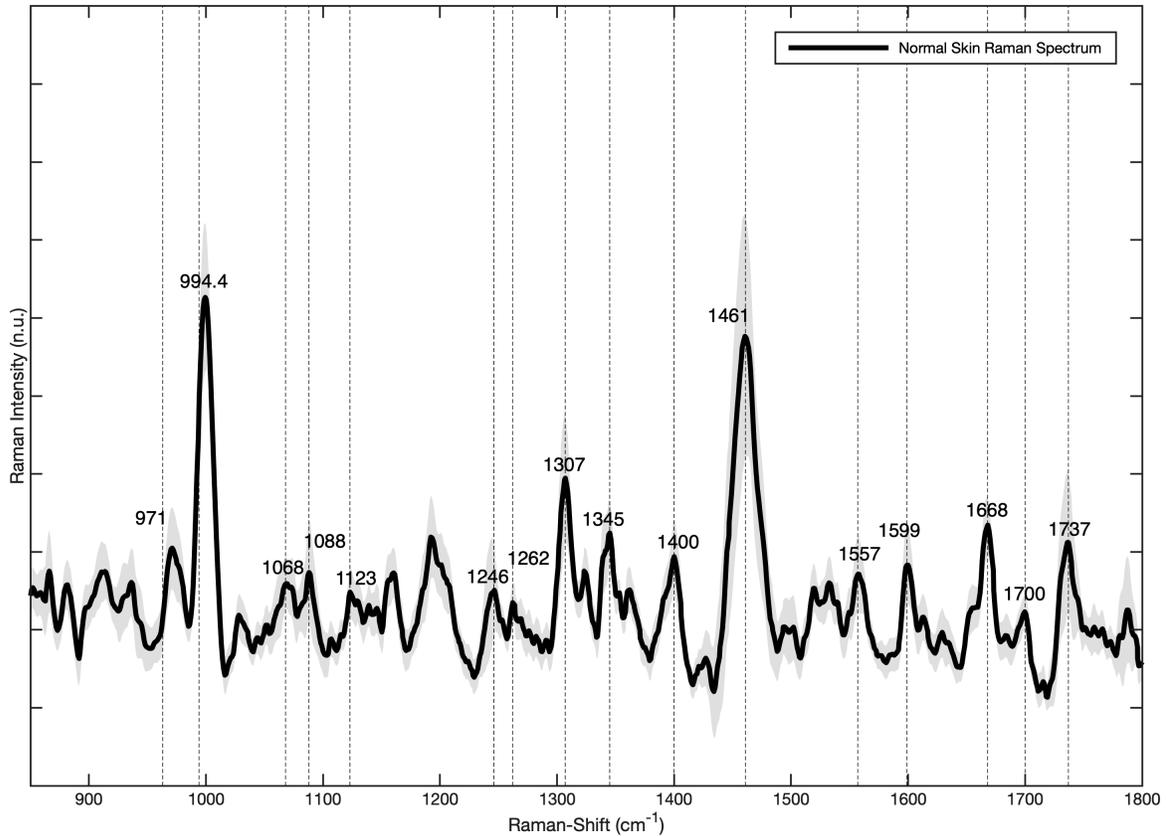


Figura 3.3: Espectro Raman de la piel.

3.3. Colágeno Tipo-I

El *Colágeno* es la proteína más abundante del cuerpo humano y está presente en los procesos de cicatrización de heridas, desarrollo de nuevos tejidos y regeneración de la piel [38]. Existen alrededor de 30 tipos de colágeno distribuidos en el cuerpo humano con variaciones en cada tejido [225]. El *Colágeno Tipo-I* (T1C) es el tipo de colágeno más abundante, aproximadamente del 80 – 85 % de la cantidad de colágeno en la piel humana es de tipo-I [223, 226]. El espectro Raman del T1C reportado por Nguyen et Al. 2012 [227] presenta bandas características que se pueden encontrar en la Tabla 3.1: 895 cm^{-1} , 940 cm^{-1} , 1001 cm^{-1} , 1356 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} .

3.4. Colágeno Tipo-III

El *Colágeno Tipo-III* (T3C) es una proteína perteneciente a la matriz extracelular, parte del grupo de colágenos fibrilares. Este tipo de colágeno cubre aproximadamente del 5 – 20 % de la presencia del

colágeno en la piel y es crucial para el desarrollo de la piel y de el sistema cardiovascular al mantener las propiedades fisiológicas de estos órganos [228, 229]. En la piel y el tejido conectivo, el colágeno tipo-III se encuentra co-localizado con el colágeno tipo-I, por lo que es parte del proceso de generación de fibrilos conocido como *Fibrilogénesis*. Además, las mutaciones en la presencia del colágeno tipo-III se consideran disparadores para el desarrollo de enfermedades como el *Síndrome de Ehlers–Danlos*, la cuál se caracteriza por afectar principalmente a la piel y a los vasos sanguíneos [228]. A diferencia que colágeno tipo-I, se ha demostrado que los efectos fotomecánicos de la cirugía láser induce a la síntesis de colágeno tipo-III [228].

3.5. Colágeno Tipo-IV

El *Colágeno Tipo-IV* (T4C) es el principal componente de la membrana basal [230], la cuál regula la actividad celular, modula la distribución de los tejidos y proporciona información acerca del microambiente externo a las células epiteliales. La principal contribución del colágeno tipo-IV es que actúa como una barrera entre los tejidos y que tiene interacción con las células, factores de crecimiento y con diferentes componentes de la misma membrana basal [231]. Aunque su contribución en la piel es menor en comparación con el colágeno tipo I y III, se ha observado que el colágeno tipo-IV también esta presente en las glándulas sudoríparas y los vasos sanguíneos, y su presencia puede ser utilizada como un biomarcador en el proceso de cicatrización de heridas, enfermedades reumáticas, síndrome de Alport y de Goodspasture y la aparición de ampollas en la piel [232], así como para la restauración de la piel por tratamientos basados en la luz [233, 101].

3.6. Colágeno Tipo-V

El *Colágeno Tipo-V* (T5C) es un tipo colágeno responsable de la fibrilación de los colágenos tipo I y III, con importante contribución en la matriz ósea, la estroma corneal y la matriz intersticial de los músculos, hígado, pulmones y placenta [234]. Junto con los colágenos tipos IV y VI, el colágeno tipo-V conforma aproximadamente el 5% del colágeno total en la piel humana [226]. Las deficiencias en la presencia del colágeno tipo-V se han correlacionado con el síndrome de Ehlers–Danlos. También se ha establecido que la altos niveles en la presencia del colágeno tipo-V han sido observados en enfermedades como cáncer, la granulación tisular, la inflamación, la aterosclerosis y la fibrosis, en diferentes tejidos como los pulmones, la piel, el riñón, tejido adiposo y tejido hepático [235, 236].

En la Figura 3.4 se observan el espectro Raman característico de la piel, así como los espectros Raman correspondientes a el colágeno tipo-I (T1C), tipo-III (T3C), tipo-IV (T4C) y tipo-V (T5C), cuyas bandas características están en $895, 933, 1000, 1076, 1352, 1423, 1460, 1661$ y 1735cm^{-1} .

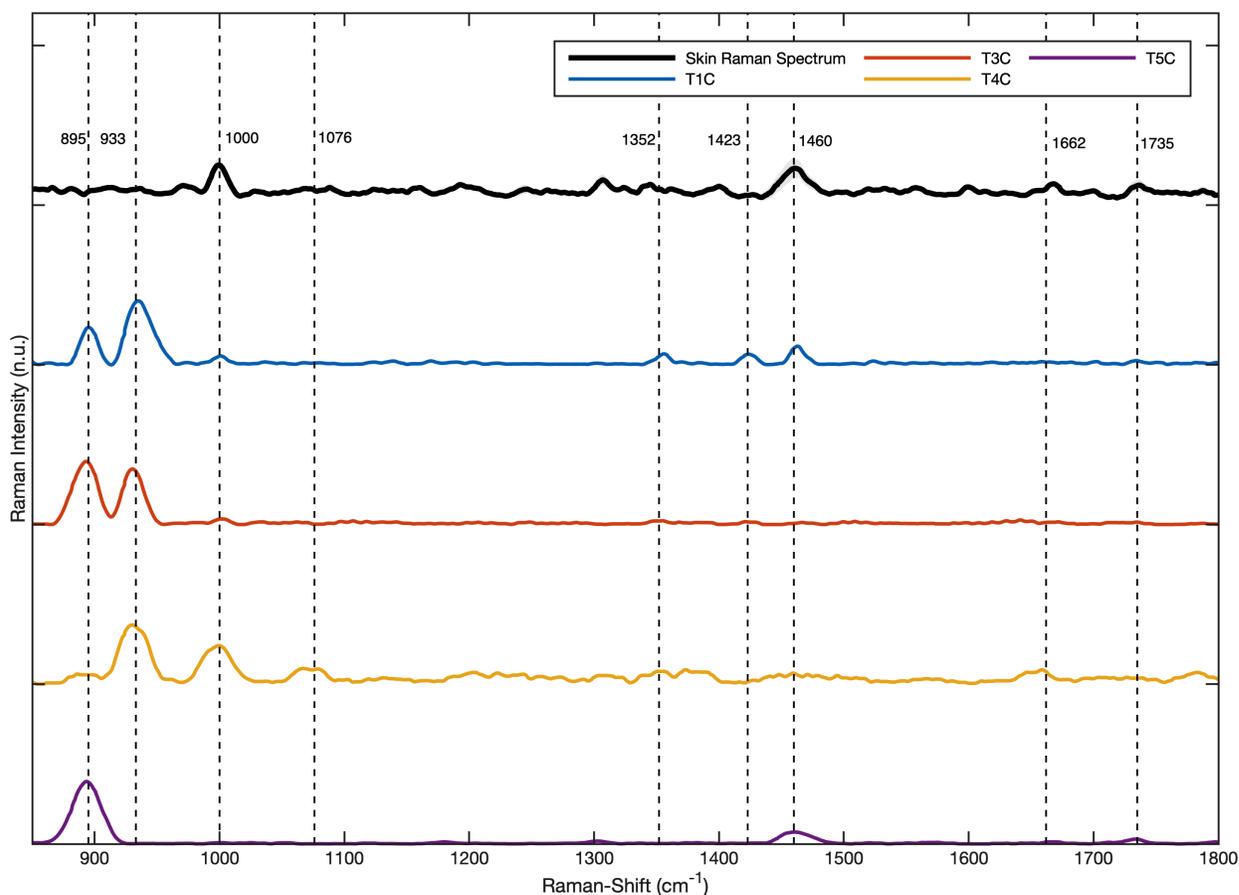


Figura 3.4: Espectro Raman de la piel y de los colágenos tipo-I (T1C), tipo-III (T3C), tipo-IV (T4C) y tipo-V (T5C).

3.7. Conclusiones

La espectroscopía Raman es la técnica central de esta investigación, así como sus aplicaciones médicas. Al realizar una caracterización de la piel fue posible validar los estudios presentados en esta tesis con trabajos previamente reportados para la detección de proteínas en la piel. Fue de gran importancia realizar una investigación sobre las proteínas que están involucradas en el proceso de regeneración de la piel, para evaluar la efectividad que tienen las terapias basadas en la luz para erradicar enfermedades dermatológicas de forma segura y no-invasiva. Aunque se abordan otras técnicas a lo largo de esta investigación, la espectroscopía Raman es la técnica utilizada como referencia y es de particular interés aplicarla en diferentes áreas de la medicina. El espectro Raman de la piel que se obtuvo de forma experimental presenta las bandas observadas en los espectros de los colágenos. De acuerdo a la investigación previa [9, 223], la resolución del espectro Raman y su uso en aplicaciones biomédicas depende en gran parte de la configuración del sistema de espectroscopía, del procesado y del análisis de la señal obtenida.

Capítulo 4

Diagnóstico y Monitoreo Óptico de Cicatrices de Acné bajo Cirugía Láser Fraccional Ablativa CO_2

4.1. Cicatrices de Acné

Las *Cicatrices de Acné* se consideran como una enfermedad resultante de las lesiones inflamatorias que se presentan en la piel y que pueden manifestarse a pesar estar bajo un tratamiento médico para el acné, o incluso pueden ser auto inducidas por el mismo paciente debido a el impacto negativo y la excesiva carga emocional, física y psicológica que estas tienen en la vida diaria de los pacientes, los cuáles por lo general se encuentran en la etapa adolescente [237, 238, 239, 240, 241, 242, 243].

Las cicatrices de acné se presentan cuando ocurre la evolución de un micro-comedón leve a una lesión inflamatoria, las cuáles con un manejo inapropiado, pueden ser disparadores para el desarrollo de infecciones en la piel. Su apariencia física esta caracterizada por una notable resequedad e hinchazón. Otra característica de las cicatrices de acné es que si no son tratadas oportunamente, estas permanecerán en la piel del paciente, dándole una apariencia de desgaste.

Las cicatrices de acné se clasifican como *Atróficas*, *Hipertróficas* y *Keloidales* [240, 242, 244, 245], siendo las cicatrices atróficas las mas comunes y que pueden ser de tres tipos: pica-hielo (*ice-pick*), rodante (*rolling*) ó de vagón (*boxcar*) [246, 247, 248, 249, 250] (Figura 4.1).

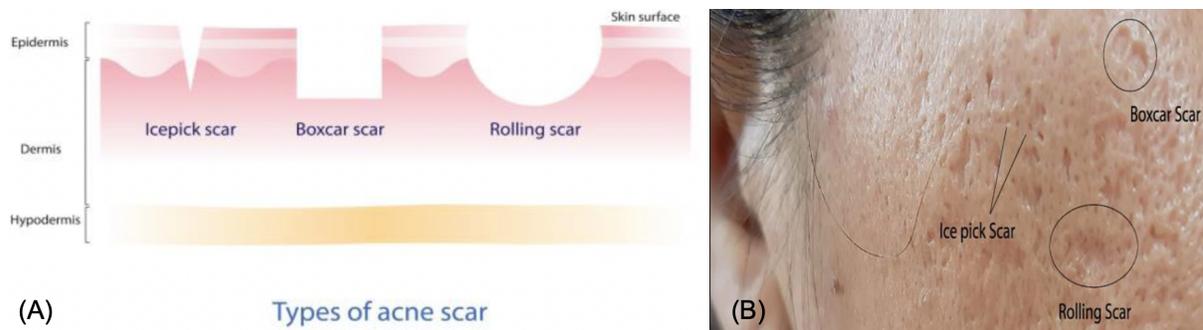


Figura 4.1: Clasificación de las cicatrices de acné de acuerdo a su morfología [249]: (A) (Izquierda) Cicatriz de Vagón (Boxcar). (Centro) Cicatriz Pica-Hielo (Ice Picking). (Derecha) Cicatriz Rodante (Rolling). (B) Presencia de las cicatrices de acné en la superficie facial [251, 250, 252].

4.2. Tratamientos para las Cicatrices de Acné

Para reducir la presencia de las cicatrices de acné es importante conocer el tipo de cicatriz que se formo, así como el manejo del tratamiento de la enfermedad [250]. Aunque actualmente existen diversos tratamientos para las cicatrices de acné, su efectividad ha sido fuertemente cuestionada por los efectos adversos de los medicamentos aplicados o por la reincidencia de la enfermedad, ocasionando así una mayor carga emocional negativa en los pacientes [249], por lo tanto es crucial tener un tratamiento/manejo individualizado para cada paciente, ya que cada uno presenta cicatrices de distintas características [250]. A menudo se realizan tratamientos en conjunto debido a que cada paciente puede presentar diferentes tipos de cicatrices a la vez, así como lesiones inflamatorias, resultado de la auto-medicación o bien por auto-inducción del paciente como resultado del enorme impacto negativo experimentan al tener este tipo de cicatrices [250]. Los tratamientos considerados como estándares para el tratamiento de las cicatrices de acné son:

- *Peeling Químico* [253].
- *Dermoabrasión* [254].
- *Cirugía Láser Fraccional Ablativa y No-Ablativa* [70, 255, 256, 257, 258].
- *Injertos* [246].
- *Trasplantes de Grasa* [259].
- *Agujeramiento/Microagujeramiento de la piel* [260].
- *Subcisión Cutánea* [261].
- *Terapia de Células Madre* [262].

- *Terapia de Plaquetas con Alto Contenido en Plasma* [263].

La mayoría de los tratamientos para cicatrices de acné han presentado una limitada utilidad clínica debido a la supresión incompleta de la enfermedad, operación intra-operativa deficiente, riesgo de contraer infecciones durante el tratamiento, fibrosis tisular, alteración anormal de la pigmentación, eritema prolongada o bien reincidencia de la enfermedad [264]. Las cirugías láser, que aunque desde hace años su uso ya está estandarizado, aún presentan ciertas incógnitas en cuanto a sus efectos, es decir, es necesario establecer una valoración clínica de la efectividad del tratamiento y de sus mecanismos, ya que los cambios microscópicos en las lesiones y en las zonas cercanas son difíciles de evaluar debido a las múltiples biopsias requeridas, resultando en una gran alteración de la zona de interés [265] donde podría presentarse algún relapso de la enfermedad e inclusive se podría originar otra enfermedad más seria. El mecanismo deseado para el tratamiento de las cicatrices de acné es la estimulación de los fibroblastos y la regeneración de colágeno o elastina en el tejido dañado como resultado del acné [257]. Existen dos tipos de modalidades para efectuar una cirugía láser, las cuáles dependen del tipo de láser utilizado:

- **Cirugía Láser Ablativa:** Se basa en el efecto de *Ablación* para remover parte de un tejido por medio de la vaporización de líquidos. Entre sus aplicaciones médicas se encuentra el rejuvenecimiento cutáneo (ASR, por sus siglas en inglés, *Ablative Skin Remodeling*), el tratamiento para cicatrices hipertóxicas con alta efectividad debido a la vaporización de tejidos. En esta modalidad se utilizan láseres de Dióxido de Carbono (CO_2) y de Granate de Itrio y Aluminio Dopado con Erblio (*Erg:YAG*). Sus desventajas son la presencia de altos niveles de dolor durante la cirugía, alto periodo de recuperación y el eritema prolongado [266].
- **Remodelación Dérmica No-Ablativa (NDR, por sus siglas en inglés, *Non-Ablative Dermal Remodeling*):** Es la alternativa a el rejuvenecimiento cutáneo ablativo. En este abordaje se busca impactar el tejido dérmico sin dañar la capa de la epidermis. Su principal desventaja es la baja efectividad para la eliminación de cicatrices de acné [267].

Los láseres de CO_2 se caracterizan por elevar el agua a una alta temperatura debido a la alta absorción de esta en el infrarrojo, donde al evaporizarse, las moléculas de la piel tienen un efecto exfoliante en la piel que da lugar a la regeneración de colágeno y reforzamiento de las capas de la piel. Operan a una longitud de onda de $\lambda = 10.6\mu m$ la cuál es absorbida en su totalidad por el agua. Cuando se tiene un pulso de $1ms$, la profundidad de la penetración del tejido vaporizado será de $20 - 30\mu m$ por pulso, obteniendo una reducción en el daño térmico de $100 - 150\mu m$ sobre la superficie del tejido. Una optimización a la cirugía láser es la llamada *Fototermólisis*, la cuál consiste en aplicar la radiación láser en patrones de arreglos microscópicos (MTZ, por sus siglas en inglés, *Micro Thermal Zones*) [268, 258, 269] (Figura 4.2).

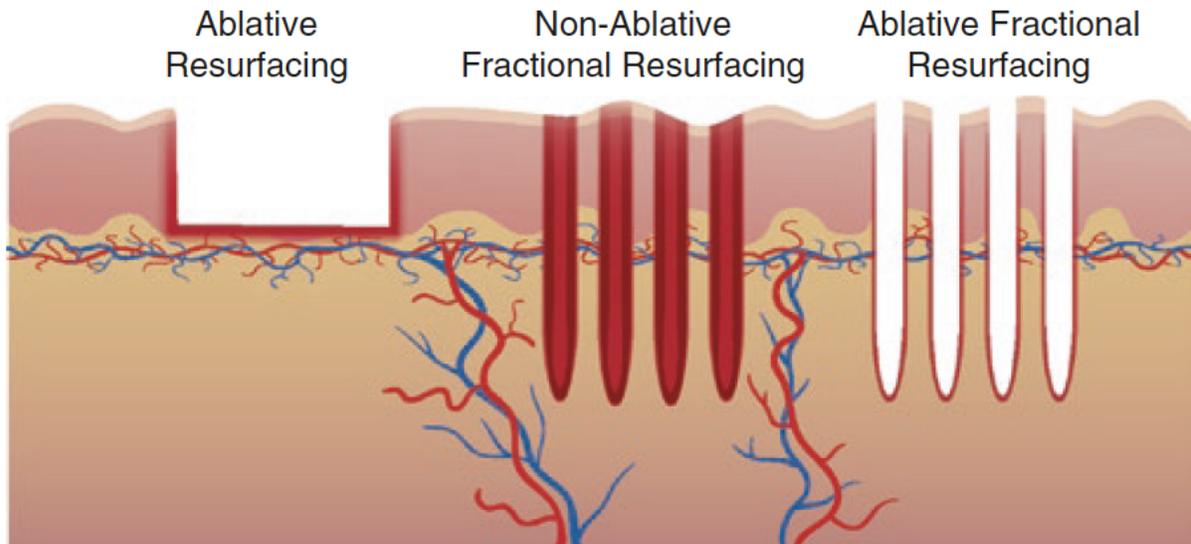


Figura 4.2: (Izquierda) Cirugía láser ablativa: Se obtiene una desmembración total de la piel, removiendo las capas de la epidermis y la dermis dando origen a el proceso de regeneración de la piel. (Centro) Cirugía láser no-ablativa: La capa de la epidermis permanece intacta mientras que los efectos térmicos se dan en la capa de la dermis. (Derecha) Fototermólisis: Las micro zonas térmicas garantizan una mejor recuperación epidérmica debido a las pequeñas cicatrices inducidas por el láser [268].

Las aplicaciones láser en la medicina están basadas en el principio de *Fototermólisis Selectiva* (SP, por sus siglas en inglés, *Selective Photothermolysis*), propuesto por R. Rox Anderson y John A. Parrish. El principio fundamental de esta técnica es el confinamiento de el daño por radiación térmica a objetivos específicos a nivel celular, ultra estructural, o tisular. La fototermólisis depende de la absorción selectiva de pequeños pulsos de radiación para generar y confinar energía térmica en los tejidos objetivo. Los tejidos cercanos a los objetivos no se ven afectados por la radiación, reduciendo la fibrosis no deseada. El principal requerimiento es que los tejidos objetivo tengan un coeficiente de absorción mayor que los tejidos cercanos, a la longitud de onda del láser utilizado [270].

El láser de CO_2 fue propuesto teóricamente en 1964 por C. Kumar N. Patel [271] y ese mismo año fue presentado experimentalmente en los Laboratorios Bell [272]. Fue hasta que Issac Kaplan realizó numerosos estudios, cuando su uso se estandarizo en diversas áreas de la medicina, principalmente en la dermatología [273, 274]. Este tipo de láser toma su nombre debido a que un gas compuesto de moléculas de CO_2 es estimulado para emitir luz coherente dentro del lejano infrarrojo ($9 - 11\mu m$), siendo la longitud de onda de $10.6\mu m$ la mas utilizada debido a que es la mas intensa [70, 50]. El gas utilizado como medio activo es una mezcla de helio ($60 - 80\%$), N_2 y CO_2 en una relación de $5 : 1$ [70].

Los efectos del láser dependen de las propiedades ópticas de los tejidos y del tiempo de exposición a la radiación. En aplicaciones médicas, el uso del láser de CO_2 esta caracterizado por el alto nivel de

absorción que presentan los tejidos a una longitud de onda de $10.6\mu m$, debido a su alto contenido de agua. Por lo tanto, la penetración de la radiación láser no es tan profunda y la energía absorbida resulta en efectos de vaporización o carbonización del tejido. Si se tienen tiempos de incidencia mayores a $1ms$ se producen efectos térmicos utilizados para procesos de coagulación, mientras que si se tienen tiempos de incidencia menores a $1ms$ se producen efectos atérmicos, utilizados para procesos cosméticos [70].

En la medicina, el láser de CO_2 tiene aplicaciones en dentro de la cirugía general y la cirugía plástica, y en diversas especialidades como la en dermatología, ginecología y otorrinolaringología. En la dermatología, su uso se considera como el estándar de oro para las cicatrices atópicas de acné, el rejuvenecimiento y restauración de la piel [275, 276, 277]. A pesar de su efectividad, la cirugía láser CO_2 tiene deficiencias que cada vez mas han limitado su uso en la práctica médica ya que son inaceptables para la mayoría de los pacientes [277, 278]:

- Alto tiempo de recuperación de la cirugía láser y sensación de quemadura despues de la cirugía.
- Hinchazón.
- Eritema prolongada.
- Hiperpigmentación post-inflamatoria.
- Hipo-pigmentación.
- Cicatrices.
- Edema é Infecciones.

Tomando en cuenta las deficiencias de la cirugía láser CO_2 , en 2004 Dieter Manstein et Al. propusieron una nueva modalidad dentro de la cirugía láser ablativa al introducir el concepto de *Fototermólisis Fraccional* (FP, por sus siglas en inglés, *Fractional Photothermolysis*), donde el haz de luz incide de forma fraccionada sobre el tejido, es decir se crean zonas micro-térmicas (MTZ, por sus siglas en inglés, *Micro Thermal Zones*) para estimular el proceso de cicatrización de las heridas ocasionadas por la radiación láser y protegiendo de esta forma los tejidos cercanos a la zona de interés [277, 278, 268]. Las zonas micro térmicas pueden ser modificadas de acuerdo a las características del tejido a tratar para ajustar el nivel de tratamiento por radiación láser. La *Cirugía Láser Fraccional Ablativa CO_2* (AFLS CO_2) combina los efectos de ablación de una cirugía CO_2 convencional con la modalidad de la fototermólisis fraccional como un tratamiento seguro y efectivo [278].

La Cirugía Láser Fraccional Ablativa (AFLS) es ampliamente utilizada en el campo de la medicina ya que es capaz de reducir traumas debido a la exposición de radiación en un corto periodo de tiempo [279]. La *Isotretinoína* se ha considerado durante varias décadas como el estándar de oro, , principalmente debido

a sus propiedades anti-inflamatorias, para el tratamiento de acné nódulo quístico o acné inflamatorio que ya ha sido tratado con tratamientos previos y que ha presentado relapsos [280]. Recientemente se ha establecido que al combinar el uso de la cirugía AFLS con isotretinoína oral, es posible observar una mejora en las zonas con presencia de cicatrices del acné en un corto período de tiempo sin resurgimiento del acné o efectos adversos sobre la piel resurgida [281, 282, 283, 284] por medio del incremento de la síntesis de colágeno en la piel y por la mejora del proceso de cicatrización de la lesión ocasionada por la cirugía láser. Sin embargo, a pesar de ser considerada una optimización a la cirugía láser convencional, la cirugía láser fraccional ablativa presenta importantes limitantes para garantizar su seguridad y efectividad, en especial si se realiza en conjunto con un tratamiento de isotretinoína oral. Entre las limitantes se encuentran el reducido número de muestras utilizado en estudios reportados, falta de análisis cuantitativos ya que la evaluación de la eficacia depende exclusivamente de criterios basados en la experiencia del dermatólogo para valorar el estado de las cicatrices, y principalmente, que no existen evidencias histológicas del proceso de cicatrización de las heridas [285, 286].

4.3. Regeneración de la Piel

La *Regeneración de la Piel* tiene como objetivo restaurar a una apariencia sana la piel que ha sufrido daños por la presencia de alguna enfermedad, tratamiento inadecuado de heridas, factores genéticos hereditarios, o bien por exposición a la radiación solar. Para llevar a cabo la regeneración de la piel es necesario emplear diferentes herramientas quirúrgicas y no quirúrgicas dependiendo del estado de la piel bajo análisis. Entre las herramientas más populares se encuentran las terapias basadas en la luz. Estas ventajas han hecho que la demanda de terapias basadas en la luz para la regeneración de la piel aumentara exponencialmente desde hace aproximadamente 20 años, de acuerdo a la Sociedad Americana de Cirugía Láser Estética [287]. Entre las más utilizadas para regeneración de la piel se encuentran la terapia de luz pulsada y la cirugía láser, considerada ya un estándar para este tipo de tratamientos.

Desde su introducción en 2004 por Manstein [268], la cirugía láser fraccional ablativa (AFLS) CO_2 se ha utilizado para la regeneración de la piel, debido a su alta efectividad y rápida cicatrización de heridas. Basada en el principio de fototermólisis, la AFLS se utiliza para el tratamiento de cicatrices de acné, debido a la regeneración de colágeno, elastina y proteoglicanos [288, 289]. En estudios recientes se ha profundizado sobre el uso de la AFLS combinada con otros tratamientos con el fin de aumentar la eficacia del tratamiento, prevenir efectos adversos y reincidencias del acné, así como infecciones debido a la prolongación de las eritema o edemas inducidas por el láser. Entre los tratamientos estudiados se encuentra la isotretinoína oral [290, 38], gluco-corticoides, células STEM, plaquetas ricas en plasma, terapia con luz pulsada, radiación por radiofrecuencia o incisiones subcutáneas [291]. En la Figura 4.3 se observa una biopsia de la piel bajo una cirugía láser como tratamiento para cicatrices de acné. En dicha figura se

puede apreciar la regeneración inducida por los efectos de la AFLS, haciendo énfasis en la regeneración y remodelización de colágenos, las cuáles se observan en un periodo de un mes después de haberse realizado la cirugía láser. Dicho estudio fue realizado por Walia y Alster [292] con el objetivo de estimar los efectos clínicos e histológicos de la cirugía láser ablativa como tratamiento de cicatrices de acné.

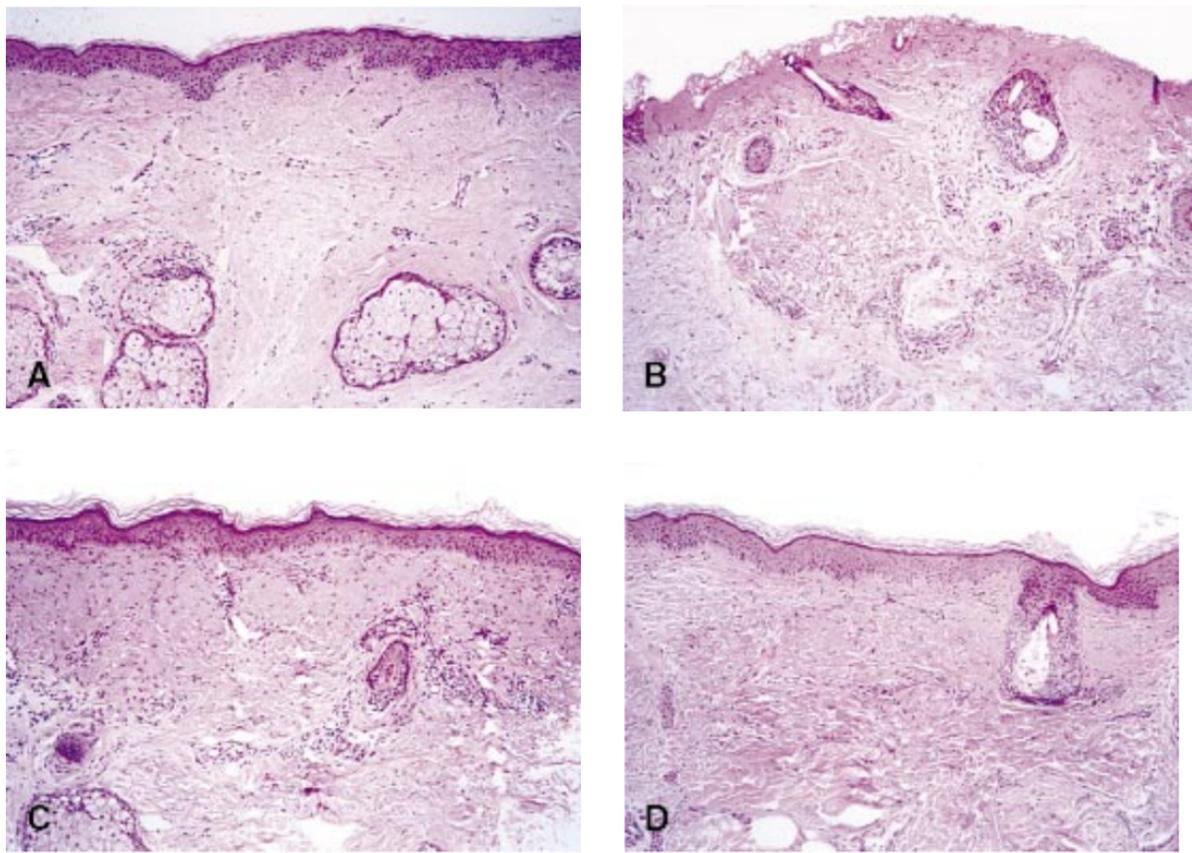


Figura 4.3: Biopsia donde se muestra el proceso de la regeneración de la piel inducida por los efectos de la AFLS como tratamiento para cicatrices de acné [292]. (A) Biopsia de la piel antes de ser sometida a una AFLS, se puede observar la presencia de una cicatriz de acné. (B) Biopsia obtenida durante la cirugía láser, los efectos de la ablación se pueden observar en la epidermis (C) Biopsia tomada 6 meses después de la cirugía láser, en donde se observa la regeneración de colágeno. (D) Finalmente, después de 12 meses, la remodelización de colágeno se observa.

A diferencia del estudio presentado por Walia y Alster, en esta tesis se planteo como objetivo estudiar de forma objetiva la regeneración de colágeno en la piel después de haber sido sometida a una cirugía láser, de forma no-invasiva, es decir, sin necesidad de emplear a la biopsia como estándar en el diagnóstico. Los resultados se pudieron realizar de forma cuantitativa utilizando técnicas de aprendizaje automático para estimar de forma objetiva la regeneración de la piel y diferentes procesos relacionados a ella. La regeneración de colágeno es de principal interés, por lo tanto no fue necesario realizar mas mediciones de seguimiento, que es donde la remodelización de los colágenos se puede observar.

4.4. Monitoreo de los Incrementos de Temperatura Inducidos por la Cirugía Láser Fraccional Ablativa utilizando Imagenología por Termografía Infrarroja Digital

Actualmente se ha estandarizado el uso de la cirugía láser fraccional ablativa (AFLS) como tratamiento para enfermedades de la piel, como las cicatrices de acné. Además, al combinarse con otros tratamientos, es posible observar una mayor efectividad en la supresión de la enfermedad al utilizar otros tratamientos o terapias complementarias. Como se estableció en las secciones 1.2.1 y 4.2, entre las principales aplicaciones de la AFLS están la regeneración y el rejuvenecimiento de la piel, por medio de la producción estimulada y remodelación de colágenos, elastina y otras proteínas relacionadas a través de los mecanismos de la fototermolisis [270, 72, 293, 294, 295]. A pesar de contar con estas ventajas, aun existen múltiples controversias en el uso de la AFLS, principalmente referentes al estudio individualizado de cada paciente, por lo tanto es necesario estudiar los efectos inducidos por las interacciones de la luz y el tejido biológico de forma individualizada y no-invasiva [286]. De esta forma las herramientas de la óptica biomédica pueden utilizarse para cubrir estos requerimientos, principalmente utilizando técnicas de espectroscopía e imagenología. Con el objetivo de monitorear y valorar los efectos inducidos por las interacciones luz/tejido en una aplicación médica, se diseñó un estudio clínico utilizando una cirugía AFLS como tratamiento para cicatrices de acné con la espectroscopía Raman (RS) para monitorear la presencia y regeneración de las proteínas clave para la regeneración de la piel (en particular los colágenos tipo *I, III, IV* y *V*), la espectroscopía de reflectancia difusa (DRS) para la evaluación de la pigmentación y el eritema inducido por la AFLS, y finalmente la imagenología por termografía infrarroja digital (DITI), para estudiar los patrones térmicos e incrementos en temperatura sobre la piel del paciente al ser tratada con la AFLS.

En el estudio clínico propuesto, nueve pacientes con cicatrices de acné se sometieron a una AFLS después de terminar un tratamiento de isotretinoína oral a dosis terapéuticas. La selección de los pacientes se llevó a cabo siguiendo un criterio de exclusión el cuál indicaba tendencia keloidal, presencia activa de acné, embarazo e inmunosupresión [101, 223]. La AFLS se llevó a cabo utilizando un sistema Lutronic eCO_2 con una longitud de onda de $10.6\mu m$, energía por pulso de $120 - 140mJ/MTZ$, densidad de $100 - 125spots/cm^2$ y una potencia óptica de $25 - 30mW$ por paciente (Figura 4.4). Todos los pacientes fueron informados acerca del estudio clínico propuesto y firmaron un informe de aceptación para participar en dicho estudio. Al finalizar la cirugía láser fraccional ablativa, se requirió que los pacientes siguieran las indicaciones establecidas por el personal dermatológico, con el objetivo de poder realizar el seguimiento y la valoración de forma adecuada.



Figura 4.4: Sistema láser Lutronic eCO_2 utilizado para la AFLS. El láser fue irradiado sobre la piel de los pacientes con un patrón de forma rectangular.

Previo al análisis espectroscópico de la regeneración de la piel, se realizaron mediciones de termografía infrarroja (DITI) en un solo paciente durante la sesión de la AFLS con el objetivo de monitorear los incrementos en la temperatura directamente en la piel cada paciente, con esto fue posible obtener información valiosa acerca de la regeneración de las proteínas de interés que se discutirá en secciones posteriores. Es de vital importancia mencionar que para realizar las mediciones DITI es necesario utilizar protección ocular y en el equipo DITI debido a la alta energía generada en cada colisión del láser con la piel. Por medida de precaución es crucial contar con la guía de personal experimentado tanto en el área dermatológica como en el área óptica-electrónica.

Como primer resultado se observó que la presencia de las cicatrices de acné disminuyó de forma apreciable y sin efectos adversos de la AFLS ni relapsos de la enfermedad. Previamente a la AFLS, las cicatrices presentaban una distribución uniforme en la zona facial de los pacientes (Figura 4.5.A). Al finalizar la cirugía se realizó una sesión para la valoración del tratamiento un mes después de la AFLS, observándose una clara reducción en la presencia de las cicatrices de acné (Figura 4.5.B).

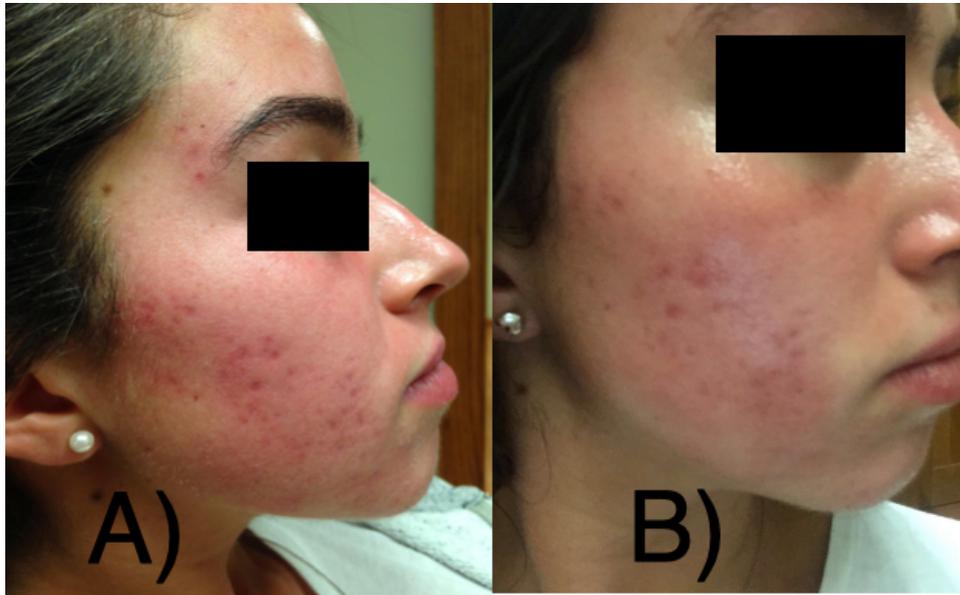


Figura 4.5: Paciente con cicatrices de acné antes (A) y después (B) de la AFLS. No se observaron efectos adversos ni reincidencias de las cicatrices de acné en ningún paciente.

Las mediciones DITI se realizaron utilizando un sistema de imagenología, mejor conocido como cámara infrarroja, modelo FLIR T600 con una resolución de 320×249 micro bolómetros sin enfriamiento, sensibilidad térmica de 0.005°C , rango de temperaturas de $-120 - 1200^{\circ}\text{C}$, rango espectral de $7.5 - 13\mu\text{m}$ y una configuración de emisividad de 0.98 (Figura 4.6). Las mediciones se realizaron siempre guardando una alta precaución para el personal técnico, el equipo de medición y sobre todo, de los pacientes, siempre con la guía de personal experimentado.



Figura 4.6: Cámara infrarroja FLIR T600.

Antes de realizar la AFLS se utilizó una solución salina para remover la suciedad ambiental de los pacientes. La primera sesión de mediciones ópticas se realizó 10 minutos antes de iniciar la AFLS. Las zonas de interés fueron las superficies faciales donde se encontraba la mayor distribución de cicatrices de acné, en todos los pacientes se observó una mayor concentración en las zonas de las mejillas, siendo estas zonas donde se utilizó una mayor potencia óptica y energía. En menor medida, se observó una presencia de la enfermedad en zonas como la frente y la barbilla (Figura 4.7). Además, es posible observar un patrón homogéneo en la temperatura facial, el cuál se abordara mas adelante.

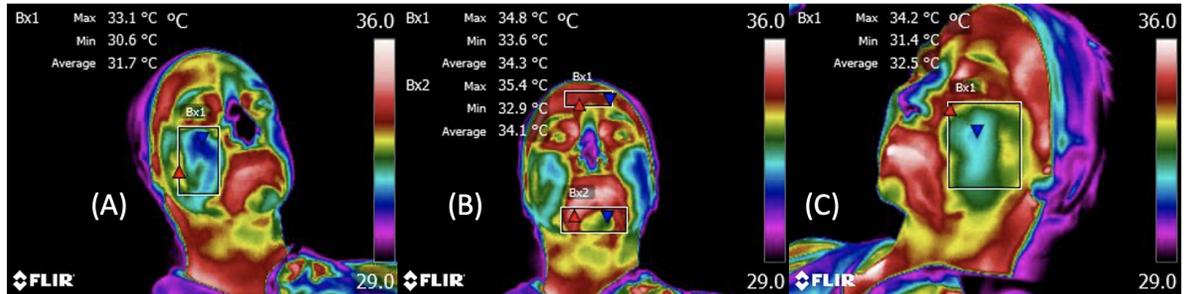


Figura 4.7: Termogramas de las superficies de la mejilla derecha (A), frente y barbilla (B) y mejilla izquierda (C) antes de la AFLS (PS).

Durante la cirugía los termogramas se tomaron manteniendo el enfoque del equipo protegido de los efectos de la radiación desprendida por el láser, resultando en incrementos de temperatura en las zonas incididas por el láser. Previo a la AFLS, los pacientes fueron colocados en un espacio diseñado para realizar terapias dermatológicas donde se les dio instrucciones de permanecer con los ojos cubiertos y en estado de relajación con el fin de mantener la temperatura observada durante la medición PS (Figura 4.8.A). Eventualmente se incidió el láser en las zonas con presencia de acné realizando variaciones en la potencia dependiendo de la severidad de la lesión. Fue en esta etapa donde se observó un incremento considerable en la temperatura de la superficie facial como efecto del láser y por la reacción instantánea de los pacientes (Figura 4.8.B). De todas las mediciones presentadas en esta tesis, esta fue la que supuso un mayor riesgo, no solo para el paciente, sino para la cámara termográfica y sobre todo para el operario. Finalmente, se realizó una última medición final 10 minutos después de finalizar la AFLS, donde se observó un decremento en la temperatura de los pacientes, con el objetivo de descartar los incrementos que pudieran haber sido ocasionados por la reacción nerviosa del paciente al ser sometido a una AFLS (Figura 4.8.C). Al finalizar la sesión todos los pacientes recibieron instrucciones de guardar reposo, evitar la exposición al sol y evitar el uso de irritantes para la piel como fragancias, maquillaje, etc. durante una semana, tras la cuál se realizaría una medición de seguimiento la cual se utilizó como herramienta para la valoración dermatológica.

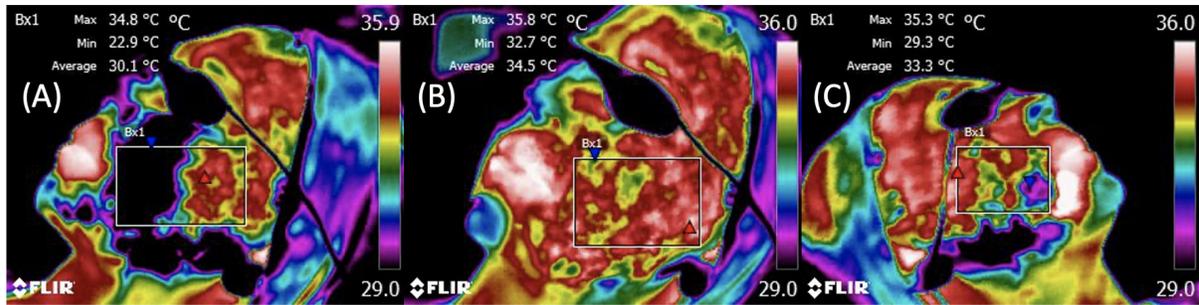


Figura 4.8: Termogramas adquiridos durante la AFLS. Superficie facial antes (A), durante (B) y después (C) de la AFLS.

Una semana y media después se realizó un seguimiento a los pacientes, los cuales mostraron un patrón térmico similar al observado en la medición previa a la AFLS. Aunque transcurrió un lapso considerable de tiempo, considerado como el indicado para observar la regeneración de la piel, aun fue posible observar la presencia de las cicatrices de acné en las zonas mas afectadas y además se observó la presencia de un eritema en las zonas que fueron irradiadas con el láser, principalmente por la potencia óptica variable que fue aplicada en cada zona. En la zona de las mejillas se observó la mayor presencia de las cicatrices de acné, por lo tanto se realizó un énfasis en el análisis de dichas zonas (Figuras 4.9.A y 4.9.B). En cuanto a las zonas de la frente y de la barbilla, donde la presencia de las cicatrices de acné fue menor, la incidencia del láser fue menor, resultando en una total supresión de la enfermedad observada durante el primer seguimiento, además de observarse un decremento de temperatura menos pronunciado a diferencia de la zona de las mejillas (Figuras 4.9.C). Posteriormente a este seguimiento, los pacientes recibieron indicaciones para poder realizar sus actividades cotidianas utilizando sustancias humectantes para la piel, pero aún evitando la exposición al sol y el uso de sustancias irritantes para la piel. Mas adelante se discutirá acerca de la viabilidad de esta medición a partir del análisis de patrones térmicos en cada una de las zonas analizadas.

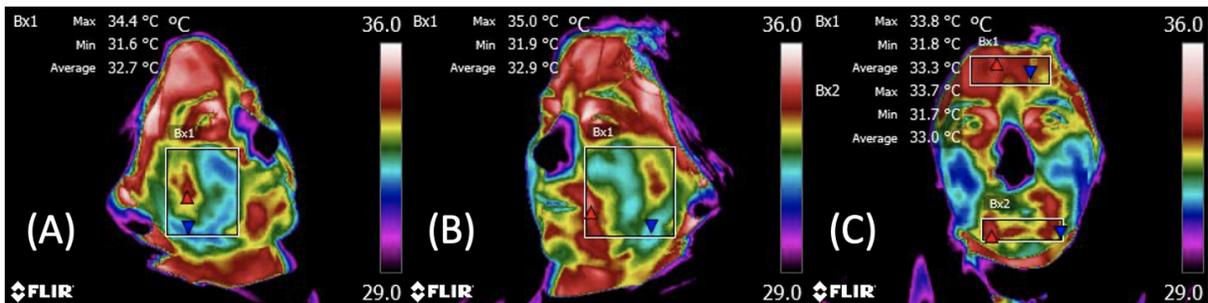


Figura 4.9: Termogramas adquiridos durante el seguimiento a la AFLS, donde se puede observar un patrón térmico mas bajo en el paciente en las zonas de la mejilla derecha (A), mejilla izquierda (B) y frente y barbilla (C).

Para concluir el estudio propuesto de DITI como herramienta auxiliar en la valoración de la AFLS para cicatrices de acné, se realizó una última medición un mes después de la AFLS. A diferencia de la medición anterior (FU), durante el segundo seguimiento (FU2) se observó una erradicación total de la presencia de cicatrices de acné en las zonas de interés. Las temperaturas observadas mostraron un patrón ligeramente mayor que el observado durante la medición de la pre-cirugía (PS) pero menor que el del primer seguimiento (FU). En la Figura 4.10.A se muestra la temperatura promedio de la mejilla derecha para esta medición. Es en esta mejilla donde la presencia de las cicatrices de acné fue aun mas intensa, por lo tanto la potencia óptica aplicada fue mayor y el tiempo de recuperación tendría que ser mayor, aunque todos los pacientes mostraron una notable mejora como se puede apreciar en la Figura 4.5. Por otro lado, en la mejilla izquierda se aprecia una temperatura promedio mas baja que la temperatura promedio de la mejilla derecha (Figura 4.10.B). Para las zonas de la frente y de la barbilla no se observó algún cambio significativo con respecto al primer seguimiento (Figura 4.10.C), por lo tanto se consideró descartar la medición del primer seguimiento para los subsecuentes estudios.

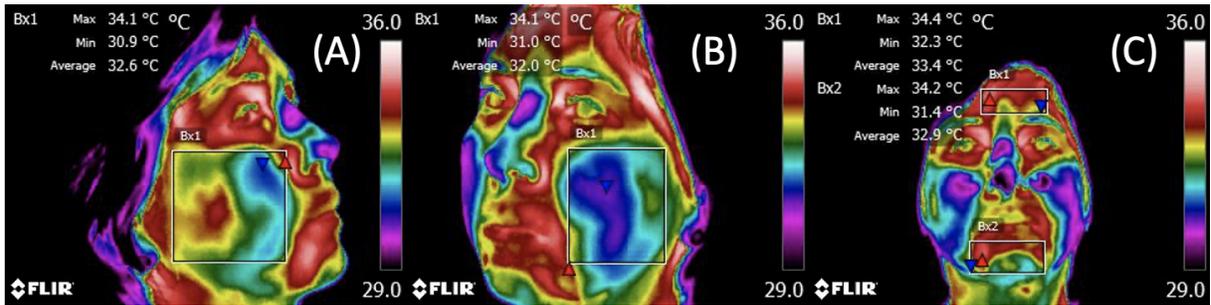


Figura 4.10: Termogramas adquiridos durante el seguimiento a la AFLS en las zonas de la mejilla derecha (A), mejilla izquierda (B) y frente y barbilla (C).

Al recopilar las temperaturas promedio observadas en cada etapa del experimento, se observó el incremento de temperatura buscado en la medición S. Durante las mediciones del seguimiento a la AFLS se observaron patrones similares en ambas mediciones (Tabla 4.1). A pesar de considerarse como medición de control, durante la medición PS se observó la mayor variabilidad entre las zonas faciales. Dichas variaciones en la temperatura promedio se observan en la Figura 4.11.

Tabla 4.1: Temperaturas (Scores Térmicos) por zona en cada una de las mediciones.

Zona	Pre-Cirugía	Cirugía	Follow-Up	Follow-Up2
Barbilla	34.1°	34.1°	33.0°	32.9°
Frente	34.3°	33.1°	33.3°	33.4°
Mejilla Derecha	31.7°	34.9°	32.7°	32.6°
Mejilla Izquierda	32.5°	34.8°	32.9°	32.0°

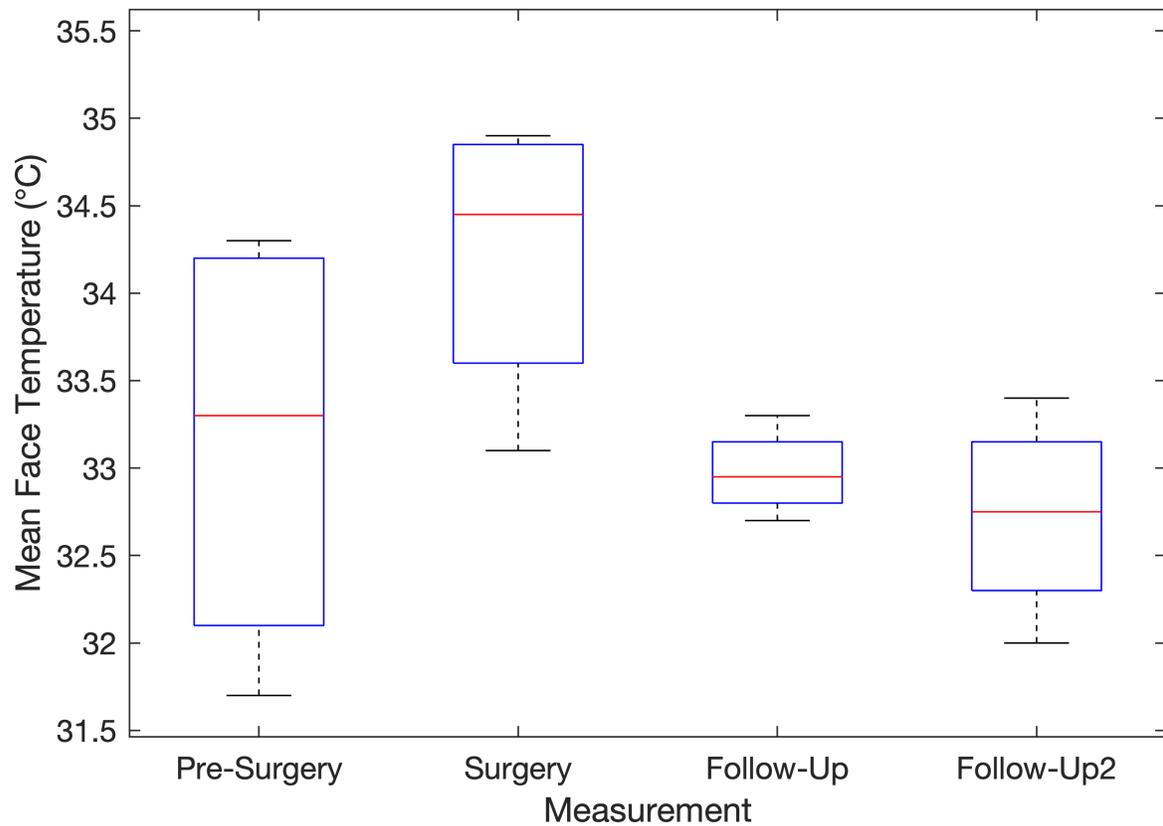


Figura 4.11: Comparación de los patrones térmicos faciales de los pacientes antes (PS), durante (S), una semana y media (FU) y un mes después (FU2) de la AFLS.

En la Figura 4.11 se observa una alta variación durante la medición PS debido a que la presencia de las cicatrices de acné era variable en cada zona. Durante la medición S se observó el incremento de temperatura buscado, el cuál se abordara mas adelante. Para la medición FU la variación de los scores térmicos se redujo de forma considerable debido a el proceso de regeneración de la piel inducido por la fototermolisis. Finalmente durante la medición FU2 se volvió a observar una variación en los scores térmicos, indicando así que la distribución térmica se había estabilizado, mostrando temperaturas variables en cada zona analizada. En el Capítulo 5 se abordara mas a detalle este resultado con un estudio similar (Sección5.4). De acuerdo a los scores térmicos obtenidos, los incrementos en la temperatura se observan principalmente en ambas mejillas ya que fue en esa zona donde se encontraba una mayor presencia de las cicatrices de acné, por lo tanto, la potencia óptica y la energía aplicada fueron mayores en comparación con la barbilla y la frente, donde fueron mínimas debido a la casi nula presencia de cicatrices de acné. Además en estas zonas la variación de temperatura fue prácticamente nula, por lo tanto es conveniente descartarlas para los siguientes estudios.

El patrón térmico facial ha sido utilizado como referencia en el uso de la DITI como herramienta

no-invasiva para el diagnóstico de enfermedades [199, 296, 297]. En el experimento realizado se observa un incremento de aproximadamente $3^{\circ}C$ en la zona de las mejillas, que es donde se observó una regeneración de la piel más pronunciada, en secciones posteriores se presentaron los análisis de estas zonas utilizando técnicas espectroscópicas.

4.5. Valoración de la Piel Regenerada por medio de Espectroscopía Raman In Vivo

Con el objetivo de realizar un análisis más profundo y exacto acerca del estado y la composición de la piel regenerada, se requirió de un estudio basado en las interacciones luz/tejido. La espectroscopía Raman (RS), es una técnica utilizada para obtener información molecular de la muestra bajo análisis, basada en el efecto de esparcimiento de la luz. Debido a su naturaleza no-invasiva, la RS ha sido ampliamente utilizada como herramienta médica para diagnóstico no-invasivo de enfermedades de la piel, monitoreo de la hidratación de la piel y valoración de tejidos cancerígenos [38], así como para la caracterización de materiales, la detección de sustancias ilícitas [223]. Diferentes técnicas de machine learning se han utilizado para el análisis de datos espectroscópicos, principalmente para la reducción, la clasificación, la discriminación y la correlación que existen entre los datos. Estas herramientas se aplican de diferentes formas: como *Aprendizaje Supervisado* donde se tiene conocimiento *a priori* de los datos, como *Aprendizaje No-Supervisado* donde no se tiene ninguna información previa acerca de los datos o de los resultados esperados, ó como *Aprendizaje Reforzado* donde se busca optimizar un análisis previo. Partiendo de los resultados del análisis DITI del patrón térmico inducido por la AFLS para pacientes con cicatrices de acné, en este estudio 9 pacientes con cicatrices de acné se sometieron a una AFLS siguiendo un criterio de exclusión y una configuración del sistema láser, como se planteó en la sección 4.4.

Las mediciones del esparcimiento Raman se realizaron de forma *in vivo* sobre la superficie de las mejillas de cada paciente antes de ser irradiadas con el láser de CO_2 a una temperatura ambiente utilizando un sistema Raman portátil modelo Ocean Optics IDRaman Mini con una longitud de onda de $785nm$, rango espectral de $850 - 1800cm^{-1}$, rango de longitudes de onda de $810 - 957nm$, resolución espectral de $8cm^{-1}$, potencia óptica de $100mW$ ($50mW$ sobre la muestra) y una relación señal a ruido (SNR) de $1000 : 1$ (Figura 4.12). La fuente de luz del equipo Raman es un diodo láser clase B con una irradiancia cuyos parámetros cumplen los requerimientos establecidos bajo el estándar ANSI Z136.1 para uso in-vivo. Previamente, se analizó la viabilidad del uso de este dispositivo portátil para aplicaciones médicas en comparación con otros equipos [9, 223].



Figura 4.12: Sistema Portátil Ocean Optics IDRaman Mini.

Al finalizar el experimento, es decir durante la valoración del tratamiento, se volvieron a tomar espectros Raman en las mismas zonas que fueron irradiadas con el láser, de esta forma se obtuvieron dos clases de interés: espectros de los pacientes antes (PS) y después (FU) de la AFLS. El lapso de tiempo entre las mediciones fue de un mes, de esta forma se busca observar la regeneración de la piel con RS. Para el procesamiento de datos espectroscópicos se utilizó una etapa para remover la fluorescencia utilizando el algoritmo Vancouver [219], una etapa de filtrado utilizando un filtro digital Savitzky-Golay, una etapa de normalización utilizando el área bajo la curva de los espectros y una etapa de truncación para reducir la variabilidad de las mediciones debido a los artefactos de movimiento de los pacientes y el personal encargado de tomar las muestras, así como la interferencia de rayos cósmicos. Para las etapas de pre-procesado, procesado y análisis de datos se utilizaron las herramientas *MATLAB 2018b* y *MATLAB Online*, ambas propiedad de *The MathWorks Inc*. El conjunto de datos (dataset) obtenido consistió de 36 espectros Raman, el cual se dividió en 18 espectros antes de la AFLS (PS), correspondientes a ambas mejillas para cada uno de los 9 pacientes, y 18 espectros in vivo de igual forma correspondientes a ambas mejillas de cada uno de los pacientes al finalizar el experimento, es decir, un mes después de la AFLS (FU). En la Figura 4.13 se observa la media de los espectros para ambas etapas del experimento, donde es notable una clara diferencia entre ciertas bandas.

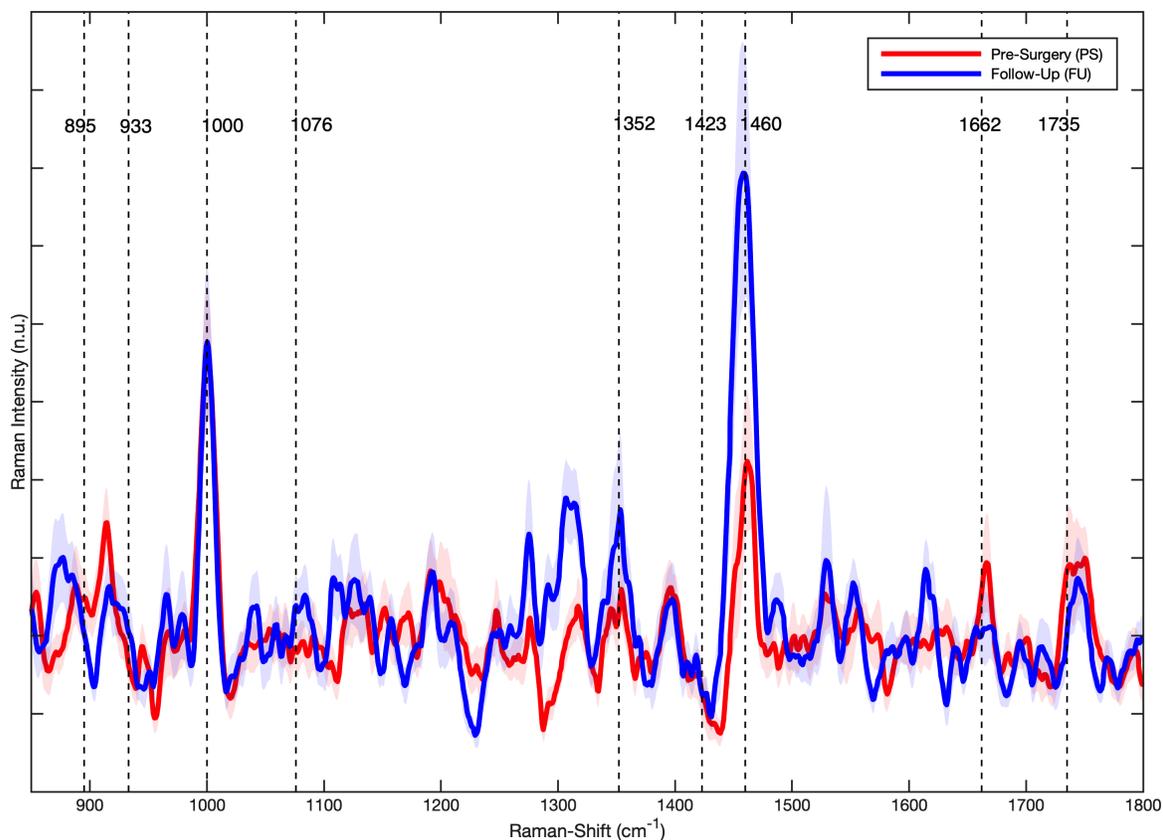


Figura 4.13: Espectros Raman in vivo de los pacientes antes (PS) y después (FU) de la AFLS. Se muestra también, la ubicación aproximada de las bandas relacionadas a los espectros de los colágenos, presentadas en el Capítulo 3.

Al realizar un test de Wilcoxon entre los espectros con cicatrices de acné y los espectros después de la AFLS se obtuvo un valor $p = 0.0015$, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los espectros. De acuerdo a lo establecido en la Tabla 3.1 de la Sección 3, se tiene una referencia de los componentes del espectro Raman de la piel, el cuál se observa en la Figura 3.3. Este espectro fue adquirido utilizando el mismo equipo Raman, en zonas sin presencia de las cicatrices de acné en los 9 pacientes bajo análisis. Al analizar de forma cualitativa los espectros Raman de los pacientes del experimento con el espectro de referencia de la piel es posible apreciar cierta similitud entre ellos, resaltando diferencias en intensidades en las bandas correspondientes al colágeno: $940, 1003, 1248, 1269, 1454$ y 1665cm^{-1} .

Para otras aplicaciones, como la caracterización de materiales *in situ* o la detección de sustancias *in vitro*, es común contar con un análisis cualitativo de espectros Raman y en estudios mas recientes, utilizar nanoestructuras para amplificar la señal Raman del material y de esta forma encontrar la composición molecular de dicho material. Al tratarse de mediciones *in vivo*, es necesario emplear técnicas de machine learning para cuantificar los espectros y de esta forma realizar un análisis mas preciso.

En las Secciones 3 y 4.3 se definieron las proteínas de interés que juegan un papel importante en el proceso de regeneración de la piel inducido por una AFLS, además se propuso el uso de técnicas no-invasivas de la óptica biomédica para valorar los mecanismos de la regeneración de la piel. Las proteínas propuestas como referencias para el análisis Raman son los colágenos tipo I, III, IV y V, los cuales fueron medidos de forma *in vitro* utilizando muestras adquiridas de los laboratorios *Sigma-Aldrich*. En la Figura 4.14 se observa el espectro Raman de la zona de control y los espectros *in vitro* de los colágenos con sus respectivas bandas características.

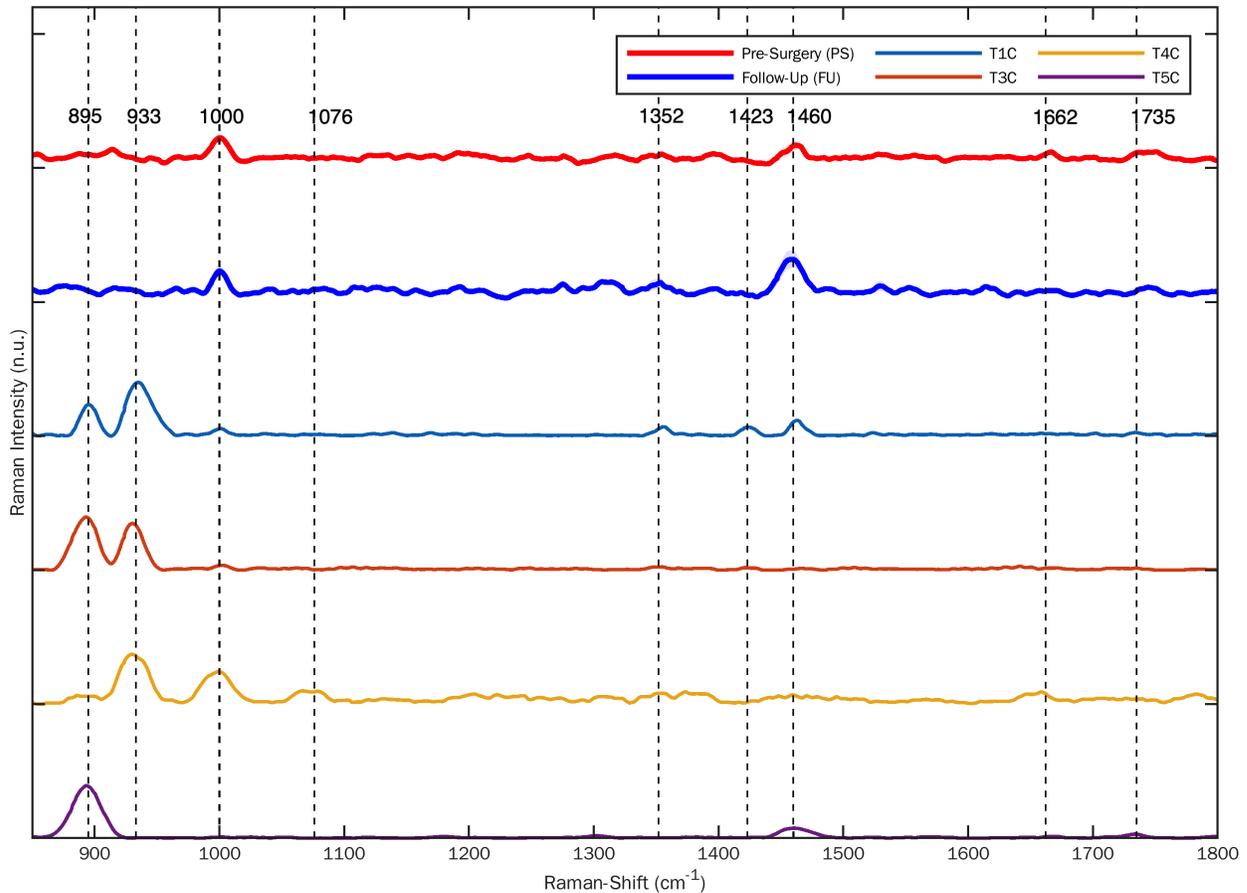


Figura 4.14: Espectro Raman de la piel antes (PS) y después (FU) de la AFLS y de los colágenos tipo-I (T1C), tipo-III (T3C), tipo-IV (T4C) y tipo-V (T5C).

Como primera aproximación se realizó un análisis estadístico utilizando las bandas observadas en los colágenos en los espectros de la pre-cirugía (PS) y el seguimiento (FU), conocido como Análisis de Perfil de Bandas (BPA por sus siglas en inglés *Band Profile Analysis*). Dicha aproximación consiste en tomar los valores de las intensidades y realizar un test de Wilcoxon entre ambas mediciones, de tal forma que se busca probar la hipótesis nula de que ambas intensidades provienen de espectros de la misma clase contra la hipótesis alterna de que no provienen de la misma clase. En la Figura 4.15 se observan los boxplots de

las intensidades observadas. Solo la banda ubicada en 1460cm^{-1} mostró una diferencia estadísticamente significativa con un valor $p = 0.0483$. Dicha banda fue observada en los espectros de los colágenos tipo I y V, y corresponde a al enlace $\delta(CH)$. En la Figura 4.13 se observa que dicha banda presenta una mayor intensidad en la medición FU, por lo tanto se puede considerar como el primer biomarcador de interés, pero debido a la relativamente pequeño tamaño de la muestra, y al hecho de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las demás bandas, el BPA no puede considerarse como una herramienta viable para estudiar la regeneración de la piel de forma in vivo.

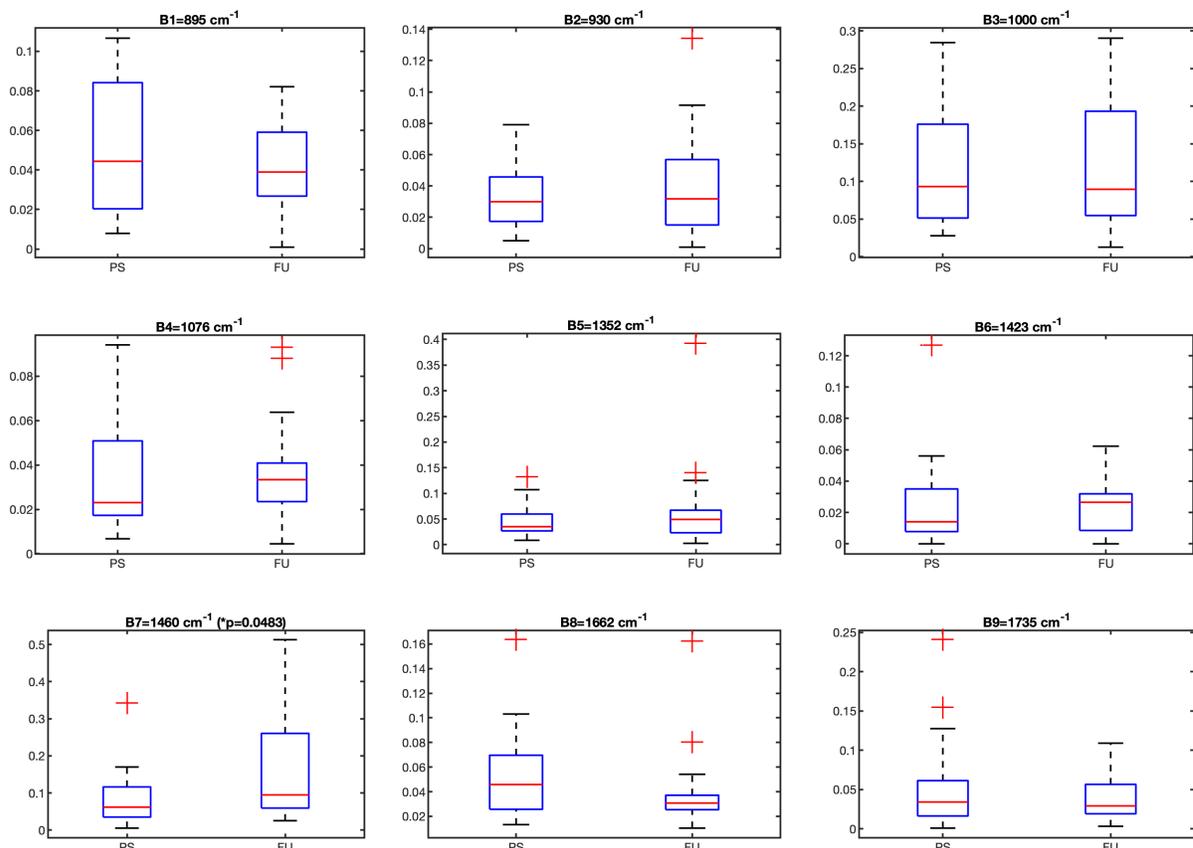


Figura 4.15: Análisis de las bandas observadas en los espectros Raman de la piel antes (PS) y después (FU) de la AFLS.

Como segunda aproximación, se realizó un *Análisis de Correlación Lineal* (LCA, por sus siglas en inglés, *Linear Correlation Analysis*) entre los espectros de los colágenos in vitro y los espectros de los pacientes in vivo. Esta aproximación fue empleada anteriormente por González et Al. 2011 para la detección de filagrina en pacientes con dermatitis atópica [93], permitiendo así la posibilidad de cuantificar la presencia de alguna proteína de interés de forma no-invasiva, individualizada, sin la necesidad de contar con una gran cantidad de datos.

También conocida como *Correlación Coseno*, el LCA es una métrica para establecer la similaritud entre dos muestras de diferentes patrones. Considerando un espectro como un arreglo de k elementos, donde k representa el número de corrimientos Raman al cuál fue adquirido dicho espectro, es posible determinar la similaritud que existe entre el espectro analizado y un espectro de referencia siguiendo la Eq. 4.1 [94]:

$$C_{j,patient} = \frac{\int S_j(k)S_{patient}(k)dK}{\sqrt{\int [S_j(k)]^2} \sqrt{\int [S_{patient}(k)]^2}} \quad (4.1)$$

Donde S_j corresponde a el espectro de referencia, $S_{patient}$ indica el espectro de los pacientes. En este estudio, los espectros de referencia corresponden a los espectros de los colágenos, el NMF, la elastina y la melanina y posteriormente se consideran los loadings del análisis de componentes principales (PCA). Al ser considerados dos vectores, la similitud puede ser cuantificada por medio del coseno del ángulo que hay entre ellos, de esta forma se obtiene la distancia y la dirección que existe entre ellos. Esta técnica es común dentro de la ciencia y minería de datos y recientemente se ha empleado en el área de la óptica biomédica, en particular con datos espectroscópicos [93, 94, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306].

El LCA se lleva a cabo directamente sobre el conjunto de datos y el espectro de referencia obteniendo así la contribución de la proteína en cada etapa del experimento. Para validar el LCA fue necesario analizar los espectros de la piel normal con cada uno de las proteínas medidas experimentalmente así como utilizando espectros previamente reportados en la literatura. Se puede observar claramente una correlación mas alta en el colágeno tipo IV debido a que los espectros de la piel sana fueron tomados en la zona del flexural del codo, donde la presencia de glándulas es considerablemente mayor y de acuerdo a la Sección 3.5, la presencia del colágeno tipo-IV es mayor en las zonas donde están localizadas este tipo de glándulas.

Aunque es la proteína con mayor presencia en la piel, el LCA del colágeno tipo-I resulto en un valor relativamente bajo en comparación con el colágeno tipo-4. De acuerdo a lo establecido por Nyugen et Al. [227], al ser el colágeno tipo-I el principal constituyente de la piel, y el colágeno tipo-IV el principal constituyente de la membrana basal de la interfaz epidermis/dermis con un grosor fino, por lo tanto, es posible que la medición Raman se componga de la contribución de ambos colágenos. Por otro lado, la contribución del colágeno tipo-III mostró ser la mas baja de los colágenos analizados debido a que esta co-localizada con el colágeno tipo-I pero en menor proporción. El colágeno tipo-V mostró un valor cercano al del colágeno tipo-I, como se planteo en la Sección 3.6. Finalmente, se observaron valores mas altos en los espectros del NMF, la elastina y la melanina, que fueron obtenidos de la literatura.

Analizando los coeficientes del LCA para la zona de control fue posible observar que los colágenos se encuentran distribuidos en diferente proporción sobre la piel (Figura 4.16). Este análisis, que originalmente

fue utilizado como referencia para todos los estudios espectroscópicos de esta tesis, proporcionó una validación de la contribución que tuvieron los espectros de las proteínas medidos experimentalmente con los espectros de los pacientes. En la Figura 4.16 se observan los coeficientes de correlación entre los espectros de los colágenos y los espectros de los pacientes.

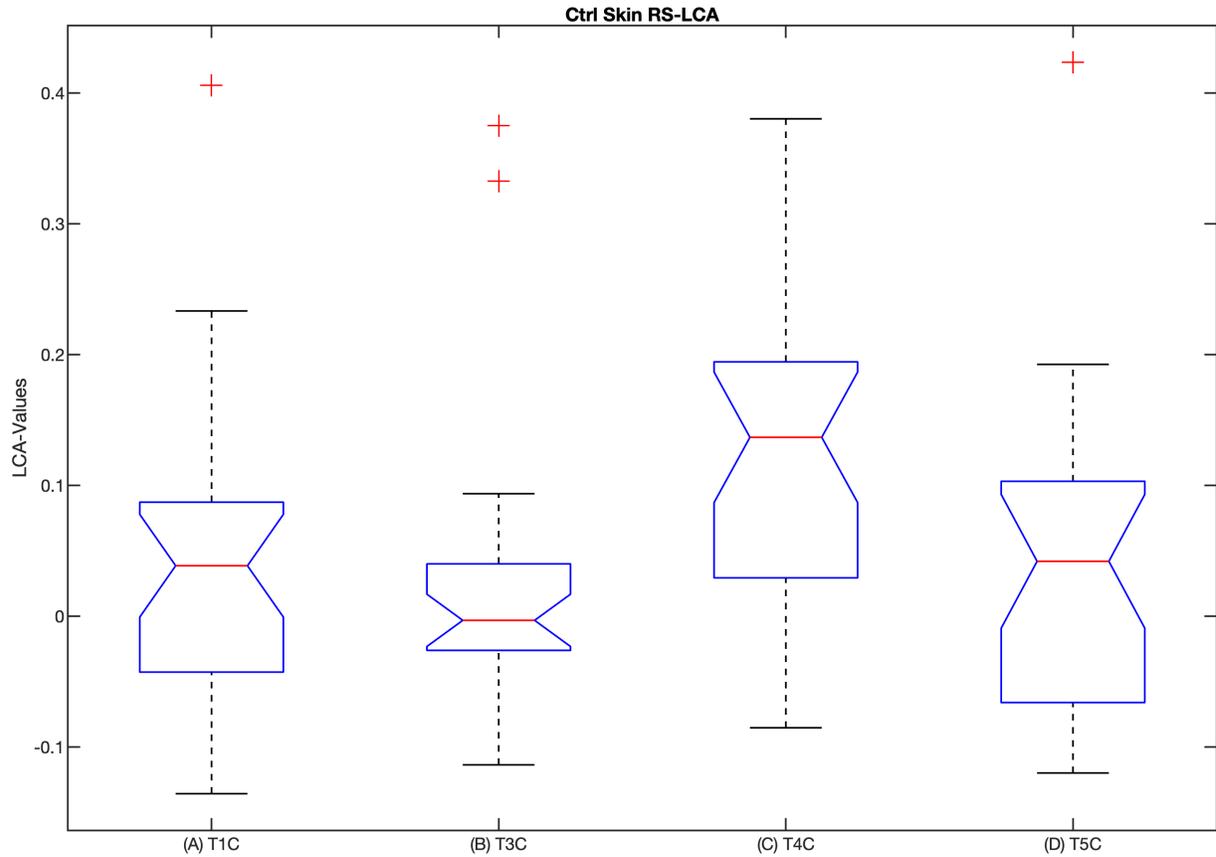


Figura 4.16: Coeficientes del LCA entre los espectros Raman de la piel sana (zona de control) y los espectros de los colágenos (I, III, IV y V).

El espectro del colágeno tipo-I fue el primero en ser analizado con los espectros con de las cicatrices de acné, con la hipótesis de que su presencia sería mayor después de la AFLS como efecto de la regeneración de la piel. Se obtuvo coeficiente medio de correlación de 0.02 ± 0.2 (PS) y de 0.03 ± 0.02 (FU) con un valor $p = 0.77$ entre la media de ambas mediciones, por lo tanto el incremento observado en la presencia del colágeno tipo-I no se considera estadísticamente significativo. En la Figura 4.17.A se observan las comparaciones entre los valores de correlación entre ambas mediciones, PS y FU para el colágeno tipo-I, donde es posible observar un outlier en la medición FU. Se observa además, que ambas mediciones mantienen valores cercanos. Esta homogeneidad esta directamente relacionada con el hecho de que el colágeno tipo-I la proteína mas abundante en la piel, independientemente si existe una presencia de acné o no, y el pequeño incremento observado es efecto del proceso de regeneración de la piel.

Para el análisis del colágeno tipo-III se observó un decremento en el valor del LCA durante la medición FU, además de observarse la presencia de un outlier tanto en la medición PS como en la medición FU (Figura 4.17.B). De acuerdo a lo establecido en la sección 3.4, el colágeno tipo-III es comúnmente analizado junto con el colágeno tipo-I debido a que se encuentra embebido en el, y su presencia sirve como complemento para cuantificar el proceso de rejuvenecimiento de la piel por medio de la AFLS. Al igual que con el colágeno tipo-I, el resultado obtenido para el colágeno tipo-III tampoco es estadísticamente significativo ($p = 0.37$), aunque es importante observar como el grado de variación entre el rango intercuartíl disminuye.

Por otro lado, al analizar el colágeno tipo-IV fue posible observar valores de correlación mas elevados en comparación con los colágenos tipo I y III (Figura 4.17.C). Durante la medición PS se observó una mayor variación en su rango intercuartíl, el cuál se redujo notablemente durante la medición FU . Se observó además un incremento de 0.07 ± 0.02 a 0.08 ± 0.02 , aunque sin significancia estadística ($p = 0.65$), el cuál esta relacionado con el proceso de cicatrización de las heridas inducidas por la AFLS, de acuerdo a lo establecido en la sección 3.5.

Finalmente, en los valores LCA del colágeno tipo-V, se observó un pequeño incremento de 0.07 ± 0.02 a 0.08 ± 0.02 con un valor $p = 0.65$ y de igual forma que los colágenos anteriores, la variación se redujo significativamente durante la medición FU (Figura 4.17.D). En la sección 3.6 se estableció que la presencia del colágeno tipo-V es un biomarcador para enfermedades inflamatorias de la piel.

Es importante mencionar que el LCA se realizó como un estudio individualizado sobre una pequeña muestra, por lo tanto, se observan valores bajos para la presencia de los colágenos. Como se propuso en un estudio previo [93], el LCA se puede emplear como una herramienta de análisis individualizado, con la limitante de que se deben realizar pruebas con conjuntos de datos en grandes magnitudes, y de esta forma validar un rango de valores para los pacientes que presenten deficiencias o incrementos anormales de una determinada proteína de referencia.

Al analizar los resultados obtenidos, se establece que LCA puede considerarse como una herramienta para la cuantificación de proteínas que actúan como biomarcadores de enfermedades de la piel, independientemente de la concentración de estas, la cuál no se considera en este trabajo, al ser la piel un medio turbio con una distribución des-uniforme de proteínas.

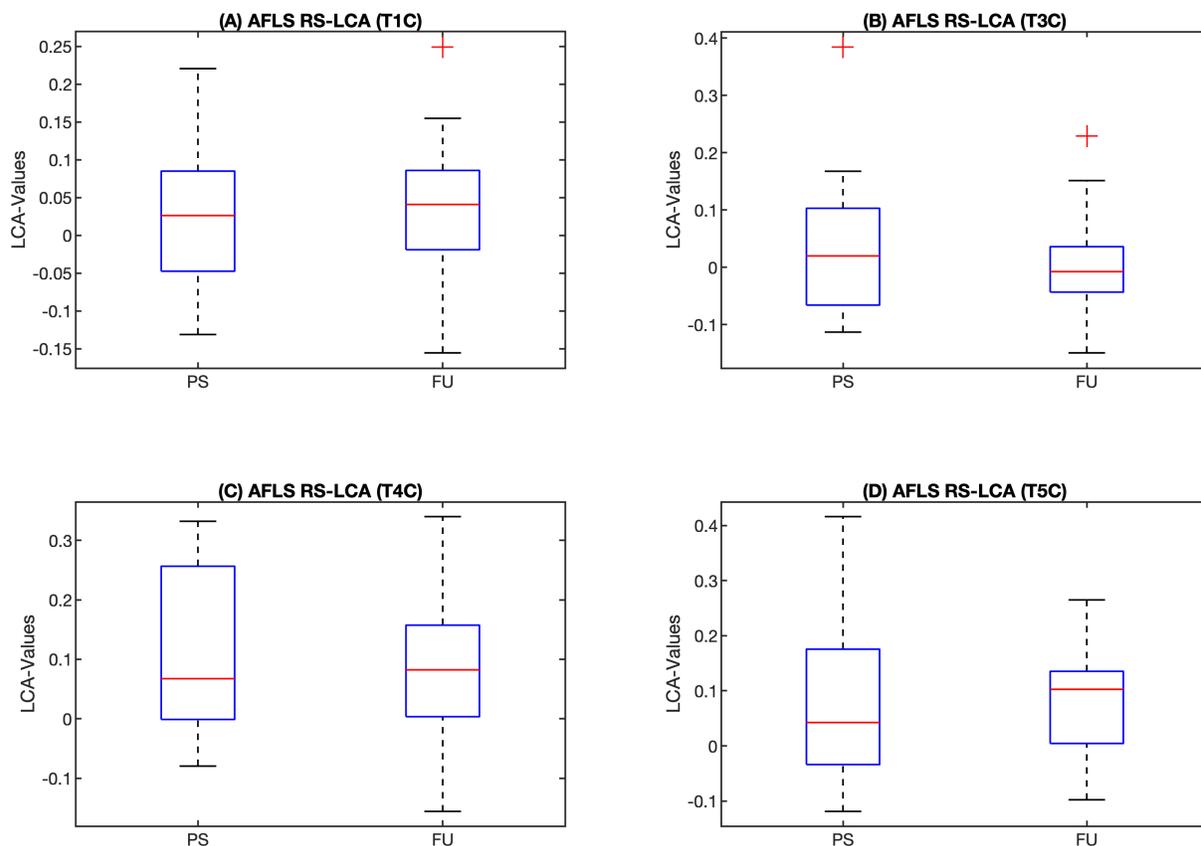


Figura 4.17: Coeficientes del LCA entre los espectros Raman de la piel con cicatrices de acné y el colágeno (A) tipo-I, (B) tipo-III, (C) tipo-IV y (D) tipo-V.

Debido a que los valores obtenidos en el LCA son bastante bajos, fue necesario emplear otra técnica más específica para cuantificar los cambios observados en los espectros Raman. El *Análisis de Componentes Principales* (PCA, por sus siglas en inglés, *Principal Components Analysis*) es una técnica de análisis multivariado empleada en el machine learning para la reducción y clasificación de variables, conservando la mayor parte de la variabilidad de el conjunto de datos original [38, 199, 94, 92], es decir, el conjunto de datos es transformado a un espacio donde los espectros son convertidos en componentes independientes entre sí [307]. De forma general, PCA convierte el conjunto de datos original a un espacio de variables con una dimensionalidad menor, conocidas como *Componentes Principales* (PC's) [308]. Cada PC es independiente uno del otro y describe diferentes grados de información del conjunto de datos original de forma descendente, es decir el primer PC contiene mayor información que el PC2, que a su vez contendrá mayor información del PC3 y así subsecuentemente. PCA proporciona diferentes resultados con los que es posible simplificar el análisis de datos: La cantidad de información que contiene cada PC puede ser observada en términos de la varianza, acumulada o independiente, en una gráfica conocida como *Scree Plot*. La contribución de cada PC a el conjunto de datos puede observarse en una gráfica conocida como

Score Plot, donde además es posible realizar inferencias acerca de la clasificación de las variables originales, es dentro de esta gráfica donde se puede realizar un clasificador adicional que se presentará mas adelante. Finalmente, los PC's que se consideren mas relevantes pueden ser analizados en una gráfica conocida como *Loadings Plot* donde se puede observar claramente como contribuye cada PC a el conjunto de datos original. En resumen, los objetivos de PCA son [309]:

- Reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos.
- Retener la mayor parte de la información del conjunto de datos original en un nuevo conjunto de datos con menores dimensiones.
- Simplificar la interpretación de la información del conjunto de datos original, al observar la contribución que tiene cada PC en el conjunto de datos original.
- Realizar una clasificación de las variables del conjunto de datos original en términos de los PC's.

Considerando conjunto de datos (*Dataset*) de dimensiones como una matriz de $M \times N$, donde $M = 36$ corresponde a los espectros Raman de mediciones in vivo de la piel, de los cuales 18 corresponden a la medición de la pre-cirugía y 18 corresponden a la medición del seguimiento de la AFLS (FU), y $N = 951$ corresponde a corrimientos Raman a los cuales fueron muestreados los espectros en un rango espectral de $850 - 1800 \text{cm}^{-1}$. Al aplicar PCA al dataset original se obtuvieron tres resultados diferentes: una matriz de $M \times N$ donde M representa el número componentes principales, conocidos como *Loadings*, una matriz de $M \times M$ que contiene los coeficientes de la matriz de transformación entre el dataset original y los PC's, conocidos como *Scores*, y un vector que contiene M eigenvalores, que indican la varianza total de cada PC's en orden descendente. La *Varianza* explica el grado de dispersión o variación que existe en un conjunto de datos, por lo tanto, el vector de las varianzas totales correspondientes a cada PC sirve para valorar cuales PC's pueden ser considerados para la reducción de variables, considerando aquellos que contengan la mayor variabilidad posible. Los valores se encuentran de forma descendente de tal forma que el PC1 es el que tiene la mayor parte de la varianza explicada.

Las varianzas explicadas se pueden analizar de forma acumulada (Figura 4.18A) ó individual (Figura 4.18B) en un scree plot. Aunque ambas representaciones proporcionan la misma información es recomendable utilizar ambas ya que en ocasiones los PC's que retienen la mayor variación posible no son los óptimos para realizar una reducción de datos, por lo tanto es de vital importancia analizar cada PC seleccionado de forma individual así como su correspondiente loading plot.

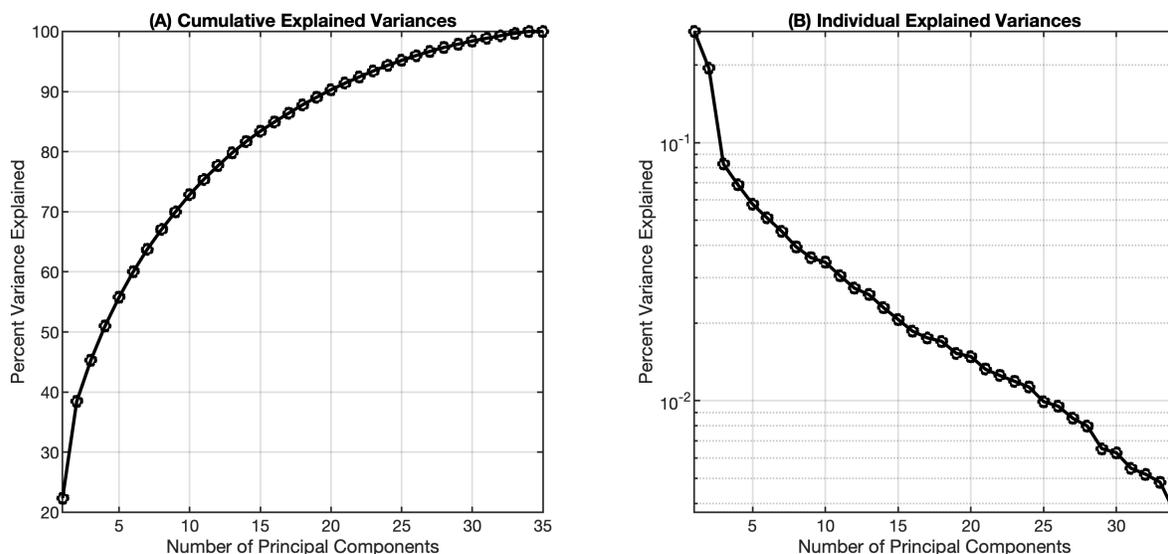


Figura 4.18: Scree plot de la varianza explicada de forma total acumulada (A) e individual (B). Normalmente los primeros PC's son los que retienen la mayor cantidad de varianza, pero en este caso, se observó una homogeneidad considerable en la mayoría de los PC's.

Debido a que las varianzas explicadas en cada PC son bastante cercanas entre si, es conveniente utilizar distintas métricas para evaluar cuáles PC's son los que mejor pueden reducir el tamaño del conjunto de datos origina, así como para clasificar las variables de interés contenidas en el conjunto de datos original. Entre dichas métricas se pueden mencionar el análisis de correlación lineal, la distancia de Mahalanobis, la distancia Euclideana, la similitud coseno, etc. En esta tesis se calculó la correlación lineal entre los espectros in vivo y los loadings correspondientes a los PC's 1, 2, 3 y 4, ya que retienen el mayor porcentaje de la varianza explicada (50.97% en total).

En la Figura 4.19 se observa la matriz de correlación calculada entre los espectros in vivo, los loadings obtenidos en el análisis de componentes principales y los espectros in vitro de los colágenos. Los loadings correspondientes al PC1 y PC3 fueron seleccionados de acuerdo a los coeficientes de correlación obtenidos: 0.75 entre la medición FU y el loading del PC1, y 0.51 entre la medición PS y el loading del PC3. Además los espectros de los colágenos se volvieron a utilizar, calculando la correlación que hay entre cada uno de los espectros con los loadings considerados los valores con mayor correlación obtenidos fueron 0.11 entre el colágeno tipo-I y el loading del PC2, 0.09 entre el colágeno tipo-III y el loading del PC3, 0.31 entre el colágeno tipo-IV y el loading del PC3 y 0.21 entre el colágeno tipo-V y el loading del PC2. Estos resultados fueron menores en comparación con las mediciones in vivo, por lo tanto se determino utilizar los espectros de los colágenos exclusivamente para evaluar la forma de los loadings seleccionados.

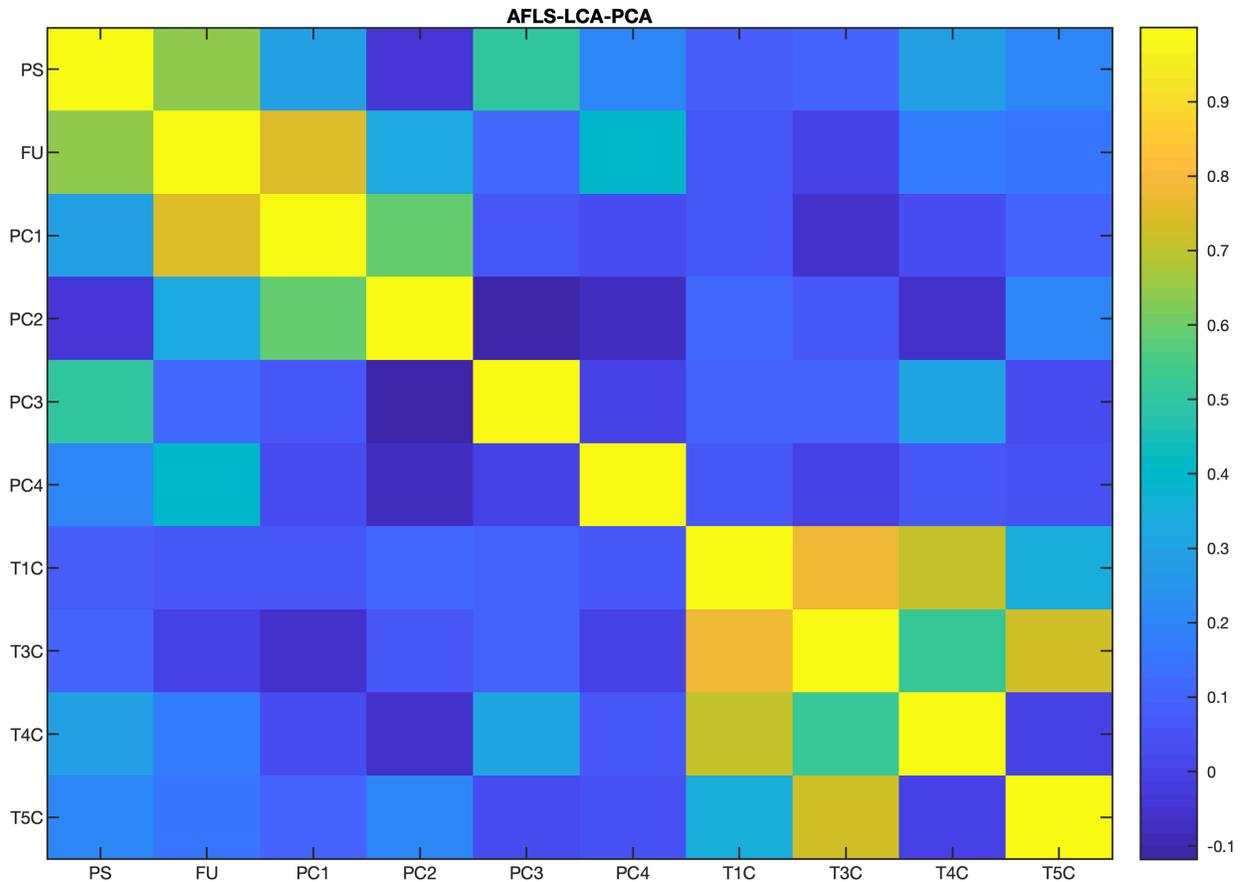


Figura 4.19: Matriz de correlación lineales entre los espectros in vivo, los loadings obtenidos en el análisis de componentes principales y los espectros in vitro de los colágenos.

El *Score Plot* es una gráfica donde se muestran los coeficientes de la transformación del espacio del conjunto de datos original a el espacio de los componentes principales, de igual forma que los loadings, hay un score para cada componente principal. La contribución que tiene cada PC sobre el conjunto de datos original correspondiente a los espectros in vivo de las lesiones antes (PS) y después (FU) de someterse a una AFLS para cicatrices de acné, al graficar los coeficientes de la transformación de datos originales a los componentes principales (Figura 4.20). Idealmente se espera observar una separación de variables en el score plot, de esta forma se puede considerar como una aproximación cualitativa mas intuitiva, aunque menos precisa. Al observar el score plot del PC3 vs PC4 se puede apreciar como existe una separación entre los espectros de la medición PS y la medición FU. Aunque se puede utilizar este análisis cualitativo para la selección de PC's, es recomendable utilizar otras técnicas cuantitativas mas precisas. Posteriormente se utilizará el score plot para observar la correlación lineal (LCA) que existe entre los loadings de los PC's seleccionados y cada uno de los espectros de los pacientes.

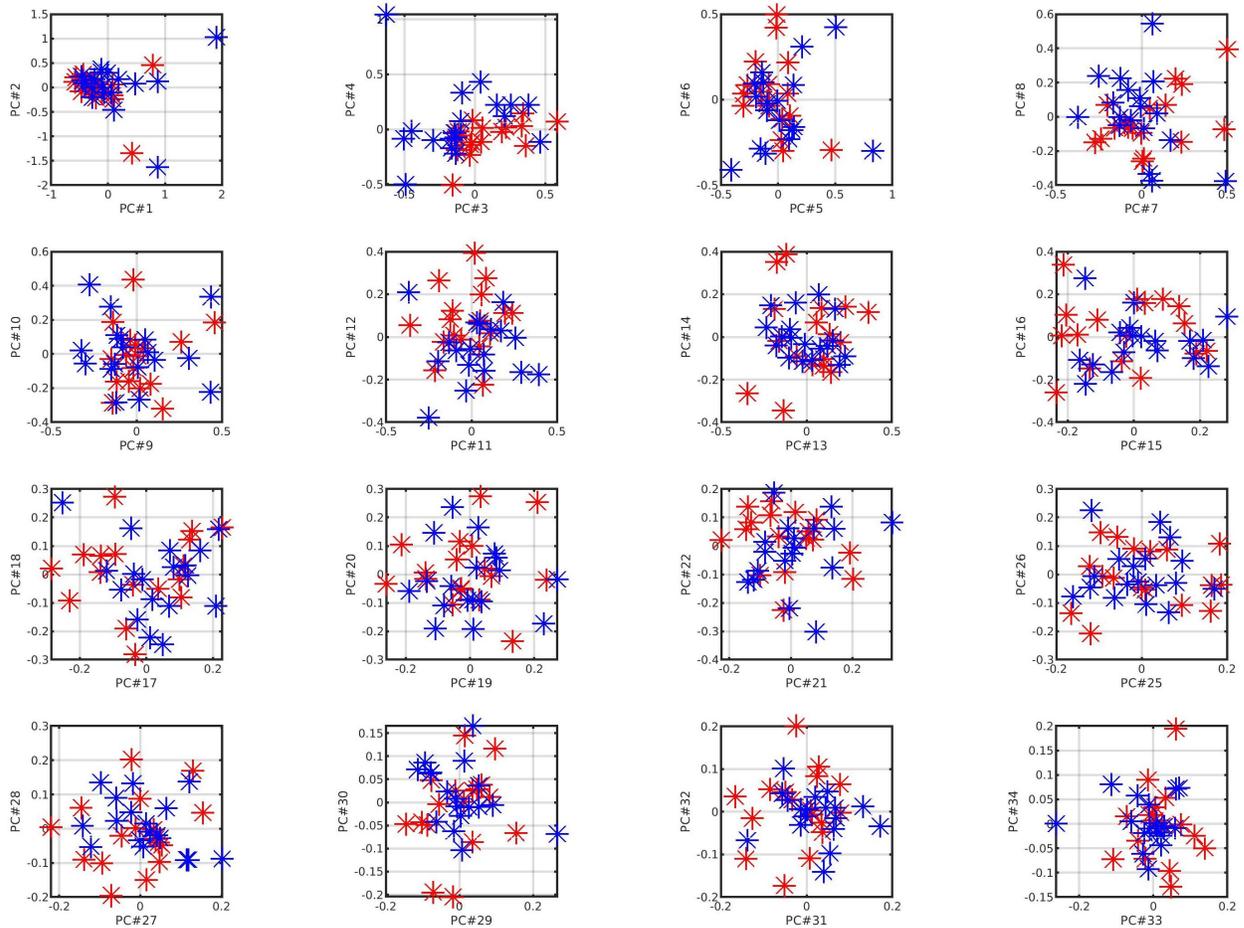


Figura 4.20: Score plots de cada PC. Los marcadores en color rojo representan a los espectros de la pre-cirugía (PS) mientras que los marcadores en color azul representan a los espectros del seguimiento (FU).

Al analizar cada score plot es posible observar la contribución que tiene cada PC en el dataset original, además de que es posible realizar una clasificación preliminar de las variables originales, la cuál se realizará posteriormente. En la Figura 4.20 se observa que es posible diferenciar entre ambas variables: marcadores rojos para los espectros de la pre-cirugía y azul para los espectros del seguimiento, dependiendo del PC seleccionado por lo tanto se determino la correlación entre cada PC's y los espectros originales, para la selección de PC's y posterior reducción de datos. Los valores obtenidos fueron una $r = 0.29$ entre el PC1 y la medición PS, $r = 0.75$ entre el PC1 y la medición FU, $r = 0.51$ entre el PC3 y la medición PS y finalmente, $r = 0.12$ entre el PC3 y la medición FU. El porcentaje de la varianza total explicada por los PC's seleccionados fue de 22.35% para el PC1 y 6.84% para el PC3. Adicionalmente a este abordaje, existen técnicas analíticas donde se incluye la distancia de Mahalanobis ente el centroide de la gráfica y cada PC, o bien, incluir el espectro de referencia dentro del dataset y encontrar la norma euclidiana entre dicho espectro y cada PC obtenido.

Aunque la distribución de las mediciones in vivo en el espacio de los PC's presenta un alto grado de homogeneidad, en el score plot seleccionado (PC1 vs PC3) se observa una separación entre las mediciones PS y FU. Añadiendo el etiquetado de los espectros a el score plot es posible observar cuál espectro se aleja de la tendencia de su clase, por lo que puede ser clasificado erróneamente. Utilizando este abordaje también es posible determinar cuál lesión presento una regeneración de las proteínas de interés mencionadas anteriormente (Figura 4.21).

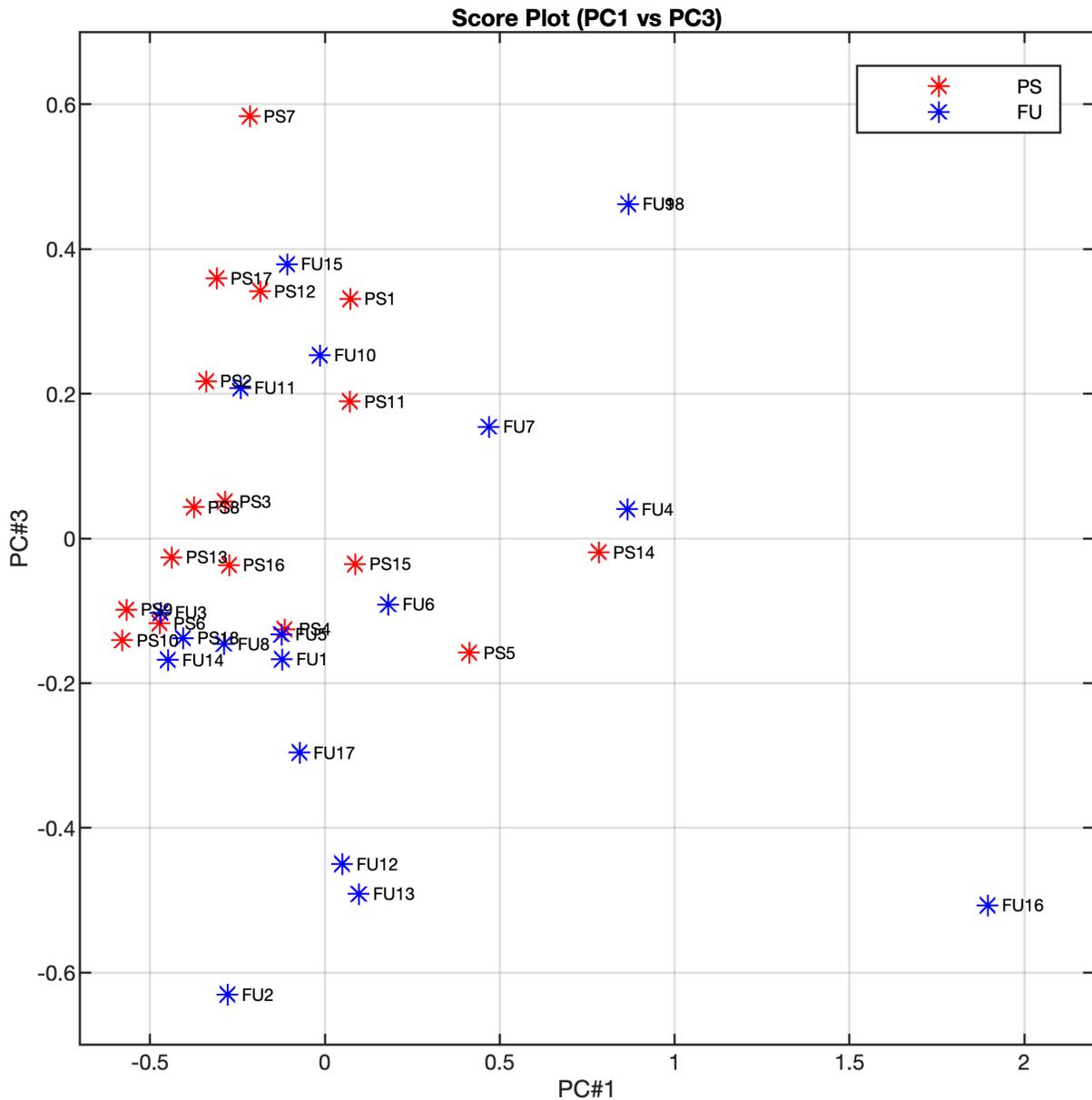


Figura 4.21: Score plot seleccionado para la reducción y clasificación de variables, en donde se observa la distribución de las mediciones in vivo dentro del espacio de los PC's.

El *Análisis Discriminante Cuadrático* (QDA, por sus siglas en inglés, *Quadratic Discriminant Analysis*) es una técnica utilizada para clasificación de variables, la cuál esta basada en la matriz de covarianza entre cada clase, es decir PS y FU. La matriz de covarianza indica el grado de dispersión que existe entre los elementos de un conjunto de datos, al considerarse dos clases, se obtuvieron matrices de covarianza diferentes para cada clase, por lo tanto, se optó por este tipo de análisis, el cuál es complementario a PCA. Al incluir el clasificador en el score plot es posible marcar una frontera entre ambas clases y establecer un criterio de clasificación entre mediciones (Figura 4.22).

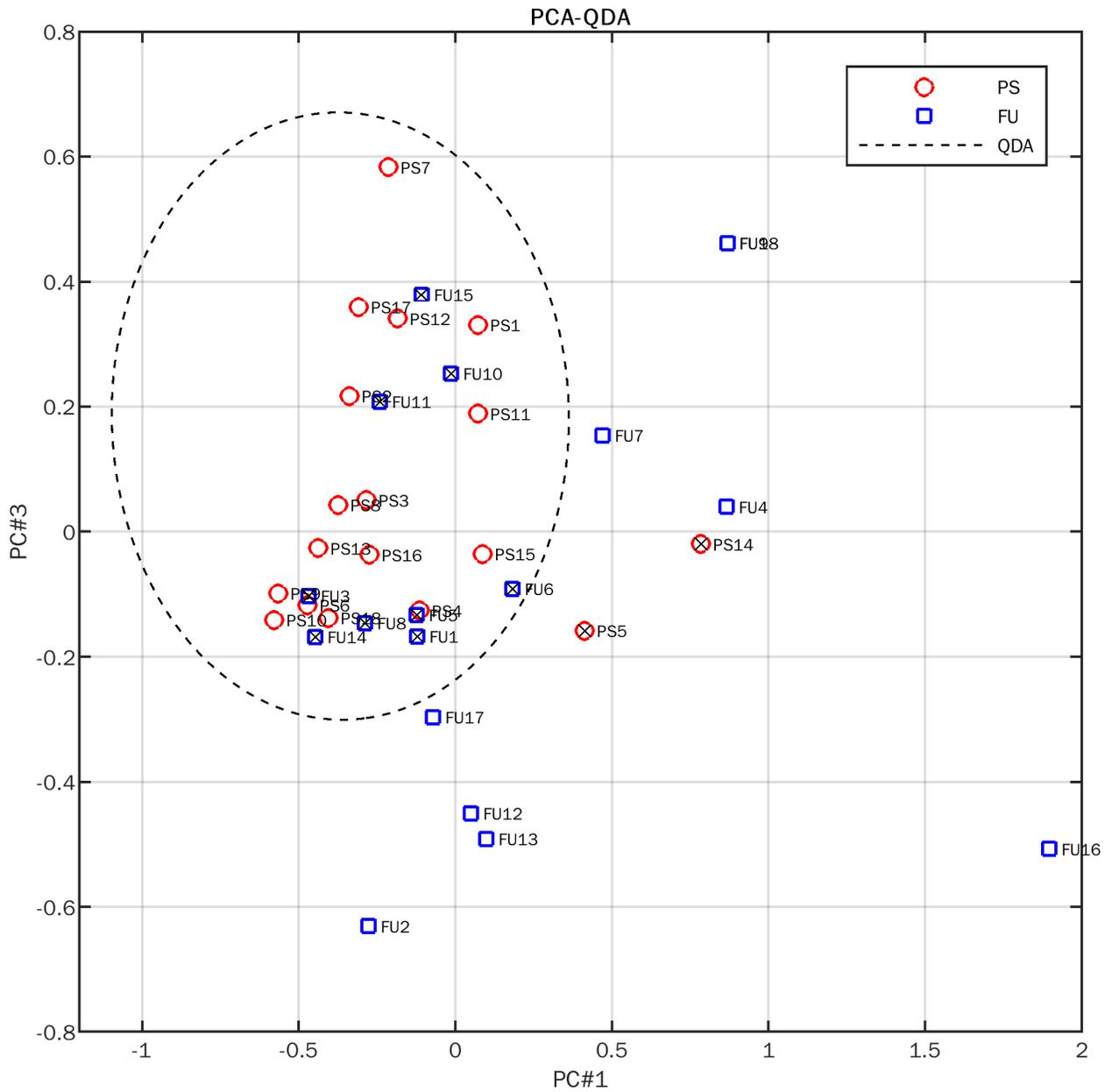


Figura 4.22: Abordaje PCA-QDA para la reducción y clasificación de variables con el score plot seleccionado (PC1 vs PC3).

En la Figura 4.22 se observa que existen clasificaciones erróneas entre las clases observadas, por lo tanto fue necesario emplear una *Matriz de Confusión* para describir el rendimiento del clasificador QDA aplicado al PCA. En dicha representación se analiza la clase verdadera, es decir, las mediciones realizadas, y la clase predecida, la cuál representa la predicción en la cuál esta basada el clasificador cuadrático (Figura 4.23). La interpretación de la CM indica que de las 18 mediciones analizadas para el seguimiento (FU), 9 fueron correctamente clasificadas, mientras que las otras 9 mediciones restantes fueron clasificadas erróneamente como medición de la pre-cirugía (PS). Por otro lado, de las 18 mediciones para el la pre-cirugía (PS), 16 fueron clasificadas correctamente, mientras que 2 fueron clasificadas erróneamente.

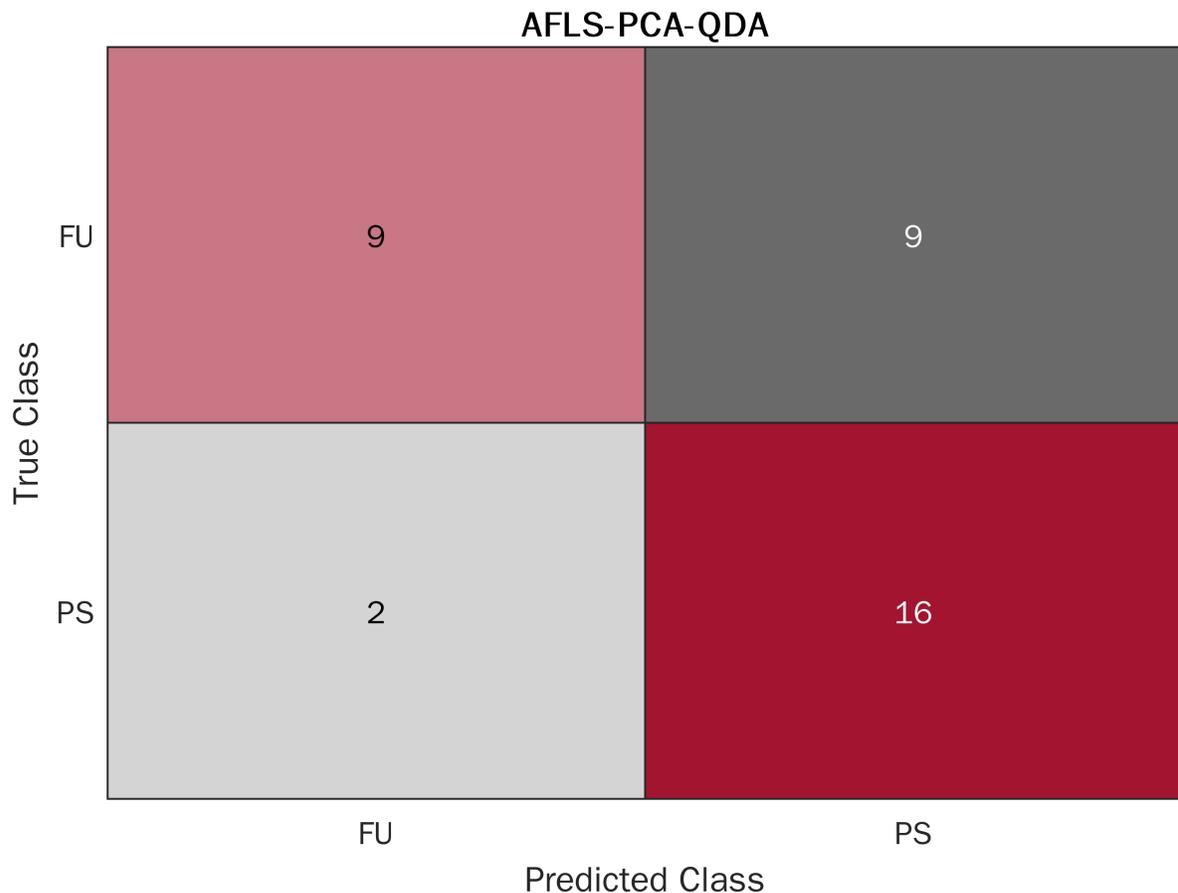


Figura 4.23: Matriz de Confusión (CM, por sus siglas en inglés, *Confusion Matrix*) para el abordaje PCA-QDA.

A partir de esta representación, es posible establecer un *Clasificador Binario*, utilizo para clasificar de forma un conjunto de datos de acuerdo a las clases de interés, y posteriormente, determinar el número de *Verdaderos Positivos* (observaciones positivas clasificadas positivamente), *Verdaderos Negativos* (observaciones positivas clasificadas negativamente), *Falsos Positivos* (observaciones negativas clasificadas positivamente) y *Falsos Negativos* (observaciones negativas clasificadas negativamente):

- Verdaderos Positivos: $TP = 9$.
- Verdaderos Negativos: $TN = 9$.
- Falsos Positivos: $FP = 2$.
- Falsos Negativos: $FN = 16$.

De acuerdo a los principios del clasificador binario, las clases de interés para este estudio fueron los espectros obtenidos durante la pre-cirugía (Clase Negativa) y durante el seguimiento (Clase Positiva). En base a los resultados observados en la Figura 4.23 , ahora es posible definir los parámetros del clasificador, los cuales se utilizan para evaluar su rendimiento. La *Resolución* (en inglés, *Accuracy*) indica el porcentaje de las predicciones que son correctamente clasificadas para cada clase, obtenido al sumar los datos que fueron clasificados correctamente para cada clase (PS y FU) dividido entre el número total de los datos observados, en este caso, el número total de espectros. La *Sensitividad* se utiliza para indicar el porcentaje de las predicciones correctamente clasificadas exclusivamente, es decir, aquellos datos que fueron clasificados dentro de la clase positiva dividido entre el número total de clasificaciones correctas para ambas clases. A la sensibilidad también se le conoce como *Razón de Verdaderos Positivos*. Finalmente, la *Especificidad* es el parámetro del clasificador utilizado para expresar el porcentaje de clasificaciones erróneas dividido entre el número total de clasificaciones incorrectas. A este parámetro también se le conoce como *Razón de Verdaderos Negativos*. Para el clasificador analizado se obtuvieron los parámetros:

- Resolución (Accuracy).

$$Acc = \frac{TP + FN}{TP + TN + FP + FN} = 0.6944 \rightarrow 69.44 \% \quad (4.2)$$

- Sensitividad (Sensitivity).

$$Sen = \frac{TP}{TP + FN} = 0.36 \rightarrow 36 \% \quad (4.3)$$

- Especificidad (Specificity).

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP} = 0.8182 \rightarrow 81.82 \% \quad (4.4)$$

Adicionalmente, es necesario expresar el *Porcentaje de Error* del clasificador, el cuál indica el número total de clasificaciones incorrectas para ambas clases. Este parámetro es obtenido a partir de la Eq. 4.2 como:

$$Err = 1 - Acc = 1 - 0.75 = 0.3056 \rightarrow 30.56 \% \quad (4.5)$$

Dentro del machine learning es una práctica común utilizar métodos para evaluar el rendimiento de un clasificador. Para estimar el rendimiento del clasificador QDA se utilizó un método de *Validación Cruzada de K-Iteraciones*. En este método, el conjunto de datos a clasificar es dividido k subgrupos, donde un subgrupo se utiliza para validar el conjunto de datos y los restantes $k - 1$ subgrupos se utilizan para el entrenamiento. Utilizando esta aproximación, los scores del PCA se consideraron como el conjunto de datos a clasificar con un método de validación de 10-iteraciones obteniendo una resolución de 63.89% y un porcentaje de error de 36.11%. De esta forma es posible utilizar los PC's seleccionados para encontrar la contribución de los espectros de las proteínas de referencia en los espectros de los pacientes en el espacio de los componentes principales del conjunto de datos original.

Como aproximación final para el estudio de los efectos de la cirugía láser fraccional ablativa (AFLS) por medio de espectroscopía Raman (RS) se analizó la correlación que existe entre los loadings de los PC's seleccionados y los espectros originales correspondientes a la piel. Dicha aproximación también está conformada por el análisis de componentes principales (PCA) para reducción y clasificación de variables, el análisis cuadrático discriminante (QDA) para la clasificación de las variables de interés, así como el análisis de correlación lineal (LCA), también conocido como *Análisis de Correlación Coseno* para encontrar la similitud entre los loadings de los PC's seleccionados con los espectros originales, de esta forma se estableció un criterio de clasificación individualizada para los pacientes que se sometieron a una AFLS. Este abordaje fue propuesto por Alda et Al. 2011 para la detección temprana y no-invasiva de alergia al níquel [94] y su principal ventaja es que al añadir un nuevo espectro a el conjunto de datos, este pueda ser automáticamente clasificado sin tener información previa acerca del estado de la piel, evitando así la necesidad de realizar el estudio completo cada que se añada un nuevo espectro. Esta aproximación PCA-QDA-LCA, originalmente propuesta para realizar un diagnóstico temprano de enfermedades de la piel, es la principal propuesta de esta tesis como herramienta para la valoración de los efectos de cirugías basadas en la luz para enfermedades de la piel.

En el score plot de la Figura 4.24 se muestran los valores de correlación entre el PC1 y el PC1 con los 36 espectros in vivo de las cicatrices de acné. Al igual que la anterior aproximación con PCA, donde se buscaba reducir variables de tal forma que pudiera apreciarse una separación de variables una vez realizada una reducción de dimensiones, el análisis de discriminantes cuadrático (QDA) se volvió a emplear para establecer un criterio de clasificación de acuerdo a el tipo de lesión. En dicha gráfica se puede observar un patrón similar al de la Figura 4.22, donde se muestra el criterio de clasificación obtenido con QDA. Al añadir un nuevo espectro a dicho análisis, este puede ser clasificado de forma efectiva de acuerdo a sus características espectrales. Dicha aproximación depende del conjunto de datos utilizado y puede ser aplicado a cualquier otra enfermedad, sea o no de la piel.

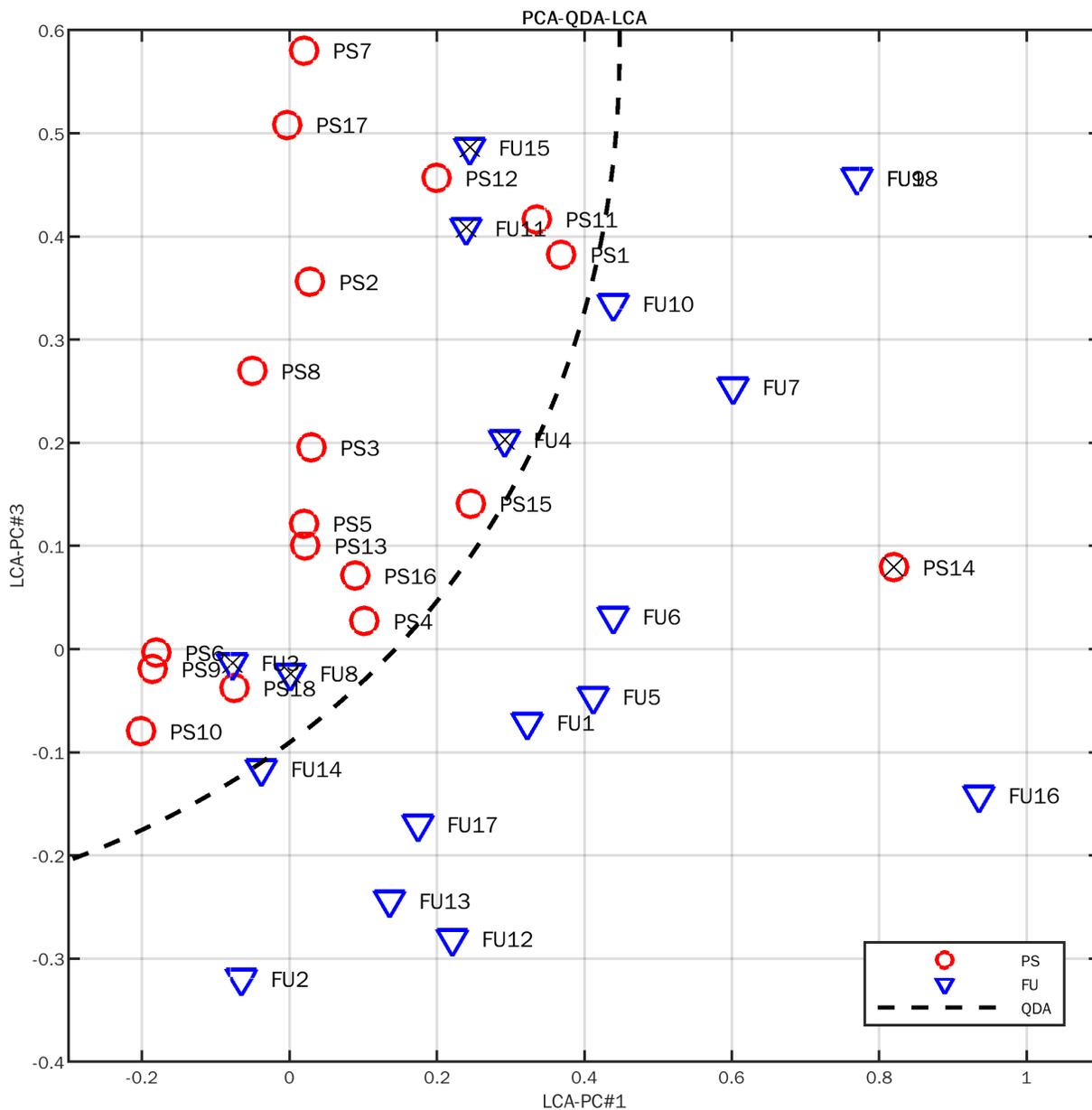


Figura 4.24: Score plot de los valores LCA entre los PC1 y PC3 con los espectros originales correspondientes a las mediciones in vivo de la piel antes (PS) y después (FU) de someterse a una AFLS para cicatrices de acné.

Analizando la matriz de confusión del QDA se obtuvieron los parámetros de clasificación del QDA, así como los parámetros obtenidos para evaluar el rendimiento del clasificador utilizando una validación cruzada de 10 iteraciones (10F-CV). En la Figura 4.25 se observa la matriz de confusión para la aproximación PCA-QDA-LCA, donde se observa un resultado ligeramente mayor al de la aproximación PCA-QDA, esto debido a que los espectros originales son analizados, ahora en términos del resultado obtenido por el PCA. Los parámetros obtenidos del clasificador QDA y su validación fueron:

- Resolución (Accuracy): 83.33 %.
- Sensitividad (Sensitivity): 43.33 %.
- Especificidad (Specificity): 83.33 %.
- Resolución (10F-CV): 77.78 %.
- Error (10F-CV): 22.22 %.

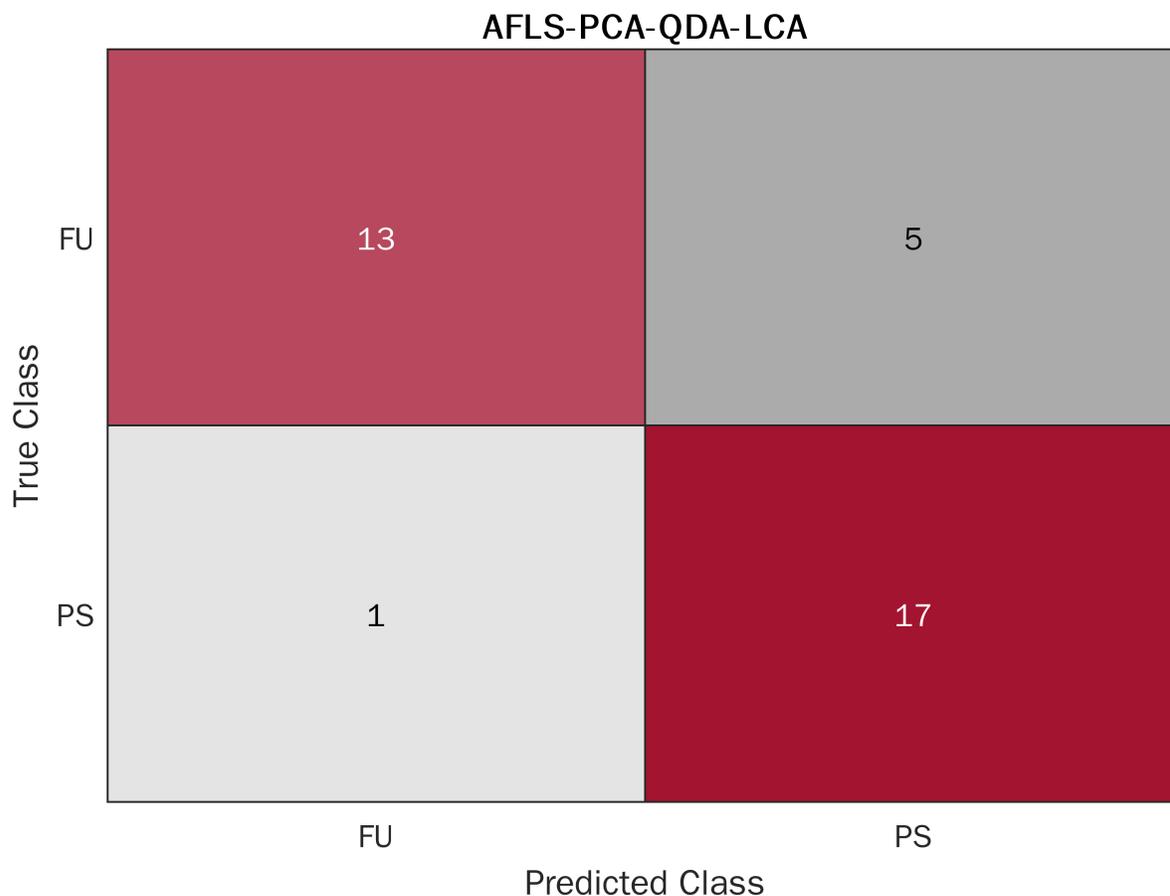


Figura 4.25: Matriz de Confusión para la aproximación PCA-QDA-LCA.

Retomando los espectros de los diferentes tipos de colágenos, ahora se buscó obtener una correlación con los loadings de los PC's seleccionados. Es importante mencionar que al evaluar los loadings, se tengan intensidades negativas o con ordenes de magnitud menores a los espectros originales. En la Figura 4.26 se muestran los espectros de los pacientes durante la pre-cirugía y el seguimiento, los PC's seleccionados y los espectros de los colágenos.

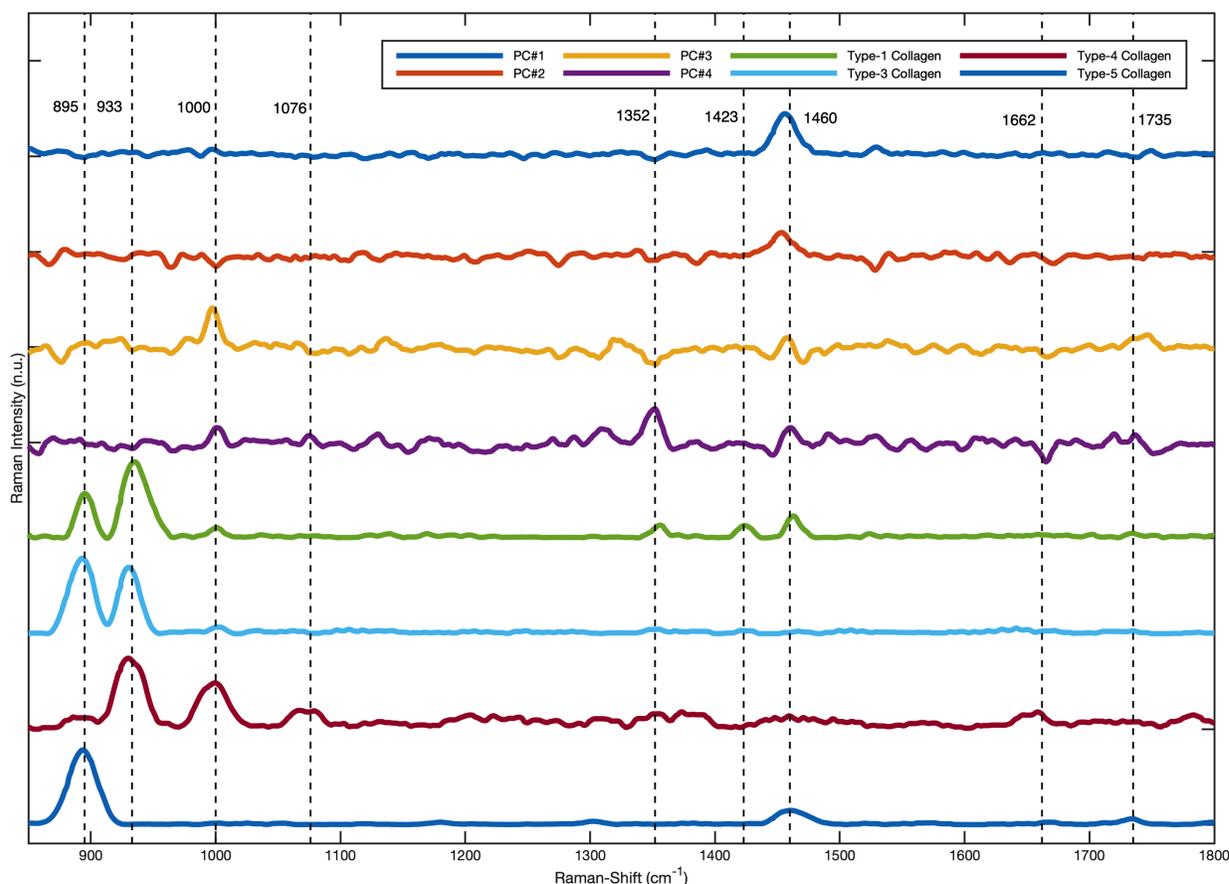


Figura 4.26: Análisis del Perfil de Bandas con los loadings de los PC1, PC2, PC3, PC4 y los espectros de los colágenos. Las líneas punteadas indican la posición de las bandas características en los colágenos.

En la Figura 4.26 se puede observar como los PC's seleccionados presentan las bandas observadas en los espectros de los colágenos, principalmente con el espectro del colágeno tipo-I, el cuál es se mencionó anteriormente, es la proteína con mayor presencia en la piel humana. A pesar de mostrar una mayor cantidad de ruido, el colágeno tipo-IV también mostró diversas bandas que están presentes en los espectros originales así como en los loadings de los PC's. La contribución con el colágeno tipo-III es prácticamente nula, y es solo apreciable en las bandas que están presentes en un rango de $900 - 1000\text{cm}^{-1}$. Por otro lado, tomando el espectro del colágeno tipo-V, se observa solo una contribución en las bandas de 900cm^{-1} y 1460cm^{-1} . Las bandas de interés y sus respectivas asignaciones, así como los espectros de los colágenos donde son observadas dichas bandas se muestran en la Tabla 4.2. La asignación de cada banda se realizó en base a los trabajos de espectroscopía Raman en la piel previamente reportados en la literatura, así como en notas técnicas provenientes de los fabricantes de equipos Raman para aplicaciones médicas. Es importante mencionar que la selección de bandas se realizó tomando exclusivamente las bandas observadas en los espectros de los colágenos, sin considerar bandas adicionales.

Tabla 4.2: Bandas de interés observadas en los espectros Raman de los colágenos, en los pacientes y en los PC's seleccionados, con sus respectivas asignaciones.

Bandas de Interés (cm^{-1})	Colágeno	Asignación
895	I, III, V	Melanina [310]
933	I, III, IV	ν (CC) pralina, valina [311]
1000	IV	ν (C-C) phenylalanine [311]
1076	IV	ν (CC) skeletal
1352	I, IV	Melanina [98]
1423	I	Proteins, lipids, CH ₂ scissoring [311]
1440	I, V	δ (CH) proteins and lipids [311, 312]
1662	IV	Amida I, ν (C=O) α - helix [313]
1735	V	Amida I ν (C=O) [311]

Como complemento a la aproximación PCA-QDA-LCA, se utilizó de nueva cuenta el análisis de correlación lineal (LCA), ahora para cuantificar la presencia los espectros de referencia en los loadings obtenidos con PCA. De esta forma, también es posible correlacionar las bandas características observadas en los loadings con las bandas características observadas en los espectros de referencia, de forma similar al estudio realizado por González et Al 2011 para la detección temprana de dermatitis atópica [92]. Los resultados de dicha aproximación se muestran en la Tabla 4.3. En comparación con el LCA con los espectros originales, se observan valores similares para todos los colágenos. De esta forma se puede concluir que los colágenos tienen una regeneración ya que las bandas de interés son las que presentan una mayor intensidad en el seguimiento de la AFLS.

Tabla 4.3: Valores del LCA entre los espectros de los colágenos con los loadings de los PC's seleccionados.

Proteína	PC1	PC3
T1C	0.07	0.09
T3C	-0.06	0.09
T4C	0.03	0.31
T5C	0.09	0.03

De esta forma se finalizó el estudio de espectroscopía Raman para detectar la presencia de biomarcadores relacionados a el proceso de regeneración de la piel por efectos inducidos de la cirugía láser fraccional ablativa (AFLS). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que se obtuvo una reducción total en la presencia de las cicatrices de acné al final del estudio. De forma cuantitativa, se observó una similitud considerable entre los espectros de los paciente y los espectros de los colágenos medidos experimentalmente al utilizar el análisis de correlación lineal (LCA). Posteriormente, fue de gran interés como se observó

una separación de variables al implementar el análisis de componentes principales (PCA), el cuál se había propuesto originalmente para realizar exclusivamente una reducción de variables. Con este resultado, se requirió de la implementación de un análisis de discriminantes cuadrático (QDA) para poder establecer de forma cuantitativa un criterio de clasificación de acuerdo a los resultados del PCA.

Al profundizar en los resultados obtenidos, se obtuvo una combinación de técnicas (PCA-QDA-LCA) la cuál es el resultado central de esta tesis. De esta forma se establece que la espectroscopía Raman es una técnica que puede utilizarse efectivamente como herramienta para monitoreo de enfermedades dermatológicas, así como para la valoración de sus respectivos tratamientos.

4.6. Clasificación y Discriminación de Cicatrices de Acné utilizando Mediciones de Espectroscopía de Reflectancia Difusa In Vivo

Una vez realizados los estudios para el monitoreo y evaluación de la piel regenerada, fue necesario evaluar el proceso de cicatrización de la lesión por medio del eritema inducido por la AFLS. Al utilizar un láser de alta energía, la piel bajo el tratamiento de la AFLS sufrió una lesión que, con el cuidado apropiado, fue disminuyendo. Como medición complementaria a las técnicas DITI y RS, se realizaron mediciones de espectroscopía de reflectancia difusa (DRS) para valorar la evolución del eritema de forma in vivo en la superficie facial de los pacientes, de esta forma, la cicatrización de la herida se pudo validar de forma cuantitativa y no-invasiva.

Durante la medición PS se obtuvieron 20 espectros y durante la medición FU se obtuvieron 24 espectros cubriendo las zonas del visible (VIS) y del cercano infrarrojo (NIR) del espectro electromagnético. El equipo utilizado fue un espectrómetro Ocean Optics Jaz, el cuál tiene integrada una fuente de iluminación de tungsteno-halógeno con un rango espectral de $450 - 1100nm$, relación señal a ruido (SNR) de $250 : 1$ y una resolución óptica (FWHM) de $1.3nm$ (Figura 4.27) utilizando como guía de iluminación una sonda bifurcada Ocean Optics $R400 - 7 - VIS - NIR$ cuyo rango optico es de $400nm - 2.1\mu m$. Como primera aproximación se utilizaron las mismas técnicas planteadas en la sección 4.5, utilizando un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de discriminantes lineal (LDA) para reducción y clasificación de datos. Para esta aproximación el interés fue exclusivamente establecer una clasificación de los espectros y así poder justificar el estudio de los índices de melanina y del eritema inducido por la AFLS.



Figura 4.27: Espectrómetro Ocean Optics Jaz.

El pre-procesado de los espectros DRS se llevo a cabo utilizando la metodología propuesta por González et Al. [60], para estandarizar de espectros al utilizar una medición de referencia y una medición del ruido del detector. Además, se incluyó una etapa de filtrado utilizando filtro digital Savitzky-Golay, detección y eliminación de outliers, así como una etapa de normalización utilizando el área bajo la curva. En la Figura 4.28 se observa el espectro DRS de la piel sana. Adicionalmente a lo reportado, para tomar mediciones DRS con el espectrómetro utilizado, es necesario esperar un lapso de $10 - 20min$ con el objetivo de que el detector se estabilice, y las lecturas sean mas precisas, de lo contrario, la señal obtenida se verá ordenes de magnitud menor que la señal generada por el ruido del detector, principalmente en el rango del UV ($100 - 400nm$).

Para realizar las mediciones DRS en este experimento se realizo la medición del blanco estandard a $90deg$ de la superficie del blanco, posteriormente se realizó la medición del ruido del detector. Posteriormente se volvió a colocar la sonda óptica a $90deg$ sobre la superficie de la muestra durante $30min$ para estabilizar las mediciones del detector. Durante la etapa de estabilización se tomaron espectros cada $5min$ y se almacenaron para una posible corrección en la normalización, la cual no fue necesaria en este experimento. Finalmente los espectros se tomaron directamente a $90deg$ sobre la superficie facial antes (PS) y despues (FU) de la AFLS. Los tiempos entre las mediciones son los mismos que los tratados en las dos secciones anteriores para el estudio DITI (sección 4.4) y RS (sección 4.5) de las cicatrices de acné bajo tratamiento con una AFLS.

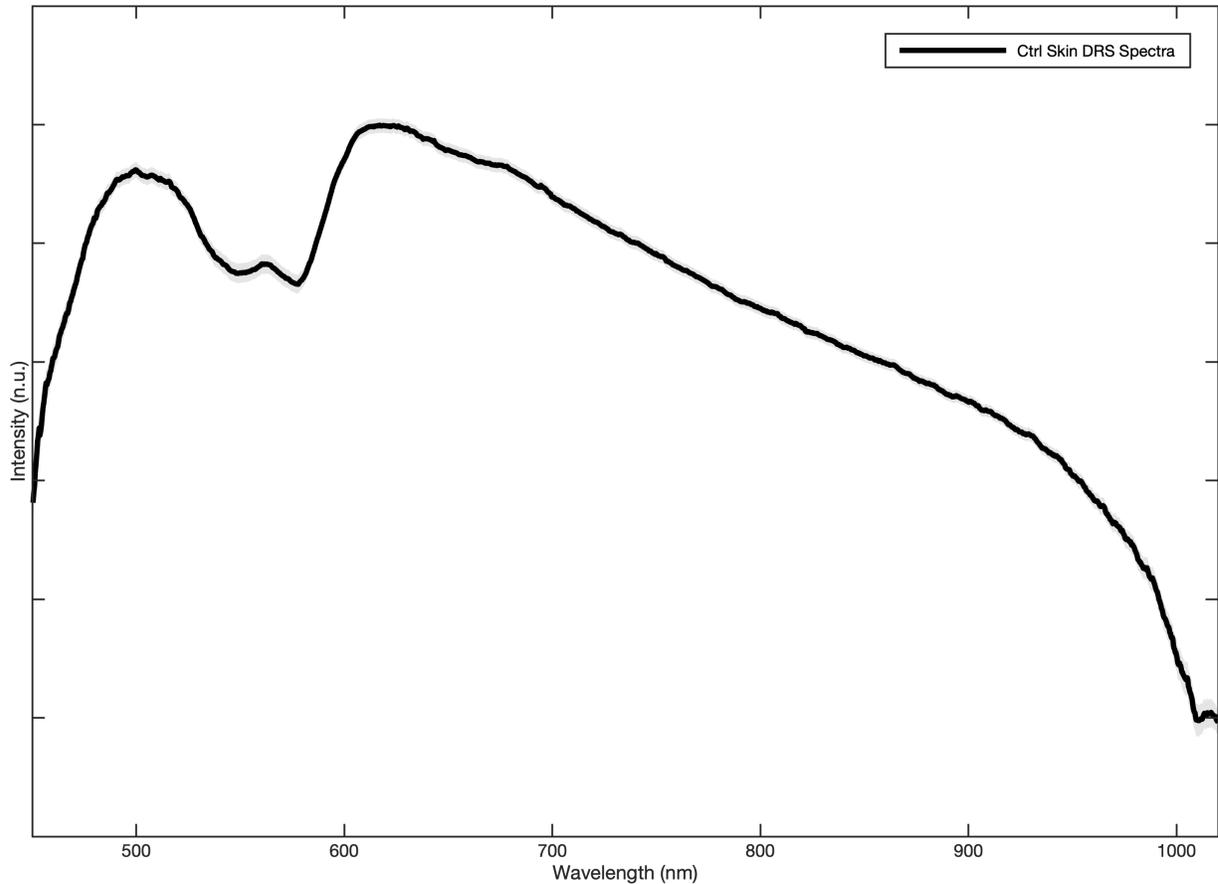


Figura 4.28: Espectro DRS de la piel sana.

El espectro de la piel sana muestra un bajo grado de variación, mucho menor a los espectros analizados para este estudio, que se presentaran mas adelante. Dicha variación observada es a consecuencia de la selección de la zona de adquisición, en donde se tomo la superficie superior del antebrazo, cerca de la región de la axila, a diferencia que el estudio de la sección anterior, donde se tomó la superficie del flexural del codo. A diferencia de la espectroscopía Raman, las mediciones de reflectancia difusa si pueden presentar contribuciones de las venas, sudoración, etc. Por dicha razón, los espectros de control se excluyeron del análisis. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 4.29, donde se observa una clara diferencia entre la pre-cirugía y el seguimiento, específicamente en el rango de $400 - 600nm$, el cuál esta dominado por la presencia de la melanina [314]. Al realizar un test de Wilcoxon entre los espectros de ambos grupos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de $p = 4.82e^{-7}$.

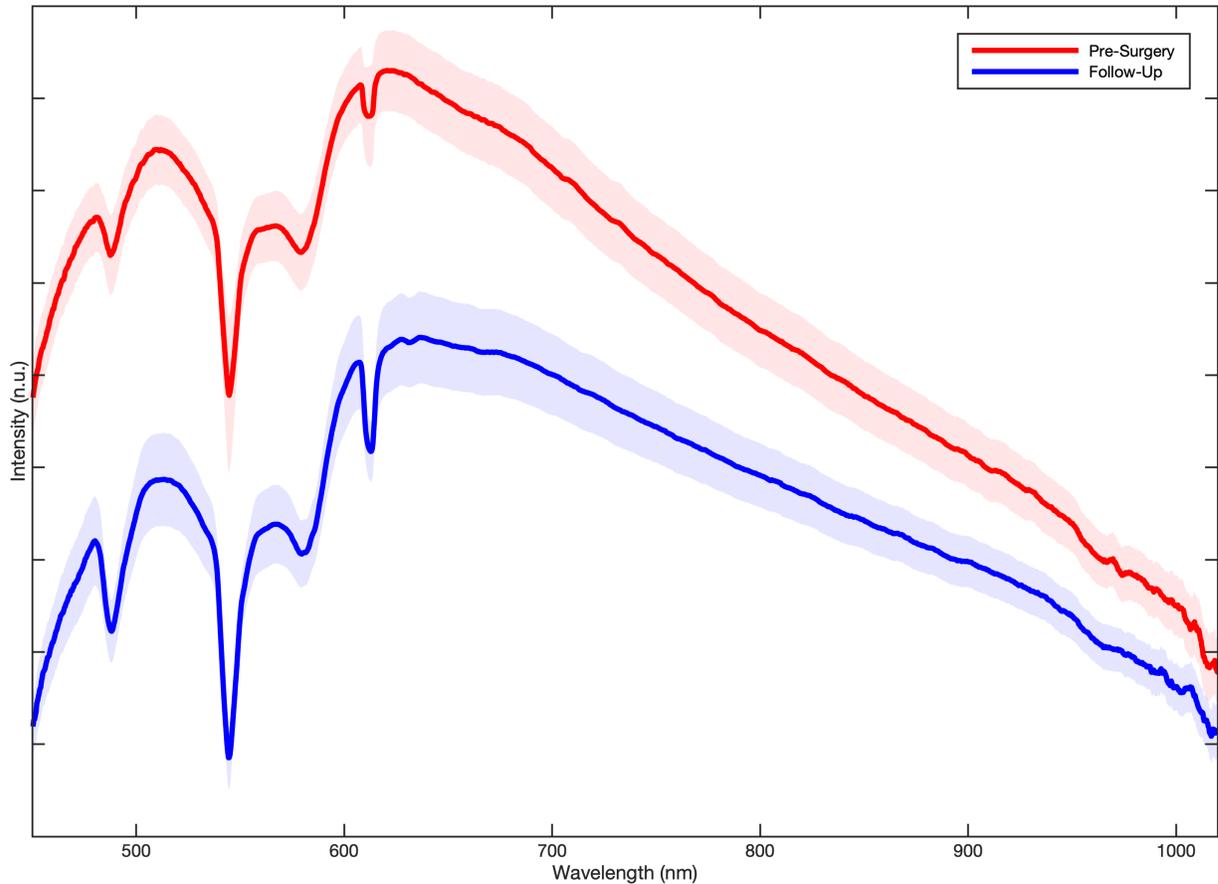


Figura 4.29: Espectros DRS para la pre-cirugía (PS) y el seguimiento (FU).

Para establecer una diferencia mas precisa de los espectros, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para reducción de datos combinado con un análisis discriminante lineal (LDA) para la clasificación de variables, de la misma forma que con los espectros Raman. En la Figura 4.30.A se muestra el porcentaje de la varianza total acumulada, mientras que en la Figura 4.30.B se muestra el porcentaje total de la varianza individual. En dichos scree plots se observa que, a donde a diferencia del PCA realizado con los espectros Raman, la mayor parte de la varianza se encuentra en los primeros PC's, por lo tanto, se consideraron el PC1 (89.13%) y el PC2 (7.39%) para realizar un análisis mas completo (con un 96.53% de varianza total acumulada). Como se puede observar en la Figura 4.29, la principal diferencia entre espectros se encuentra en la región del visible y en la región del cercano infrarrojo la diferencia es prácticamente nula, por lo tanto, con los PC's seleccionados se busca trabajar con esta variación exclusivamente.

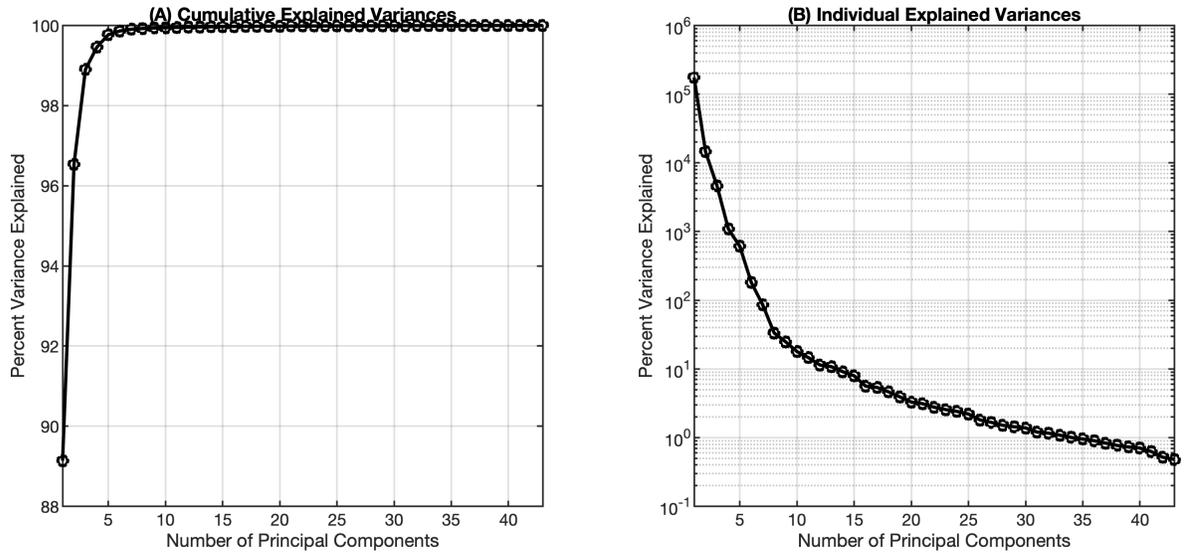


Figura 4.30: Varianzas explicadas para cada PC de los espectros DRS.

A diferencia de los espectros Raman, los espectros DRS muestran menor variabilidad en intensidades debido a que la medición proporciona información menos específica que la espectroscopía Raman, donde se analizan vibraciones a nivel molecular. En la DRS se analizan las características de la muestra en función de la longitud de onda que incide sobre ella, por lo tanto, el espectro DRS es más amplio, mostrando bandas específicas en la piel correspondiendo a la hemoglobina, la melanina o el agua. Al analizar el score plot de los PC's seleccionados fue posible observar una clara separación de variables, la cuál se pudo comprobar al añadir una clasificación con LDA (Figura 4.31). Esta aproximación es similar a la que se presentó en la sección 4.5, con la diferencia de que se busca determinar un monitorear la presencia de la melanina, la cuál incrementa en la zona donde se ubica el eritema inducido por la AFLS, para posteriormente mostrar un decremento considerable como efecto de la regeneración de la piel. En una primera instancia se consideró adquirir un espectro del eritema directamente sobre la piel en un instante de tiempo mínimo tras el cuál se efectuó la AFLS, pero por cuidado y precaución del paciente, dicha medición no pudo efectuarse. Complicando aún más la medición, durante un seguimiento realizado una semana y media después, el eritema había desaparecido prácticamente, aunque varios pacientes analizados continuaban presentando sensación de dolor en las zonas irradiadas, por lo tanto, dicha medición tampoco pudo ser realizada. Por lo tanto, con la medición de seguimiento realizada un mes después de la AFLS se buscó caracterizar la reducción del eritema, el cuál desapareció en todos los pacientes analizados y fue cuantificada en la sección 4.5.

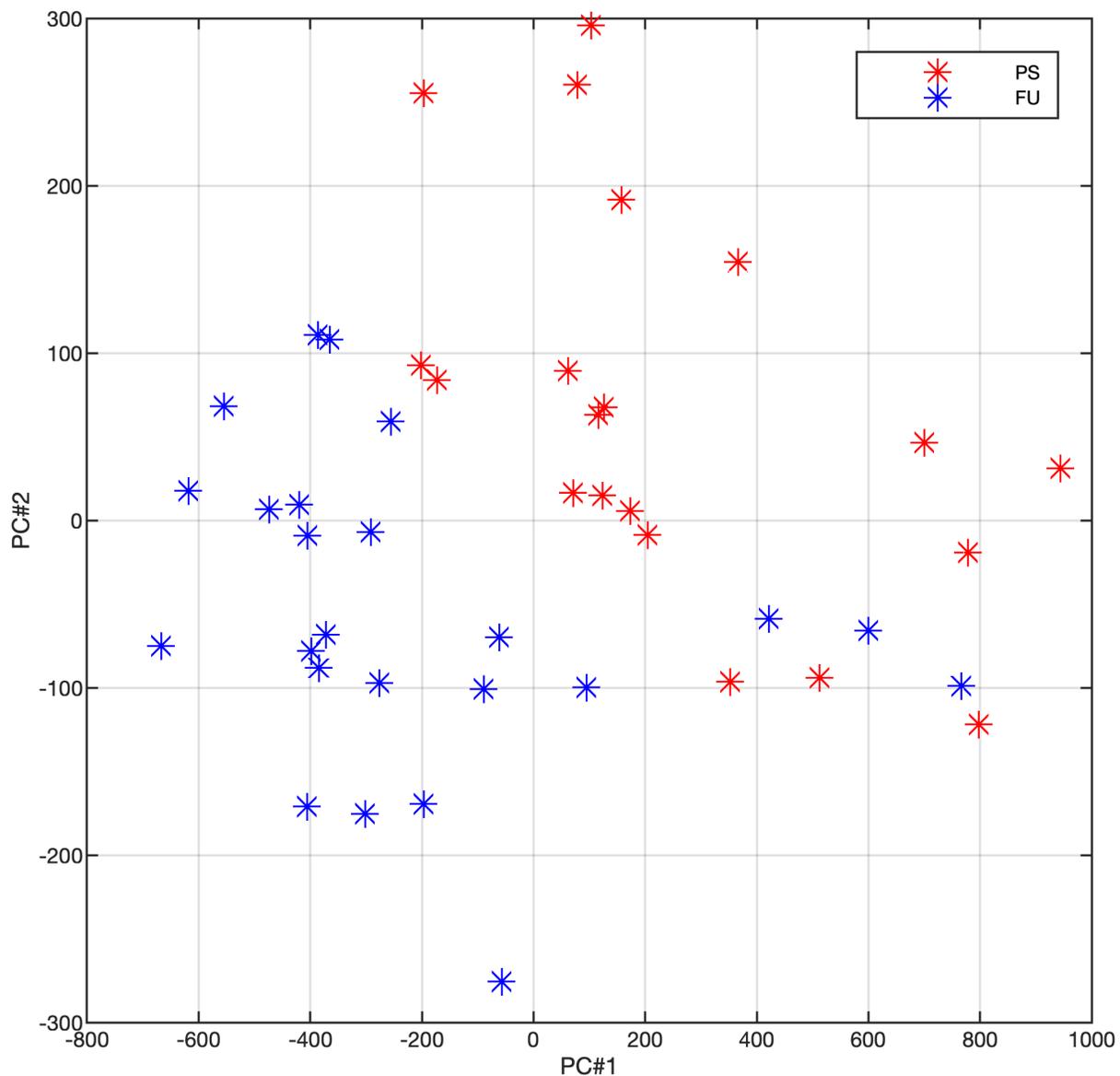


Figura 4.31: Score plot de los PC's seleccionados para el análisis de espectros DRS.

Analizando los loadings correspondientes a los PC's, se observa la variación buscada en el rango del visible (Figura 4.32). En el rango del cercano infrarrojo se observan intensidades diferentes en cada PC, lo cuál puede interpretarse en la contribución que tiene cada uno sobre el conjunto de datos original. Al ser nula la variación en dicha zona, los loadings muestran la misma información. En la zona de interés, se observan bandas en $412, 431, 447, 487, 544, 585, 612\text{cm}^{-1}$ en el PC1, dichas bandas están directamente relacionadas con la melanina. De forma análoga, en el PC2 se observan bandas con altas intensidades en $432, 533, 573\text{cm}^{-1}$ y otras en $360, 367, 385\text{cm}^{-1}$ las cuales se encuentran en el rango del UV y no son consideradas para esta aplicación.

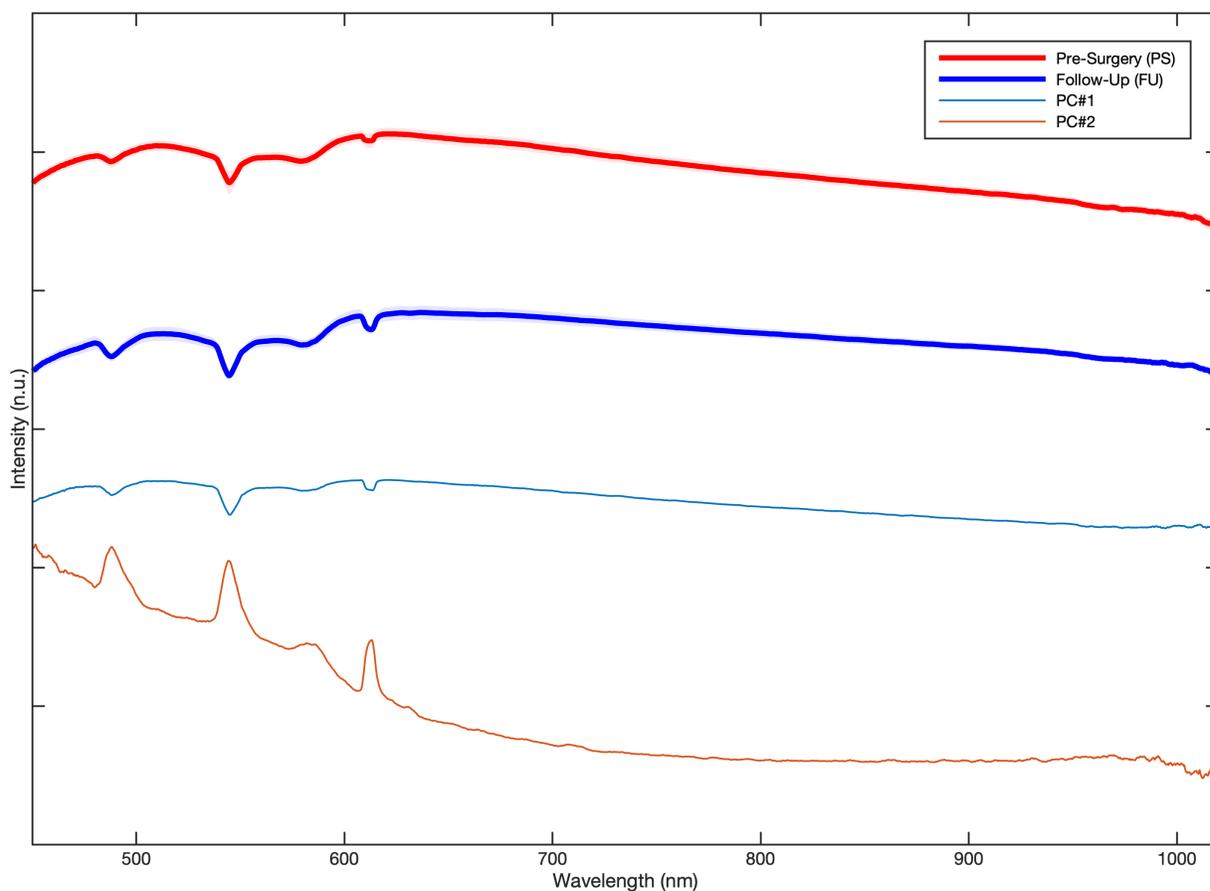


Figura 4.32: Loadings plot de los PC's seleccionados.

Al integrar el análisis de discriminantes cuadrático se estableció un criterio para la separación y clasificación de las zonas con cicatrices donde se incidió el láser (Figura 4.33). Debido a la notable separación observada, se consideró el uso de un *Análisis de Discriminantes Lineal* (LDA, por sus siglas en inglés, *Linear Discriminant Analysis*), aunque se siguieron obteniendo mejores resultados con el QDA, por lo que fue descartado de este estudio. En la Figura 4.33 se observa el QDA con un patrón similar a un LDA para la clasificación de variables. De los 20 espectros obtenidos para la medición de la pre-cirugía (PS), 1 fue clasificado erróneamente y de los 24 espectros obtenidos para la medición de seguimiento (FU), 3 de ellos fueron clasificados erróneamente. Aunque PCA no es la técnica más adecuada ni la más común para el análisis de espectros DRS, la separación de variables fue más clara que la obtenida para los datos de espectroscopía Raman. Posteriormente se abordará otra metodología más común para el procesamiento de espectros DRS para la evaluación de los índices de melanina y del eritema.

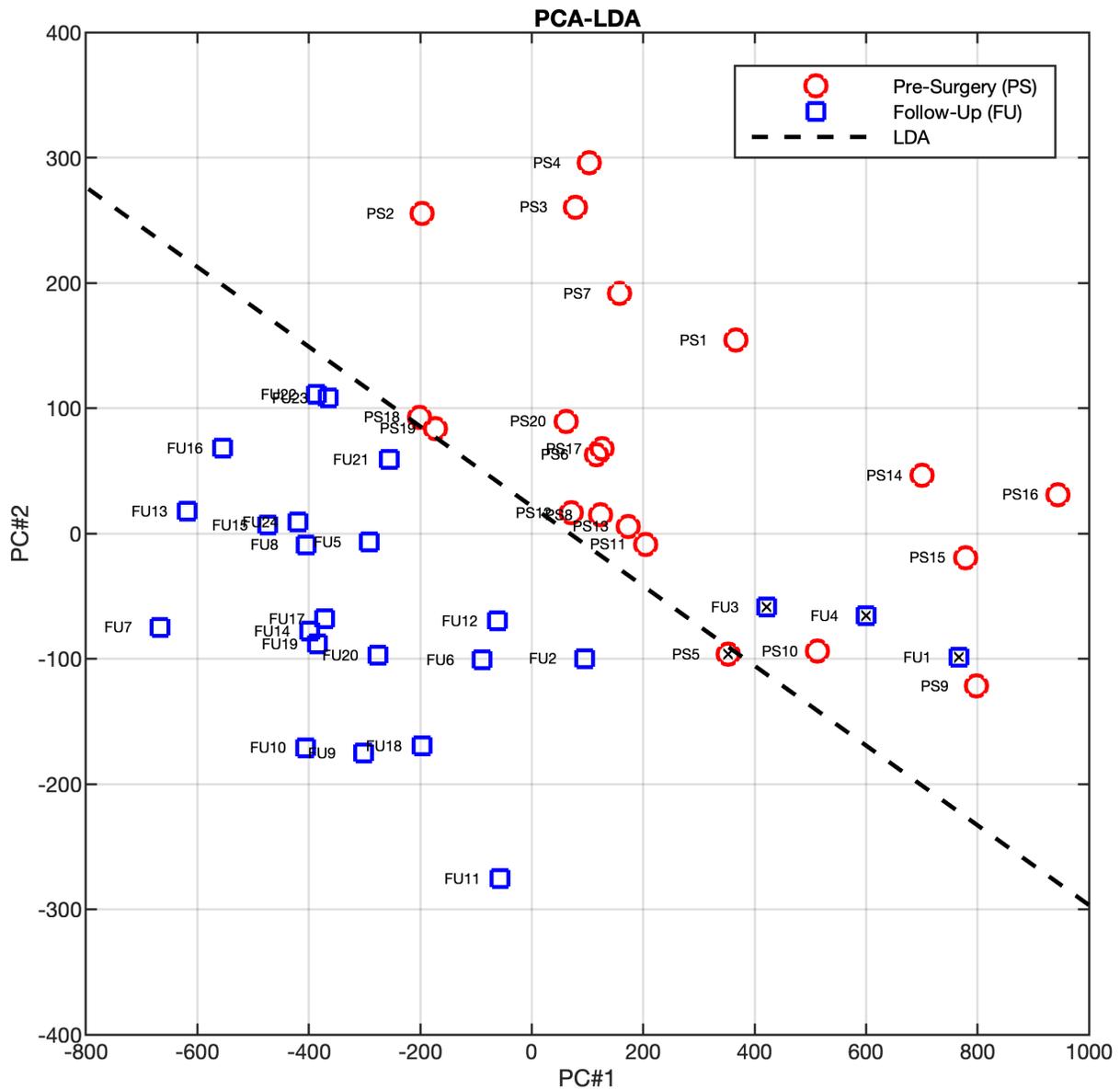


Figura 4.33: Score Plot PCA-LDA para los Espectros DRS.

De forma similar a la sección anterior, se utilizó una matriz de confusión para evaluar el rendimiento del clasificador lineal (LDA), y en base a los valores observados, se calcularon los parámetros de clasificación abordados previamente. La matriz de confusión se observa en la Figura 4.34. Finalmente, al aplicar una validación cruzada con 10 iteraciones se obtuvo una resolución de 81.82% y un porcentaje de error de 18.18%. De igual forma, que con el score plot, la clasificación observada en la matriz de confusión para espectros DRS fue mas precisa que la obtenida para los espectros Raman, por lo tanto, esto dio como resultado valores mas altos en los parámetros de clasificación:

- Verdaderos Positivos: $TP = 21$.
- Verdaderos Negativos: $TN = 3$.
- Falsos Positivos: $FP = 1$.
- Falsos Negativos: $FN = 19$.
- Resolución (Accuracy): $Acc = 90.91\%$.
- Sensitividad (Sensitivity): $Sen = 52.50\%$.
- Especificidad (Specificity): $Spe = 75\%$.
- Error (Err): $Err = 9.09\%$.
- Resolución (10-Fold CV Accuracy): $Acc(10F - CV) = 81.82\%$.
- Error (10-Fold CV Err): $Err(10F - CV) = 18.18\%$.

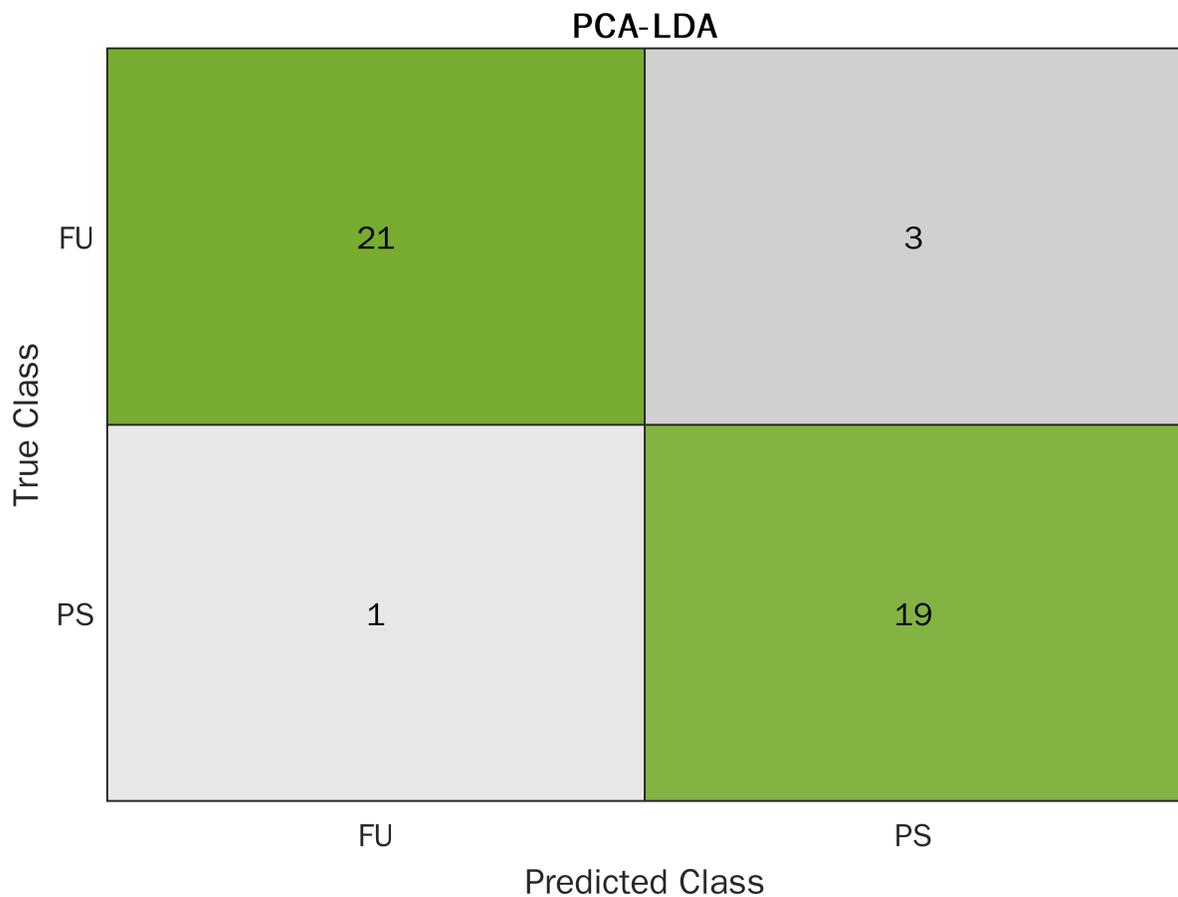


Figura 4.34: Matriz de confusión para los espectros DRS procesados con PCA-QDA.

4.7. Evaluación de la Pigmentación y del Eritema Inducido por medio de Espectroscopía de Reflectancia Difusa In Vivo

Para la parte final del análisis de los efectos de la AFLS se consideró evaluar la apariencia de la piel regenerada, al monitorear el índice de melanina para determinar la pigmentación de las zonas con cicatrices de acné que fueron irradiadas por el láser. También fue importante estudiar la evolución del eritema inducido por la AFLS, ya que aunque no se observaron efectos adversos, la apariencia visual de la piel es de gran importancia ya que al no considerar su evaluación, pudiera generar un descuido por parte del paciente, lo que eventualmente daría como resultado un relapso o inclusive una cicatrización incompleta, generando así una carga emocional adicional. Las evaluaciones se llevaron a cabo utilizando las mediciones de espectroscopía de reflectancia difusa presentadas en la sección anterior para evaluar la pigmentación y la evolución del eritema inducido por la AFLS [315].

Apartir de los experimentos reportados por Stamatias et Al. [316, 317] para la valoración del cuidado de la piel utilizando técnicas ópticas, de la aproximación propuesta por González et Al. 2010 [60] para determinar el índice de melanina a partir de mediciones DRS, y del estudio presentado por Zonios et Al. para estudios de la piel y la detección no-invasiva de *Melanoma* [318], se analizaron los espectros antes y después de la AFLS. Es importante mencionar que en el estudio de referencia se analizó un solo espectro por paciente. En este trabajo se volvieron a considerar los espectros de las lesiones que fueron irradiadas con el láser, por lo tanto información previa relacionada con el fototipo no fue considerada. A partir de las mediciones DRS es posible determinar el espectro de *Absorbancia Aparente* (AA), definido como el negativo del logaritmo base 10 de los espectros DRS, expresado por la ecuación:

$$AA = -\log_{10}(DRS) \quad (4.6)$$

Donde DRS corresponde a los espectros DRS para las mediciones de pre-cirugía (PS) y seguimiento (FU). El término de *Absorbancia Aparente* se debe a el hecho de que dicho espectro es obtenido de forma indirecta a partir de mediciones de reflectancia difusa. En la Figura 4.35 se observan los espectros obtenidos para cada medición. A diferencia de la sección anterior, para este estudio se consideró el rango del espectro electromagnético que va del visible al cercano infrarrojo (450 – 800nm). En las gráficas se observan bandas pronunciadas en 488, 544, 580 y 630nm con una diferencia en intensidad entre ambas mediciones, PS y FU.

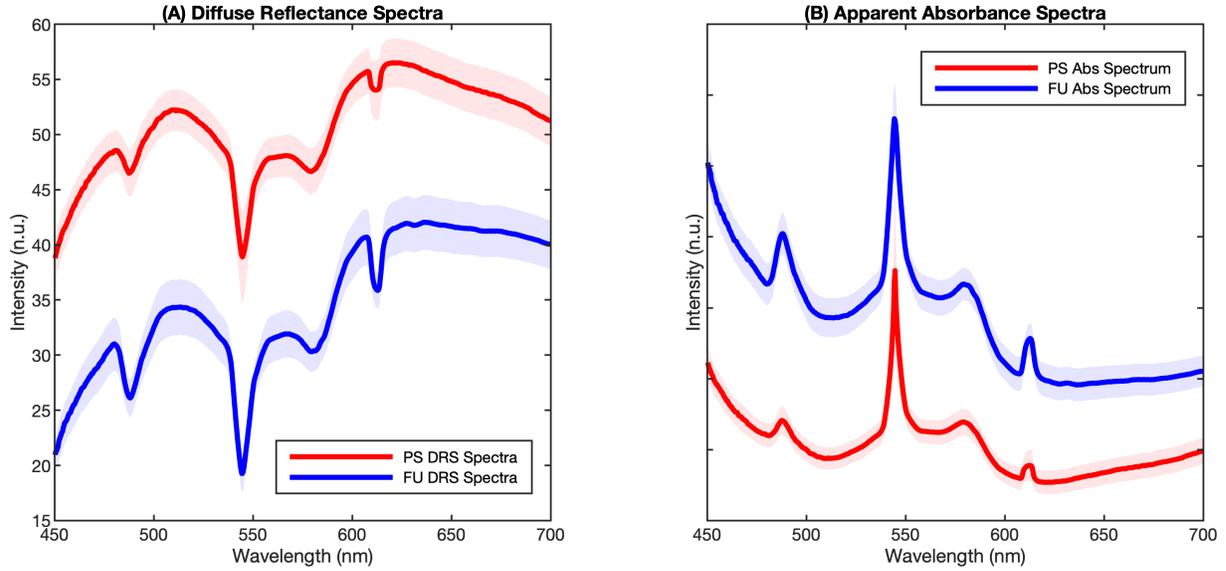


Figura 4.35: Espectros obtenidos para la (A) Reflectancia Difusa y la (B) Absorbancia Aparente en un rango de 450 – 800nm.

De acuerdo a Kollias et Al. y Stamatias et Al., la contribución de la melanina en el espectro de absorbancia en la piel se considera como la pendiente observada en el intervalo de 630 – 700nm [317, 319], por lo tanto puede aproximarse por medio de la ecuación de la recta como:

$$Am(\lambda) = a * \lambda + b \quad (4.7)$$

Donde Am indica la contribución de la melanina en los espectros de absorbancia. Para este trabajo, de igual forma que en la literatura, se considero un intervalo de $\lambda = 630 - 700nm$ a pesar de observarse una considerable variación de resultados debido principalmente a los equipos de medición, así como en los parámetros de adquisición de los espectros. Es muy importante mencionar que las mediciones se realizaron de forma in vivo, razón por la que las señales obtenidas contienen una alta contribución del ruido debido a los artefactos de movimiento del usuario y sobre todo, del paciente, quien estaba en proceso de someterse a una cirugía, razón por la cuál la carga emocional era considerable. Realizando la aproximación indicada, se obtuvieron las contribuciones de la melanina en los espectros de la pre-cirugía (PS) y del seguimiento (FU), como se puede apreciar en la Figura 4.36.

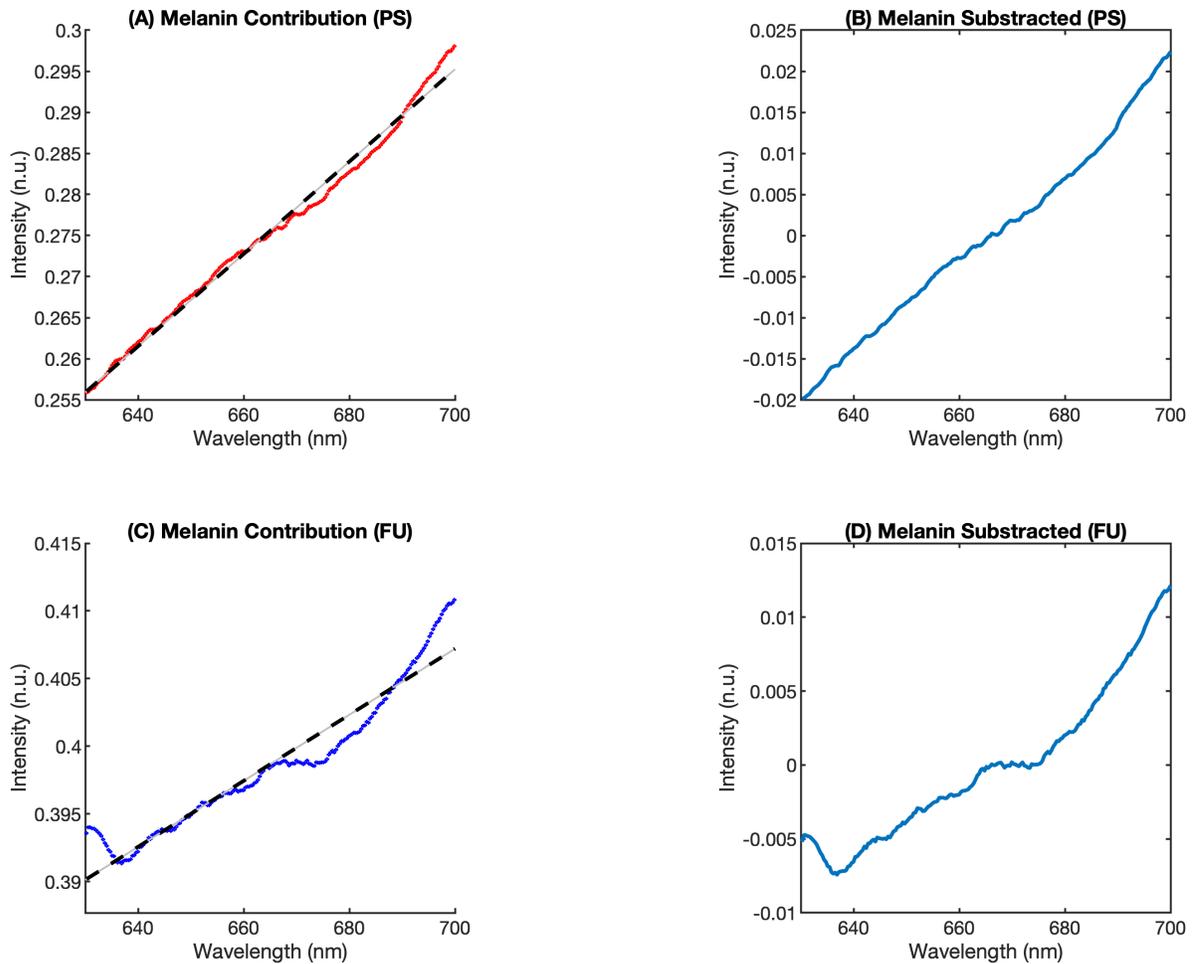


Figura 4.36: Contribución de la melanina y su ajuste para las mediciones (A-B) PS y (C-D) FU.

En la Figura 4.36.A se observa la contribución de la melanina en los espectros tomados antes de la cirugía (PS) y su respectivo ajuste, mientras que en la Figura 4.36.B se observa el ajuste realizado. Por otro lado, en la Figura 4.36.C se observa la contribución de la melanina en los espectros tomados durante el seguimiento (FU), con una variación considerable con respecto a la medición PS. El ajuste realizado se muestra en la Figura 4.36.D. Una vez obtenido el ajuste de la contribución de la melanina, fue necesario realizar una corrección, esto debido a que la contribución la proteína *deoxy-Hemoglobina* (*deoxy-Hb*), principal absorbente de luz sobre la superficie de la dermis [87], es la misma que la melanina en el rango de los $630 - 700\text{nm}$, que fue donde se realizó el ajuste de la contribución de la melanina, por lo tanto debe de ser extraído del espectro de absorbancia [320]. Al resultado se le conoce como *Espectro de Absorbancia Corregido* (Ac) (Figura 4.37), el cuál mantiene las bandas en 488, 544, 580 y 630nm .

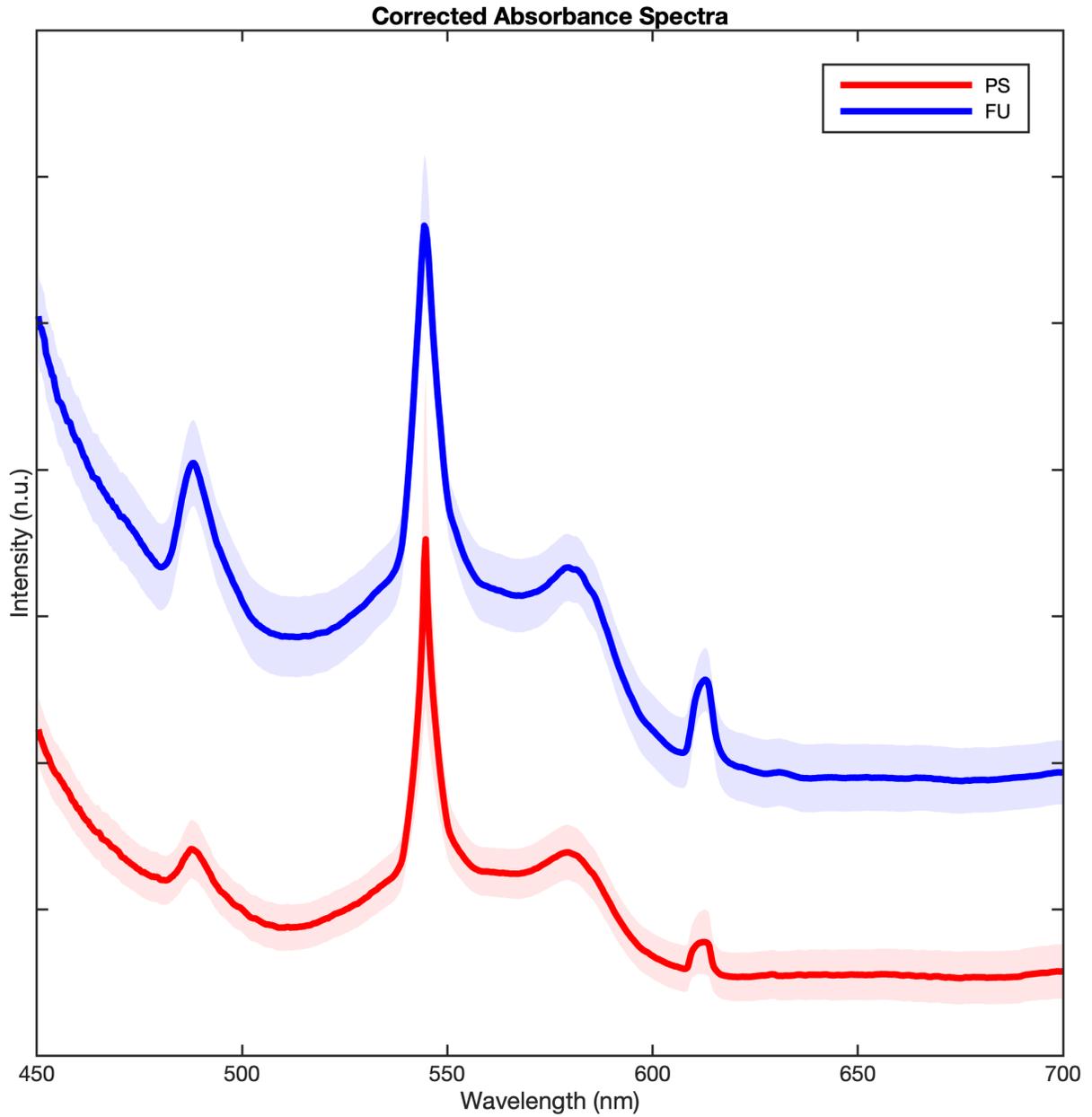


Figura 4.37: Espectro de Absorbancia Corregido para las mediciones PS y FU.

Una vez obtenido el espectro de absorbancia corregido, fue posible determinar la concentración de deoxy-Hb y oxy-Hb utilizando el sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas dado por:

$$oxy - Hb = \frac{\epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_1) * Ac(\lambda_2) - \epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_2) * Ac(\lambda_1)}{\epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_1) * \epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_2) - \epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_2) * \epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_1)} \quad (4.8)$$

$$oxy - Hb = \frac{\epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_2) * Ac(\lambda_1) - \epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_1) * Ac(\lambda_2)}{\epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_1) * \epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_2) - \epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_2) * \epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_1)} \quad (4.9)$$

Donde ϵ_{oxy-Hb} y $\epsilon_{deoxy-Hb}$ son los coeficientes de extinción para la oxy-Hb y deoxy-Hb respectivamente. Tomando dos longitudes de interés, $\lambda_1 = 560nm$, correspondiente a un máximo en la deoxy-Hb y $\lambda_2 = 580nm$ la cuál corresponde a un máximo en la oxy-Hb (Figura 4.38). Utilizando las bases de datos de Steven L. Jacques y Scott Prahl, se consideraron valores de $\epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_1) = 3261.2$, $\epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_1) = 53788$, $\epsilon_{oxy-Hb}(\lambda_2) = 50104$ y $\epsilon_{deoxy-Hb}(\lambda_2) = 37020$ [321].

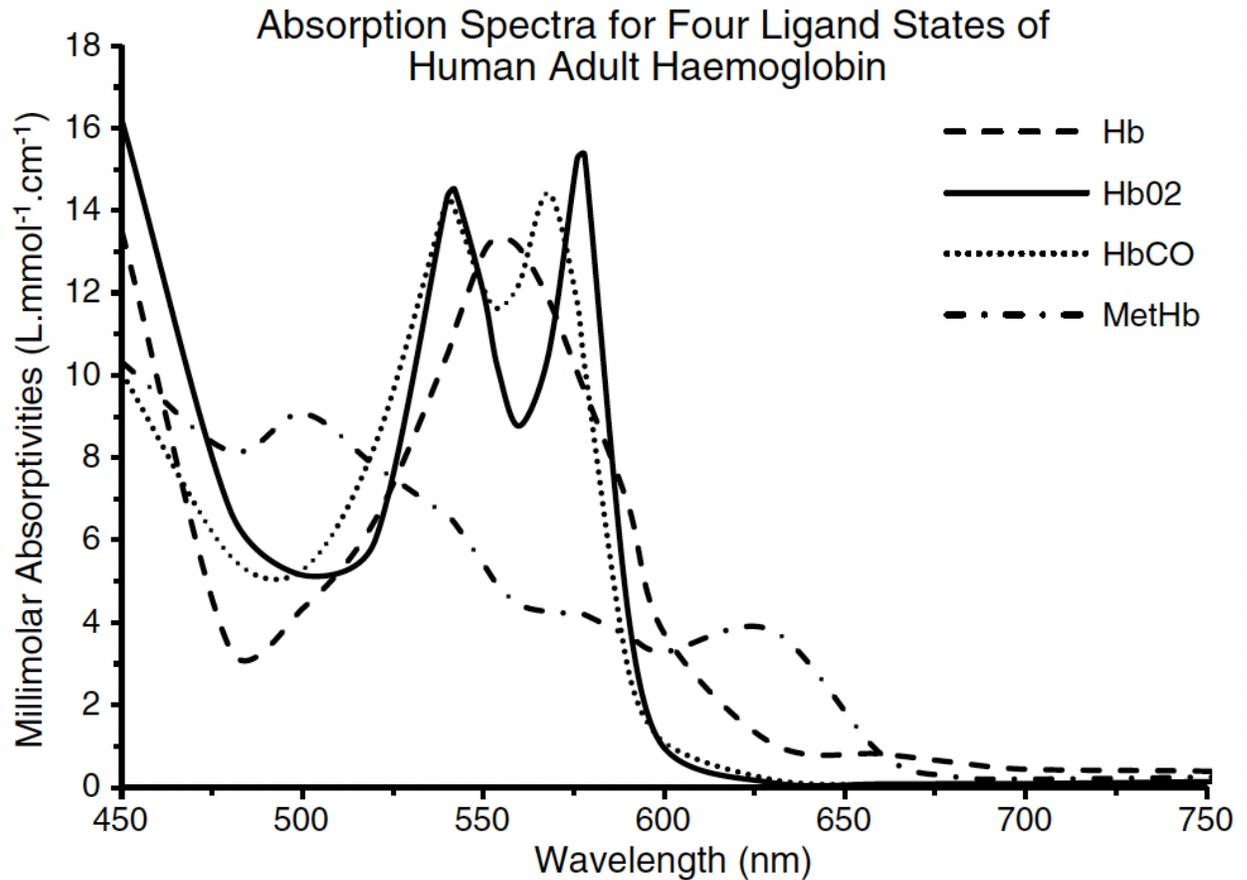


Figura 4.38: Espectro de Absorbancia para la deoxy-Hb y oxy-Hb donde se observan los máximos en 560 y 580 nm. Imagen adaptada de [322] y [87].

Con los valores obtenidos para las concentraciones de la deoxy-Hb y oxy-Hb se realiza una mejora a el ajuste realizado para la melanina. Ahora, partiendo de la aproximación propuesta por González et Al. 2010 [60] para determinar el índice de melanina, al encontrar el área bajo la curva del espectro corregido de la absorbancia en un rango de $620 - 720nm$. En la Figura 4.39 se observan los valores correspondientes a el índice de melanina obtenidos para cada lesión analizada.

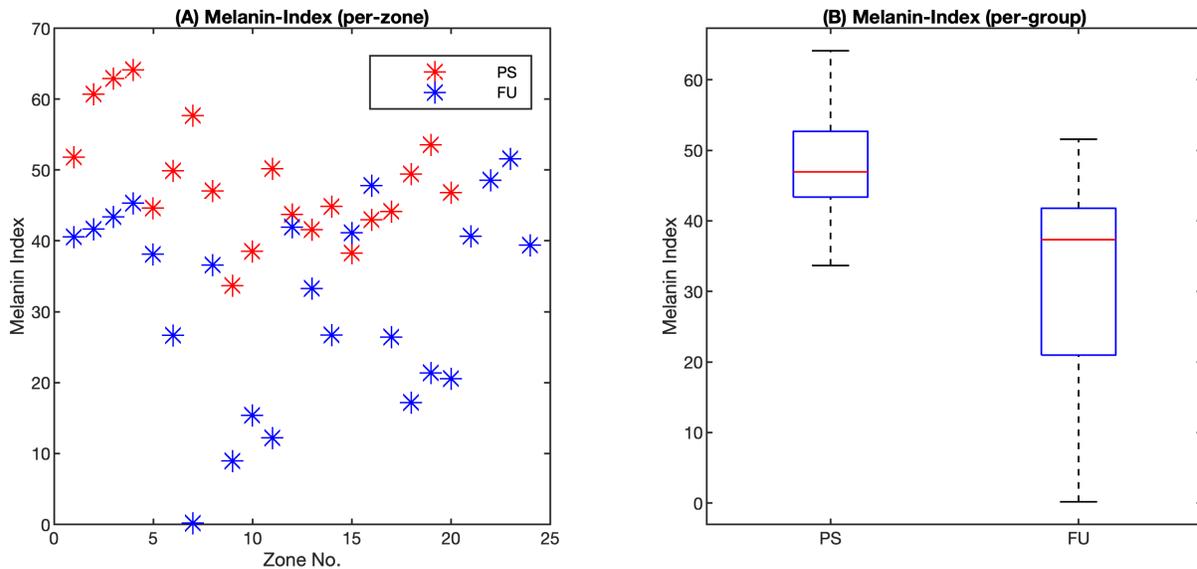


Figura 4.39: Índices de Melanina obtenidos para las mediciones PS y FU por (A) lesión y por grupo (B).

En los valores obtenidos se confirma una de las hipótesis planteada originalmente, el índice de melanina decremento en la piel regenerada como efecto de la AFLS. Este efecto fue uno de los primeros resultados en ser apreciados por el personal dermatológico ya que la pigmentación de los pacientes mostró ser menor, en comparación con ellos mismos antes de someterse a la AFLS. En la Figura 4.39 se puede apreciar un outlier durante la medición del seguimiento, por lo tanto, dicho valor debe de descartarse. Desde años atrás el índice de melanina se utilizado para determinar el fototipo de los pacientes, pero dicho criterio es subjetivo y depende de el criterio del dermatólogo, la zona donde se realiza el estudio, etc. Por lo tanto el uso de técnicas ópticas es necesario para establecer una metodología para la cuantificación del índice de melanina, incluso si no se tienen registros clínicos de los pacientes.

Finalmente, se estableció una metodología similar para determinar el eritema inducido por la AFLS. En este trabajo se utilizó la aproximación propuesta por Glennie et Al. [323] para determinar el *Índice del Eritema de Dawson* a partir de mediciones de DRS. Este parámetro se calcula como el área bajo la curva del negativo del logaritmo base 10 del espectro de la reflectancia difusa (conocido como la absorbancia aparente y expresado por la ecuación 4.6 en un rango de $650 - 700nm$, y de igual forma que para el índice de melanina, descartando las contribuciones de la deoxy-Hb y la oxy-Hb. En la Figura 4.40 se muestran los índices del eritema inducido para cada lesión antes y después de someterse al tratamiento de la AFLS.

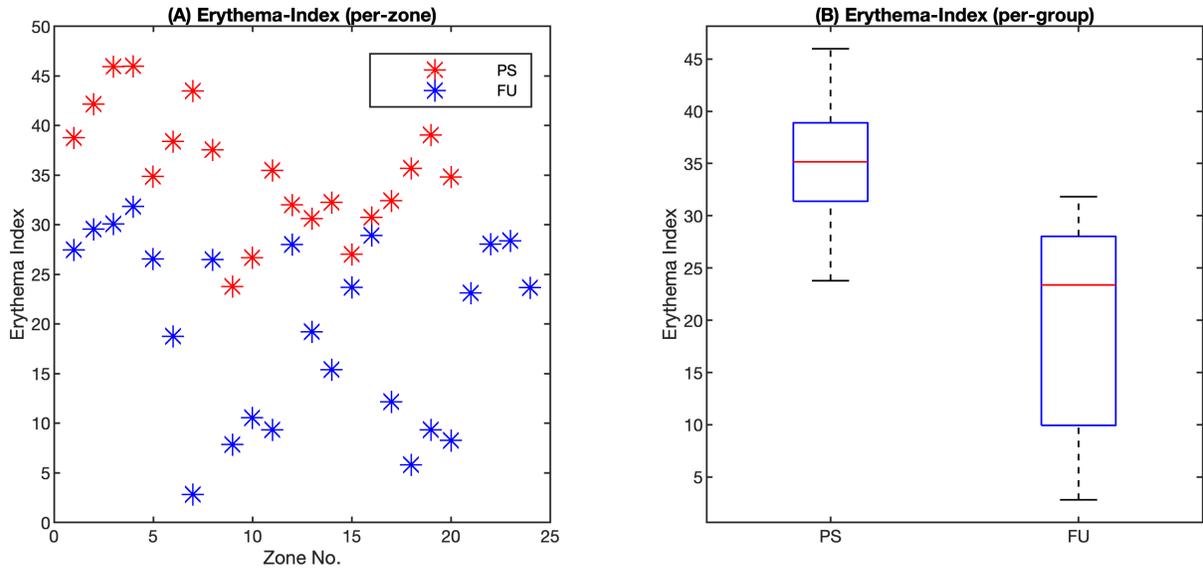


Figura 4.40: Índices del Eritema Inducido para las mediciones PS y FU por (A) lesión y (B) por grupo.

De igual forma que el índice de melanina, al evaluar el índice del eritema inducido se observó un decremento en cada lesión, sin la presencia de outliers o valores fuera de rango. De acuerdo a la valoración médica la reducción del eritema se aprecia en un lapso de dos semanas después de la AFLS. Al realizar la medición de seguimiento un mes después, la presencia del eritema fue prácticamente nula en todos los pacientes. Con la aproximación propuesta utilizando mediciones DRS es posible cuantificar esta información para así garantizar la efectividad y seguridad de la AFLS como tratamiento para cicatrices de acné siguiendo un tratamiento de isotretinoína a dosis terapéuticas. La aproximación para el procesamiento y análisis de espectros DRS utilizada en esta sección se ha utilizado anteriormente para evaluación de trastornos en la pigmentación y para la determinación del fototipo de los pacientes de forma cuantitativa. En este trabajo dicha metodología se empleó como herramienta de valoración no-invasiva de los efectos y reacciones inducidas por la cirugía AFLS.

4.8. Conclusiones

La cirugía láser fraccional ablativa (AFLS) es una terapia basada en la luz utilizada para la supresión de cicatrices de acné. Previamente, sus efectos habían sido evaluados de forma empírica, dejando de lado la cuantificación de los efectos histológicos que se presentan durante las interacciones de la luz con el tejido. Con el abordaje propuesto en esta investigación, se planteó aplicar la técnicas ópticas en la superficie de la piel con cicatrices de acné que fue puesta bajo el tratamiento de la AFLS y en la piel sana con el objetivo de encontrar diferencias entre ellas y posteriormente monitorear la presencia de diferentes colágenos.

Para justificar los experimentos espectroscópicos, fue necesario monitorear los incrementos de temperatura en la superficie facial durante la cirugía láser fraccional ablativa (AFLS) utilizando la imagenología por termografía infrarroja digital (DITI). Debido a la complejidad y riesgo de la medición, solo se consideró un paciente para esta medición, por lo tanto el resultado no puede ser considerado determinante, aunque sirvió de referencia para justificar futuros resultados. Con la espectroscopía Raman (RS), como primer abordaje se realizó un análisis de correlación lineal (LCA) entre los espectros Raman de las proteínas de interés y los espectros Raman de los pacientes antes de la cirugía láser (PS) y en el seguimiento (FU). Como hipótesis se había planteado un incremento en la presencia de las proteínas de interés durante el seguimiento (FU), pero los valores obtenidos fueron demasiado bajos y la diferencia entre las mediciones fue insignificante. Por lo tanto, fue requerido un segundo análisis más robusto, como el análisis de componentes principales (PCA).

Tomando dos clases de interés, PS y FU, con esta nueva aproximación, se realizó una reducción de variables, conservando aquellas que retuvieron la mayor parte de la variación del conjunto de datos original y que pudiera realizar una separación de clases. Como herramienta dedicada a la clasificación, se empleó un análisis discriminante cuadrático QDA sobre las variables reducidas con PCA, el cuál fue verificado utilizando una validación cruzada de 10 iteraciones. Finalmente, las variables reducidas obtenidas con PCA se utilizaron junto con las proteínas de referencia utilizando LCA. Los resultados confirman que durante el seguimiento, los espectros Raman de los pacientes presentaron incrementos en la presencia de las proteínas de interés, confirmando así la efectividad de la cirugía láser fraccional ablativa para cicatrices de acné por medio de las interacciones entre la luz y el tejido biológico. Como medición final, la espectroscopía de reflectancia difusa (DRS) se utilizó para evaluar la recuperación del eritema inducido por la AFLS. En las mediciones se observa una reducción de intensidades en el rango del visible que va de $400 - 650nm$, el cuál corresponde a la presencia de la melanina. Al estudiar el estado de un eritema, se concluye que la presencia de la melanina disminuyó durante la medición del seguimiento, garantizando así el proceso de cicatrización.

Capítulo 5

Métodos Ópticos en Pacientes con Rosácea

5.1. Tratamientos para el Manejo de Rosácea

La complejidad de la Rosácea radica principalmente en que la patofisiología aún permanece siendo desconocida en su totalidad, lo que resulta en una falta de terapias ó tratamientos adecuados para la supresión ó manejo de la enfermedad. En esta tesis se ha planteado la hipótesis de que los pacientes con rosácea presentan una temperatura mayor que la de los individuos sanos. Entre las causas posibles de esta diferencia en la temperatura esta la presencia del ácaro *Demodex*, el cuál esta presente en la piel humana debido a la alta densidad de las glándulas sebáceas, resultando en vasos sanguíneos dilatados y un incremento anormal en el flujo sanguíneo. Esto resulta en una reactividad vascular la cuál produce una elevación en la temperatura de los pacientes con rosácea [201, 324, 202]. Por lo tanto, tomando la presencia del demodex en la piel y el patrón térmico facial como biomarcadores, es posible obtener herramientas para diagnóstico y manejo de rosácea de forma cuantitativa, no-invasiva e individualizada [199].

El *Metronidazol* es un agente antiprotozoal, derivado sintético que posee las propiedades antibacteriales del antibiótico *Nitronidazol*. De forma tópica, el metronidazol es considerado como el estándar de oro para el tratamiento de pacientes con rosácea debido a una marcada reducción en la generación de especies oxigenadas reactivas, así como la ruptura de ADN, las cuales han sido aprovechadas para el manejo de la enfermedad debido a los síntomas de mejora observados en los pacientes a diferencia del uso de algún placebo [325, 326]. En la presente tesis, se propone utilizar técnicas ópticas para el estudio y caracterización de pacientes con rosácea de forma no-invasiva utilizando un tratamiento basado en la aplicación de metronidazol en forma tópica. De esta forma se busca encontrar la respuesta de los pacientes a el tratamiento por medio de la detección de diferentes marcadores para posteriormente establecer un criterio de diagnóstico temprano de la enfermedad o una herramienta para la valoración del trata-

miento en pacientes con presencia de rosácea. Los métodos ópticos utilizados para este estudio fueron la imagenología por termografía infrarroja digital (DITI) utilizando el patrón térmico de los pacientes como biomarcador y finalmente, la espectroscopía Raman (RS), para encontrar información a nivel molecular de la enfermedad. Como primera aproximación, se realizaron mediciones termográficas y espectroscópicas con individuos sanos para estandarizar las mediciones y obtener un dataset de referencia. Las clases de interés consideradas para este estudio son las mediciones de control (*SS* por *Saline Solution*) y las mediciones realizadas después del tratamiento (*MC*, por *Metrocream*). En la Figura 5.1 se observa los termogramas analizados para un individuo sano y un paciente con rosácea durante el estudio propuesto.

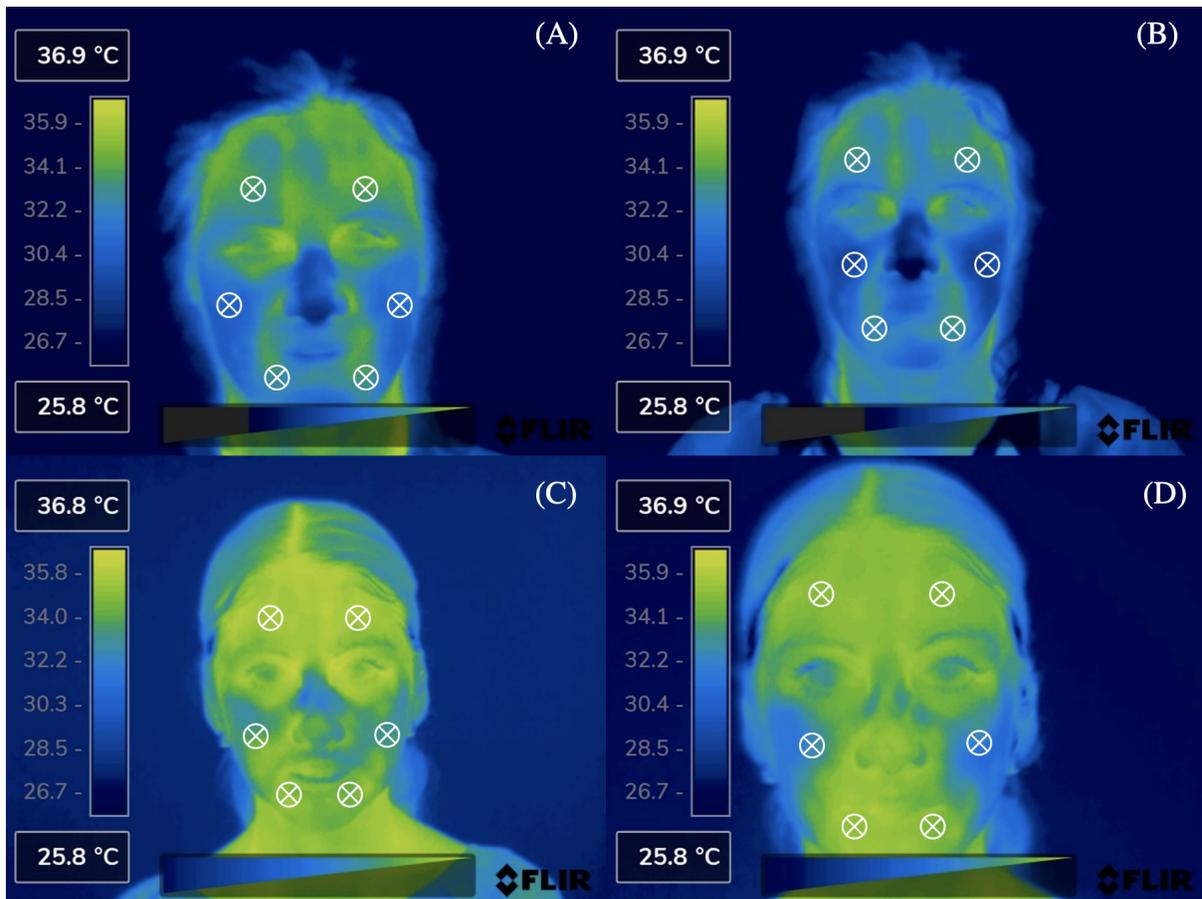


Figura 5.1: Patrón térmico de los individuos sanos y pacientes con rosácea.

Durante la medición de control, correspondiente a la solución salina (*SS*), se observó una distribución de temperatura variable en el individuo sano, con una temperatura mayor en la zona de la frente (Figura 5.1.A). Al aplicarse el tratamiento (*MC*) se observó un decremento en toda la superficie facial (Figura 5.1.B), revelando así el patrón térmico de los individuos sanos después de someterse a un tratamiento basado en metronidazol. Por otro lado, los pacientes con rosácea mostraron una temperatura elevada durante la medición de control, donde fue posible visualizar la presencia de la enfermedad principalmente

en las mejillas, la frente y en menor grado, en la barbilla (Figura 5.1.C). Para la medición del tratamiento, se observó una ligera disminución en la temperatura facial total, aunque las zonas de interés seguían presentando una temperatura elevada (Figura 5.1.D). Partiendo de este resultado preliminar y del estudio individualizado realizado para analizar los incrementos de temperatura inducidos por la cirugía fraccional ablativa (AFLS) para cicatrices de acné discutidos en la sección 4.4, en este capítulo se propone un estudio con imagenología por termografía infrarroja digital (DITI) para diagnóstico y clasificación de pacientes con rosácea. Las mediciones DITI se realizaron en 3 regiones simétricas de la superficie facial: frente, mejilla y barbilla, de 7 pacientes con rosácea y 28 individuos sanos antes y después de aplicar metronidazol utilizando un cámara termográfica FLIR T400 con una resolución de 320×240 micro bolómetros, sensibilidad térmica de 0.005°C , rango de temperaturas de $-120 - 1200^\circ\text{C}$, rango espectral de $7.5 - 13\mu\text{m}$, resolución de pixel de 320×240 y un valor de 0.98 para la emisividad de todas las mediciones (Figura 5.2).



Figura 5.2: Cámara infrarroja FLIR T400.

Para el análisis de datos se implemento un *Análisis de Diferencias de Temperatura* entre los puntos simétricos de las superficies (conocido como análisis de Δ_t) junto a un análisis discriminante cuadrático y una validación cruzada de 10 iteraciones para evaluar la técnica de clasificación de pacientes, previamente implementado en el capítulo 4. Como medición de control, se aplicó una solución salina en la superficie facial de los pacientes. Para el estudio Raman, el equipo utilizado, la adquisición, procesado y análisis de datos espectroscópicos, la configuración fue la misma que la reportada en el capítulo 4.

5.2. Patrón Térmico de Individuos Sanos

El *Patrón Térmico* de una superficie es la diferencia estadísticamente significativa que existe entre los gradientes de temperatura que se originan en determinadas zonas de interés de dicha superficie. Al considerar la piel como la superficie bajo análisis, los patrones térmicos se pueden utilizar para estudiar enfermedades que presenten características inflamatorias o de isquemia. La rosácea es una enfermedad inflamatoria que se manifiesta principalmente en la zona facial con zonas visiblemente enrojecidas, las cuáles sin el tratamiento apropiado, pueden dar origen a enfermedades inflamatorias más serias. De acuerdo a lo establecido en la sección 2.4, la rosácea se clasifica en 4 subtipos de acuerdo a los síntomas presentados y al historial clínico del paciente, sin embargo, este criterio es totalmente empírico y depende exclusivamente de la experiencia del personal médico, dando lugar a un posible diagnóstico erróneo y un manejo inadecuado de la enfermedad [9, 200, 327, 328, 329, 330].

Las zonas de interés para determinar el patrón térmico fueron la frente (Z1), las mejillas (Z2) y la barbilla (Z3), tomando dos puntos simétricos de temperatura en cada zona, conocidos como *Scores Térmicos*. Las diferencias de temperatura (Δ_t) entre los puntos seleccionados en los individuos sanos se muestran en la Tabla 5.1. Es posible observar un decremento de temperatura en la frente y en la mejilla después de aplicar el metrocream con diferencias estadísticamente significativas obtenidas al aplicar el test de Wilcoxon entre ambas mediciones. A pesar de también observarse un decremento en la temperatura de la barbilla, no se observó una significancia estadística. El patrón térmico de los individuos sanos se obtuvo con el objetivo de estandarizar las mediciones DITI, además, se utilizará como referencia para el método de detección de rosácea que se discutirá en secciones posteriores.

Δ_t	Superficie	Solución Salina ($^{\circ}C$)	Metrocream ($^{\circ}C$)	P-Value
1	Frente	0.60 ± 0.14	0.24 ± 0.04	0.01
2	Mejilla	1.06 ± 0.11	0.37 ± 0.09	$1.39e^{-6}$
3	Barbilla	0.72 ± 0.13	0.40 ± 0.07	0.06

Tabla 5.1: Patrón Térmico de Sujetos Sanos.

5.3. Patrón Térmico de Pacientes con Rosácea

Aunque la imagenología por termografía infrarroja digital ha sido empleada para detección temprana de enfermedades, es importante mencionar que las mediciones de dicha técnica pueden incluir múltiples factores de ruido externo que podrían ocasionar considerables variaciones entre cada medición, así como cambios de temperatura de la piel que no pueden considerarse propios de la enfermedad bajo análisis, es

decir, pueden ser ocasionados por cualquier otro evento originado sobre la piel. Además de estos factores de riesgo para la medición, para analizar a los pacientes con rosácea, fue necesario realizar el análisis de los scores térmicos mas detenidamente debido a la pequeña muestra a la que se tuvo alcance. Utilizando la misma metodología para los individuos sanos, se realizaron mediciones de termografía infrarroja en pacientes con rosácea antes y después de aplicar una solución de metronidazol. Las diferencias de temperatura por zona facial se muestran en la Tabla 5.2.

Δ_t	Superficie	Solución Salina ($^{\circ}C$)	Metrocream ($^{\circ}C$)	P-Value
1	Frente	0.96 ± 1.04	0.33 ± 0.41	0.18
2	Mejilla	0.76 ± 0.69	1 ± 0.86	0.90
3	Barbilla	1.13 ± 0.81	0.71 ± 0.59	0.60

Tabla 5.2: Patrón Térmico de los Pacientes con Rosácea. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los patrones térmicos de las zonas de interés al utilizar un test de Wilcoxon.

A diferencia de los individuos sanos, se observan valores altos en las diferencias de temperatura, lo cuál indica una asimetría entre las zonas de interés. Realizando el test de Wilcoxon se obtuvieron diferencias insignificativas entre ambas mediciones. Durante la medición de control (solución salina) se observaron las diferencias térmicas mas grandes, mientras que durante la medición con metronidazol se observó un decremento en la diferencia térmica en 2 de las 3 zonas de interés, la frente y la barbilla. Como primera instancia se puede mencionar que las mediciones correspondientes a la zona derecha fueron mayores que la zona izquierda, lo cuál no puede considerarse como un parámetro valido para el estudio ya que la muestra fue reducida.

Aunque se ha propuesto anteriormente que la temperatura corporal es mayor en la parte derecha del cuerpo, debido a una mayor distribución de las venas, así como sus dimensiones en esta parte del cuerpo humano, lo que implica que exista un mayor flujo sanguíneo que ocasiona que la temperatura observada sea mayor. En este estudio se evito tomar en consideración dicha afirmación aplicando un valor absoluto a las diferencias obtenidas, de tal forma que los análisis estadísticos no presentaran proporcionaran resultados con valores fuera de rango. Aunque el resultado obtenido no fue significativo, es de gran interés observar como los patrones térmicos de los pacientes con rosácea son mayores que los de los individuos sanos. En el siguiente capítulo se abordara una comparación entre los valores obtenidos en ambas mediciones para establecer un método de clasificación de pacientes.

5.4. Método de Clasificación No-Invasivo para Pacientes con Rosácea basado en el Patrón Térmico Facial

Partiendo del análisis de patrones térmicos entre los individuos sanos y los pacientes con rosácea, es posible establecer un método de clasificación utilizando las diferencias de temperatura observadas. Al tratarse de un método de clasificación se busca integrar la información entre ambos tipos de pacientes y posteriormente utilizar el análisis realizado como herramienta de diagnóstico no-invasivo de rosácea basado en el patrón térmico facial. Utilizando las temperaturas promedio observadas en cada una de las zonas de interés por lado facial, conocidas como *Scores Térmicos*, fue posible establecer una primera aproximación para el método de clasificación. Los patrones térmicos presentados en las secciones anteriores se utilizan como mediciones adicionales al análisis de los scores térmicos.

En la Tabla 5.3 se muestran los scores térmicos promedio por zona para el lado derecho de la superficie facial, donde se observa que los pacientes con rosácea mostraron un incremento de por lo menos 1°C con respecto de los individuos sanos durante la medición de control (SS). Para la medición realizada después del tratamiento (MC) se observó el mismo incremento en los pacientes con rosácea en comparación con los individuos sanos.

Superficie	Healthy (SS)	Rosacea (SS)	Healthy (MC)	Rosacea (MC)
Frente	33.62 ± 0.64	34.68 ± 0.52	34.38 ± 0.45	34.20 ± 0.61
Mejilla	32.54 ± 1.07	33.90 ± 0.47	32.66 ± 0.47	33.64 ± 1.16
Barbilla	33.29 ± 1.03	34.24 ± 0.76	33.63 ± 0.49	34.31 ± 0.97

Tabla 5.3: Temperaturas Promedio en el Lado Derecho Facial durante la medición de solución salina (SS) y metronidazol (MC).

En la Tabla 5.4 se muestran los scores térmicos para la zona izquierda de la superficie facial, donde a diferencia del lado derecho, se observan incrementos muy pequeños durante la medición de control (SS), de aproximadamente 0.5°C en cada zona, mientras que durante la medición de seguimiento se observó una temperatura menor, de aproximadamente 0.25°C , en los pacientes con rosácea, que es resultado de la diferente distribución venosa que existe en el cuerpo humano, como se planteado en la sección 5.3 y por la considerable diferencia en el tamaño de la muestra analizada.

Superficie	Healthy (SS)	Rosacea (SS)	Healthy (MC)	Rosacea (MC)
Frente	33.49 ± 0.97	33.52 ± 1.65	34.33 ± 0.49	33.95 ± 0.68
Mejilla	33.57 ± 0.55	34.05 ± 1.13	32.93 ± 0.66	32.70 ± 0.46
Barbilla	32.92 ± 0.79	33.31 ± 1.39	33.60 ± 0.69	33.68 ± 1.11

Tabla 5.4: Temperaturas Promedio en el Lado Izquierdo Facial durante la medición de solución salina (SS) y metronidazol (MC).

Comparando los spots térmicos entre las mediciones, fue posible observar una gran cantidad de valores fuera de rango (*outliers*), principalmente en las mejillas de los pacientes sanos, resultado de la variación en las características de los individuos sanos. Por otro lado, los pacientes con rosácea mostraron una variación menor entre las mediciones y una reducida presencia de outliers. También es posible apreciar que durante la medición del metronidazol, la temperatura de los pacientes con rosácea fue mayor que la de los individuos sanos, aunque no se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas debido a la diferencia entre el tamaño de las muestras (Figura 5.3). Durante la medición MC se observó un incremento en la temperatura correspondiente a los spots térmicos del lado derecho de los pacientes con rosácea, mientras que en el lado izquierdo facial se observó un decremento, lo cuál da como resultado un patrón térmico significativo que se abordara mas adelante (Figura 5.3.D). El efecto observado de incrementos en la temperatura es debido a la vascularidad de los pacientes y se discutirá en secciones posteriores.

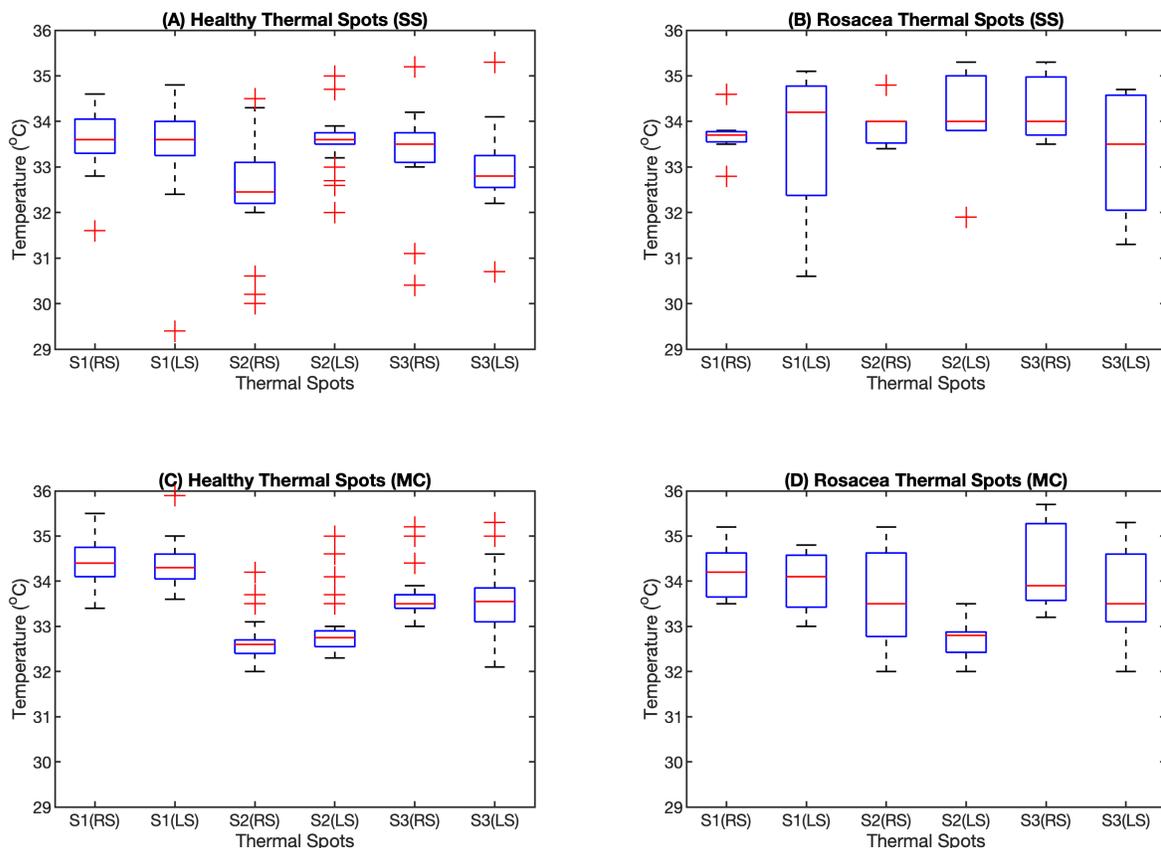


Figura 5.3: Score térmicos por lado derecho (RS) e izquierdo (LS) para las zonas de interés: frente (S1), mejilla (S2) y barbilla (S3), durante la medición con solución salina (SS) y metronidazol (MC) para individuos sanos (A y C) y pacientes con rosácea (B y D).

En la Figura 5.3 se observa una considerable cantidad de valores fuera de rango en ambas mediciones de los individuos sanos, a estos valores se les conoce como *Outliers*. En los pacientes con rosácea se observan pocos outliers durante la medición de la solución salina, mientras que en la medición del metronidazol se observan las variaciones buscadas sin outliers, indicando una homogeneidad entre los scores térmicos. Ahora tomando las diferencias de temperatura, ó patrones térmicos, presentados en las secciones 5.2 y 5.3 es posible realizar una comparativa entre los individuos sanos y los pacientes con rosácea (Figura 5.4).

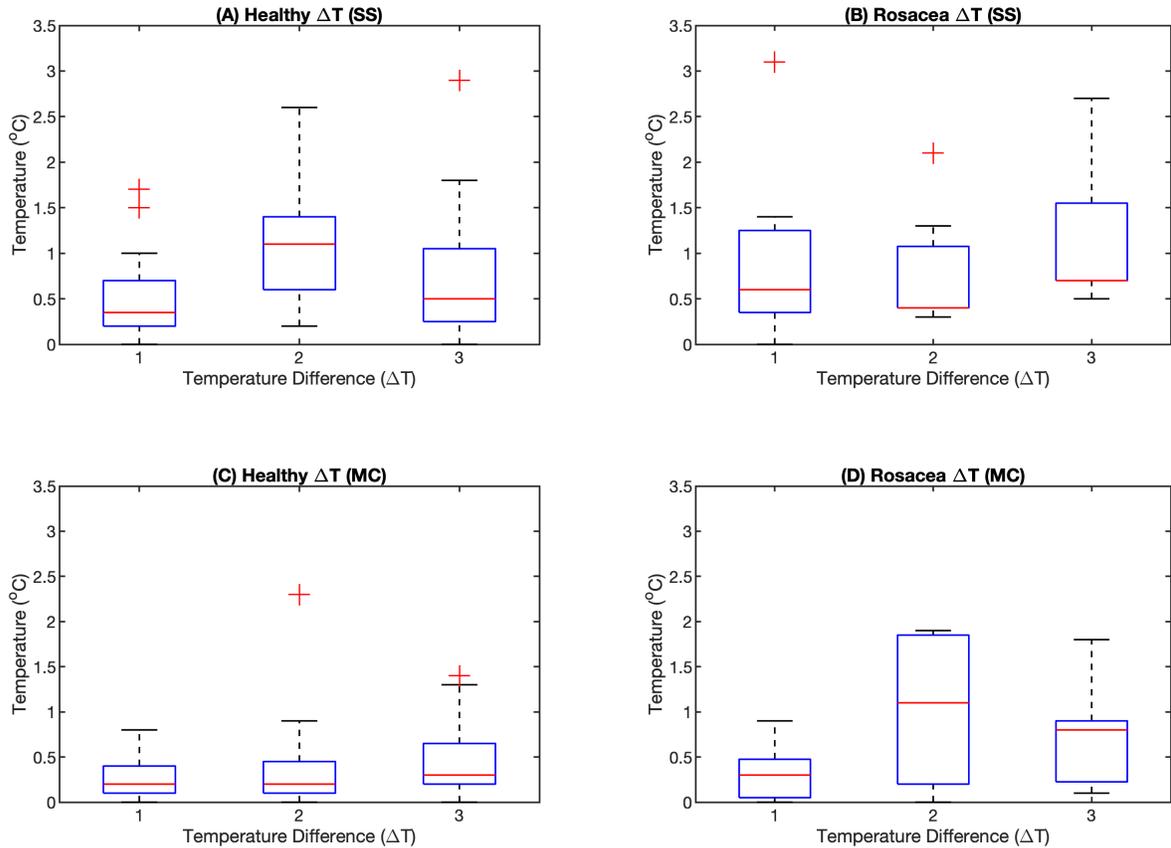


Figura 5.4: Patrón térmico de individuos sanos y pacientes con rosácea. Los valores p obtenidos fueron de 0.32 (SS) y 0.44 (MC) para la frente, 0.15 (SS) y 0.17 (MC) para las mejillas, 0.14 (SS) y 0.13 (MC) para la barbilla.

Al analizar la medición de control, utilizando la solución salina, se observó un patrón térmico similar entre ambas clases sin diferencia estadísticamente significativa. Aunque se observa que el patrón térmico de los pacientes con rosácea es mayor que el de los individuos sanos, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas clases. Estos resultados, aunque no son estadísticamente significativos, se consideran como una aproximación preliminar para el método de clasificación y detección de pacientes con rosácea, que se pudiera optimizar al añadir mas pacientes con rosácea e individuos sanos al estudio propuesto, o bien, incluir una técnica óptica adicional como complemento al estudio propuesto.

5.5. Método de Diagnóstico No-Invasivo para Pacientes con Rosácea utilizando Espectroscopía Raman

A partir de los resultados obtenidos con el método de clasificación para pacientes con rosácea utilizando el patrón térmico facial, se integro a el estudio propuesto, una aproximación basada en mediciones de espectroscopía Raman con el objetivo de establecer un método de diagnóstico temprano y no-invasivo de rosácea utilizando información espectral complementaria a la información térmica presentada en el capítulo anterior 5.4. Utilizando la metodología empleada para el estudio de la sección 4.5, se analizaron 10 espectros Raman de zonas sanas de la piel y 10 espectros correspondientes a lesiones de rosácea. Todos los espectros se tomaron de forma in vivo y fueron tomados previamente a las mediciones realizadas para el estudio del patrón térmico, por lo tanto, ninguna sustancia fue aplicada a la piel de los pacientes. El pre-procesado, procesado y análisis de espectros Raman fue realizado fue el mismo que el utilizado en la sección 4.5. En la Figura 5.5 se observan los espectros Raman correspondientes a los individuos sanos y a los pacientes con rosácea.

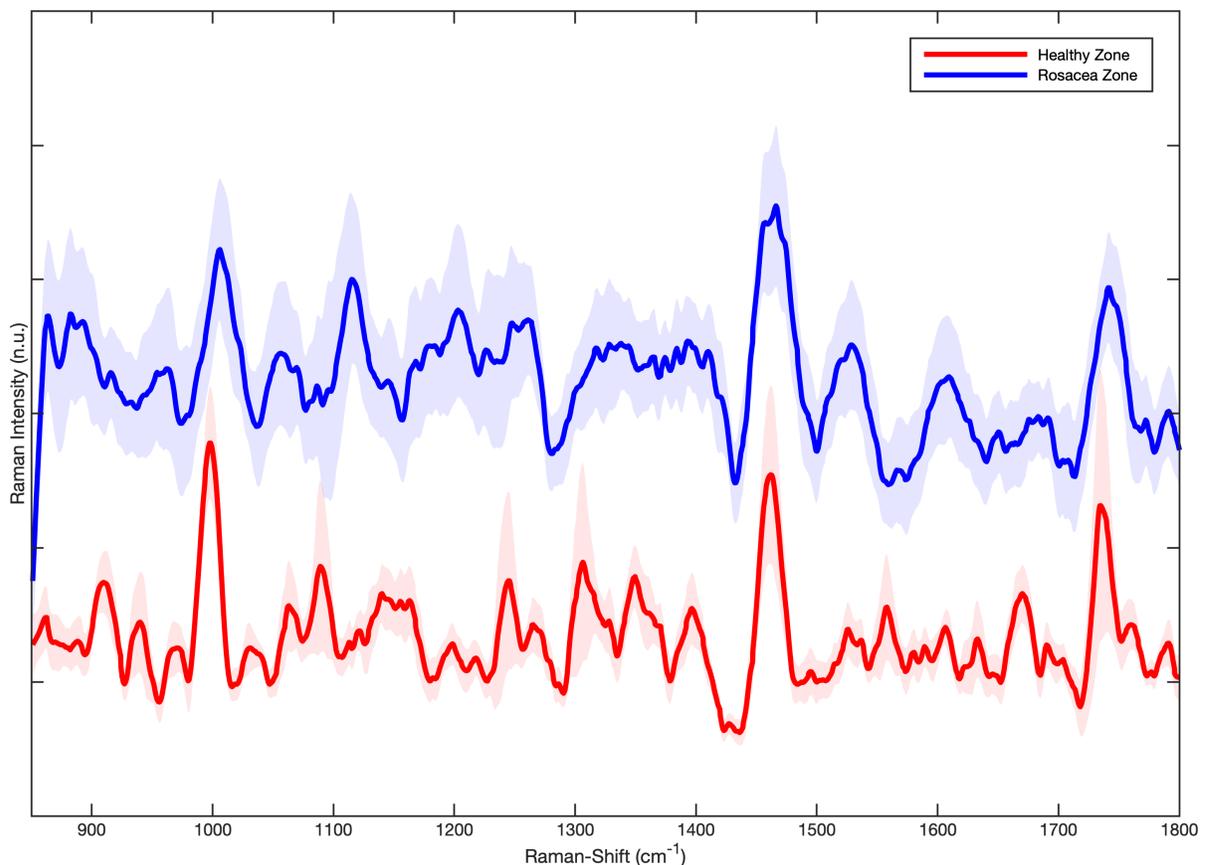


Figura 5.5: Espectro Raman de la piel sana (rojo) y de la piel con rosácea (azul).

A diferencia de los espectros analizados para las cicatrices de acné, los espectros analizados en este estudio presentaron mayor variación en las intensidades de las bandas y mayor ruido. De forma cualitativa, se aprecia una similitud entre los espectros, con un valor de correlación (LCA) de $r = 0.5$. Realizando un test de Wilcoxon entre la media de los espectros se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con un valor $p = 1.06e^{-286}$, por lo que un análisis mas complejo debe de realizarse para justificar esta variación. En este estudio, el análisis de componentes principales (PCA) se volvió a utilizar como herramienta para reducción y separación de las variables originales, correspondientes a los espectros medidos. Los scree plots obtenidos se muestran en la Figura 5.6.A y Figura 5.6.B, y a diferencia que en el estudio de la sección 4.5, se observó que la varianza explicada total contenida en los PC's no esta dispersa, lo cuál puede observarse en el scree plot correspondiente para la varianza explicada acumulativa (Figura 5.6.A), mientras que al analizar el scree plot correspondiente para la varianza explicada individual (Figura 5.6.B), se observó como los PC1-PC2 retienen la mayor parte de la varianza. Por lo tanto, también fue necesario analizar los resultados adicionales del PCA y posteriormente expandir el estudio utilizando un análisis de discriminantes cuadrático para establecer una clasificación de pacientes y de nueva cuenta, el análisis de correlación lineal para validar la separación y clasificación de los pacientes en términos de los PC's seleccionados.

En la Figura 5.6.C se observa el score plot del *PC1vsPC2*, donde se observa la distribución de los pacientes en términos de los PC's, y al realizar combinaciones entre ellos es posible realizar una selección manual, dependiendo de la separación de variables observada. Esta aproximación para la selección y reducción de variables es puramente visual, por lo tanto es recomendable realizar mediciones cuantitativas. Uno de los diversos abordajes convenientes para realizar esta tarea es calcular la correlación que existe entre los loadings de los PC's que estan siendo analizados con algún espectro de referencia que pueda ser considerado como biomarcador o disparador para la presencia y desarrollo de rosácea. Dicho abordaje fue implementado en el capítulo 4 utilizando diferentes espectros de proteínas involucradas en el proceso de rejuvenecimiento de la piel, las cuales fueron utilizadas como referencia. En el presente estudio no se contó con ninguna medición de referencia, por lo que fue mas conveniente realizar una selección de PC's de forma visual. El objetivo del estudio es utilizar PCA para reconstruir el espectro Raman característico de los pacientes con rosácea para posteriormente utilizarlo como referencia en futuras investigaciones. También es importante mencionar que la separación de variables se puede observar en diferentes PC's, pero es recomendable utilizar aquellos que retengan el mayor porcentaje de la varianza explicada, aunque pueden existir excepciones donde los PC's seleccionados tienen valores bajos de varianza explicada, por lo tanto, la aproximación recomendada en esta tesis es valorar de forma visual la separación de variables y utilizar LCA entre los loadings de los PC's seleccionados y los espectros de los pacientes cuando no se tiene un espectro de referencia.

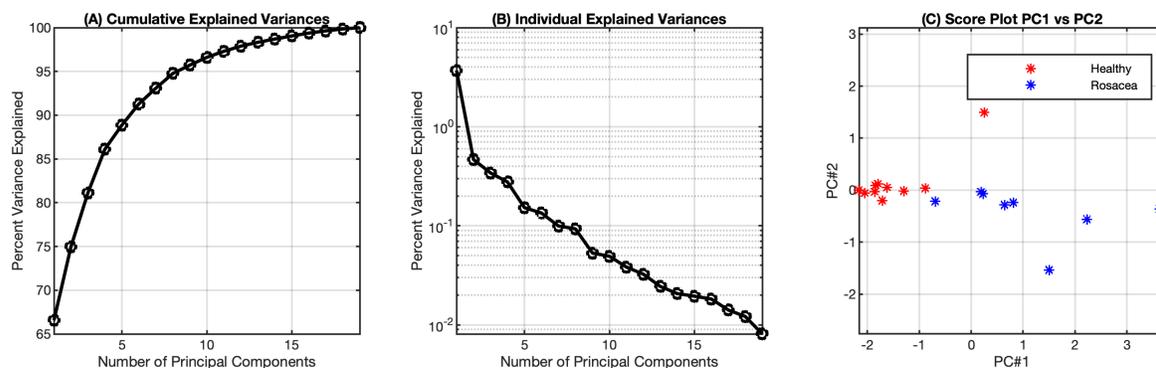


Figura 5.6: PCA de los Espectros Raman de la piel sana y con rosácea, los score plots indican la varianza total acumulativa (A) e individual (B) y el score plot (C) indica la contribución que tienen los espectros originales en los PC's seleccionado.

La selección de los PC's se realizó de forma manual al analizar las combinación entre ellos en los score plots, resultando el PC1 y el PC2 los seleccionados para llevar a cabo el análisis. En su respectivo score plot, la separación de variables fue mas notoria con respecto de otras combinaciones, además de que retuvieron el mayor porcentaje de las varianzas explicadas, 66.55% para el PC1 y 8.4% para el PC2. A diferencia del análisis propuesto en el capítulo4, en este estudio por el momento no se busca encontrar la presencia de alguna proteína en específico, que pudiera servir como biomarcador para la detección de rosácea, por lo tanto, solo se abordó un problema de clasificación y discriminación entre individuos sanos y pacientes con rosácea de forma individualizada y no-invasiva, de esta forma es posible integrar nuevos espectros al estudio sin necesidad de etiquetarlo.

Posteriormente, se integró un análisis discriminante lineal (LDA) a los scores correspondientes a los PC's seleccionados para establecer una separación entre ambas clases. En la Figura 5.7 se observa el score plot del PC1 vs PC2 junto con el clasificador lineal integrado. Se observa como todos los espectros correspondientes a la clase de los individuos sanos fueron clasificados correctamente, así como todos los espectros de los pacientes con rósacea. Los parámetros de clasificación obtenidos fueron una resolución de 100%, una sensibilidad del 50% y una especificidad del 100%.

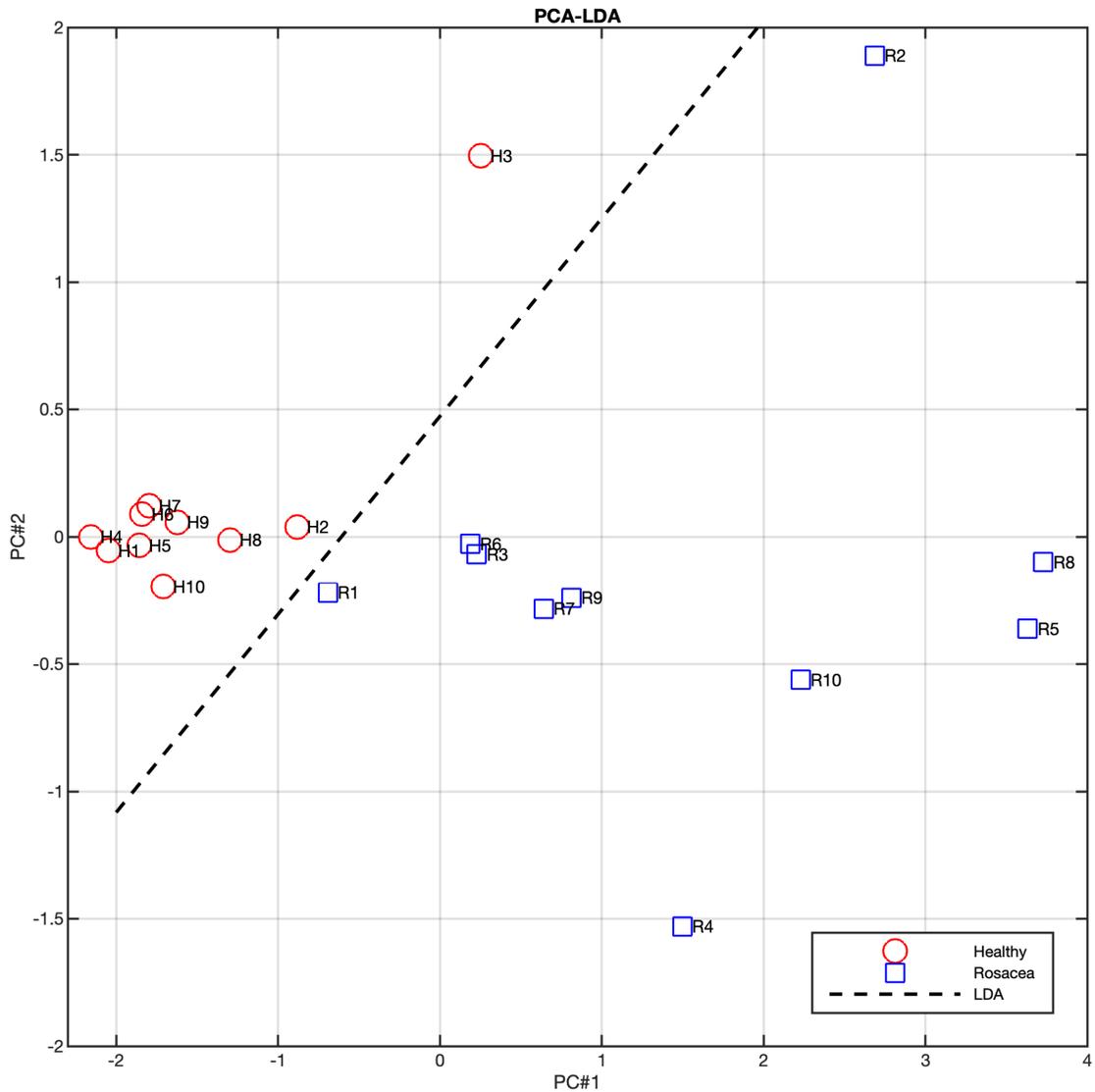


Figura 5.7: LDA aplicado a los PC's seleccionados.

La matriz de confusión obtenida con el LDA se observa en la Figura 5.8. El resultado es el esperado ya que se puede observar una clasificación con un 100 % de especificidad ya que todos los espectros analizados fueron clasificados en su respectiva clase. Dicho resultado no puede considerarse significativa ya que existe una alta correlación entre los espectros de los individuos sanos y de los pacientes con rosácea, además de que fue aplicada una solución salina para nivelar la temperatura facial, por lo tanto es posible que los espectros medidos estén reflejando la contribución de la solución salina sobre la piel.

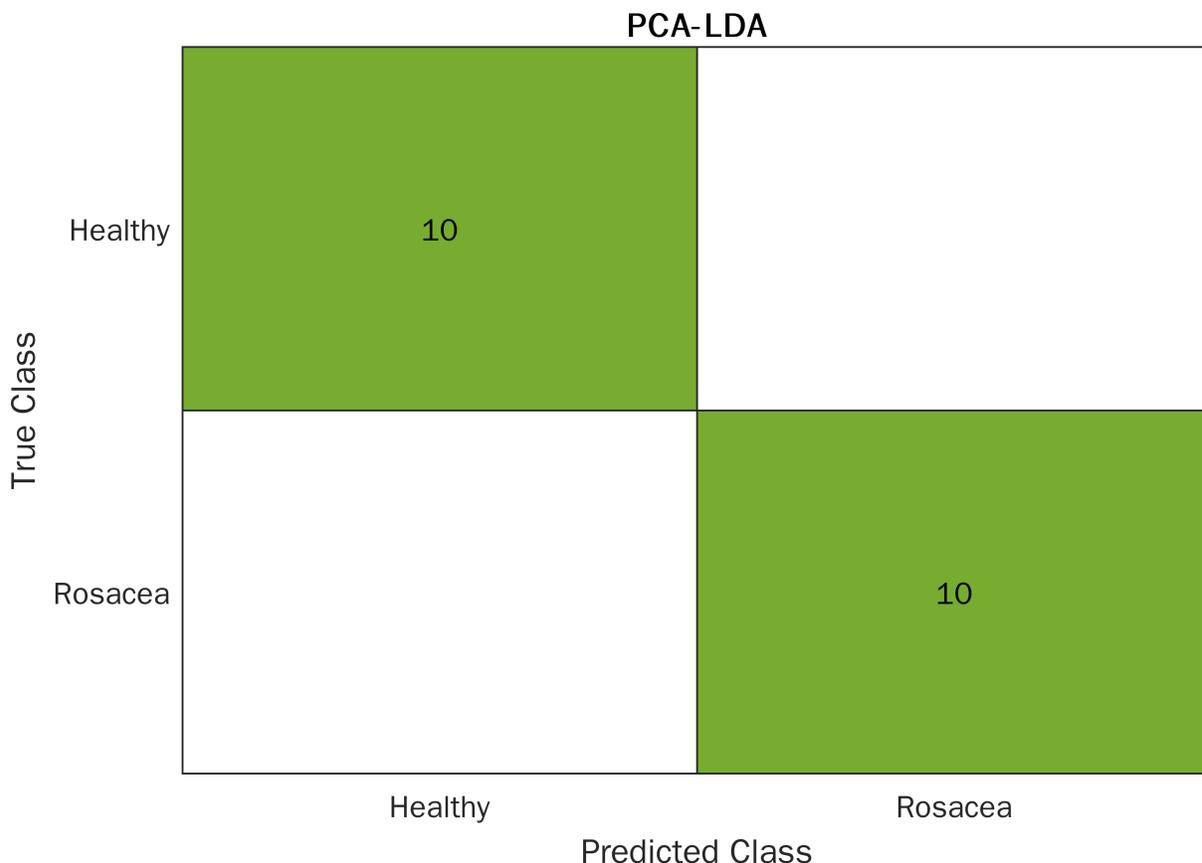


Figura 5.8: Clasificador LDA aplicado a los scores de los PC's seleccionados.

Para finalizar el análisis Raman, fue necesario analizar la forma de los loadings correspondientes a los PC's seleccionados. Dicho análisis se utiliza para cuantificar las bandas características de los espectros Raman bajo análisis. Al no contar con un espectro de referencia como biomarcador de rosácea, en este trabajo se implementó un análisis de correlación lineal (LCA) entre los espectros originales y los loadings correspondientes al PC1 y al PC2, de tal forma que sea posible establecer un patrón característico en los espectros con rosácea. En la Figura 5.9 se observa una comparativa entre los espectros originales y los loadings correspondientes a los PC's seleccionados. Se observa que el loading correspondiente al PC1 tiene bandas características en $882, 957, 1012, 1115, 1206, 1335, 1479, 1529$ y 1527cm^{-1} , las cuáles se encuentran presentes en los espectros correspondientes a los pacientes con rosácea. Las bandas observadas en el PC2 son $996, 1093, 1240, 1301, 1343, 1393, 1439, 1491, 1556, 1669$ y 1733cm^{-1} , observadas principalmente en los espectros de los individuos sanos. Es importante mencionar que la intensidad de las bandas observadas en los loadings corresponde a la variación observada en los espectros originales, por lo tanto el PC1, cuya varianza es mayor, se puede utilizar para representar a los pacientes con rosácea ($r = 0.56$), mientras que el PC2 se puede utilizar para representar a los individuos sanos ($r = 0.30$).

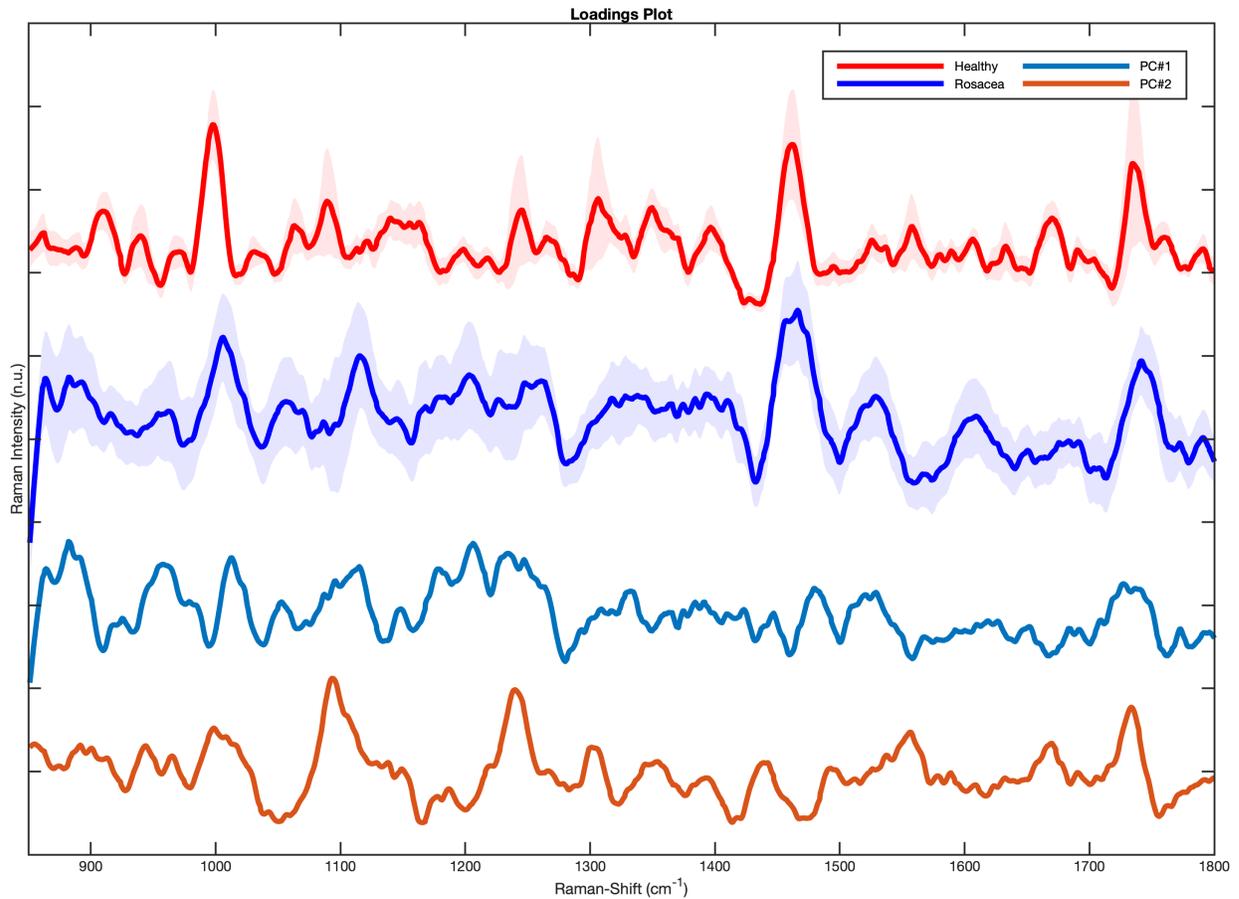


Figura 5.9: Análisis de la forma de los loadings correspondientes PC's seleccionados.

5.6. Conclusiones

La Rosácea es una enfermedad prácticamente ignorada por la mayoría del personal médico y por los pacientes, ya que se suelen pasar por alto sus síntomas, debido en gran parte la forma empírica que se realiza el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Al utilizar la imagenología por termografía infrarroja digital (DITI), se buscó determinar el patrón térmico de los pacientes con rosácea, el cuál se había planteado anteriormente, es mayor que el de los individuos sanos. El objetivo planteado era obtener una nueva herramienta para diagnóstico y clasificación de la enfermedad de forma no-invasiva utilizando la información térmica de los pacientes. Al realizar las mediciones se observó que efectivamente la temperatura de los pacientes con rosácea era mayor que la de los individuos sanos, principalmente en la parte derecha de la superficie facial. Al determinar el patrón térmico, es decir la diferencia entre dos puntos simétricos de la superficie, los resultados fueron estadísticamente significativos, por lo que no es posible utilizar este resultado.

Debido a los resultados negativos, y como alternativa a DITI, se volvió a emplear la espectroscopía Raman. De forma similar a el experimento de la cirugía láser, se buscó evaluar el tratamiento estándar para la enfermedad, en este caso la solución metronidazol, por lo tanto se analizaron los espectros Raman de los pacientes antes y después de la aplicación del tratamiento. Las clases consideradas para el experimento fue la aplicación de la solución salina (SS) y la aplicación del metronidazol en forma de crema (MC). Aplicando la misma aproximación con PCA-QDA se obtuvo una separación de pacientes, de igual forma evaluada con la validación cruzada de 10 iteraciones. Con dicho resultado se concluye que DITI no puede utilizarse para diagnosticar la enfermedad debido a la pequeña muestra analizada y es necesario aumentar el tamaño de la muestra para obtener un resultado significativo. Por otro lado, se comprobó que RS es una técnica óptima para valorar el tratamiento de rosácea basado en metronidazol, ya que es posible realizar una separación de clases correctamente. Dicho estudio con RS podría mejorarse al añadir diferentes tipos de rosácea para determinar si es viable su uso en el diagnóstico de la enfermedad.

Capítulo 6

Discusión

Las técnicas de la óptica biomédica son de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades dermatológicas de forma no-invasiva e individualizada. El principal atractivo de las técnicas estudiadas en esta tesis y en trabajos previos, es que proporcionan información individualizada de los pacientes, y que pueden servir como herramientas complementarias para el diagnóstico médico.

La contribución principal de la presente investigación, es el uso de técnicas de la óptica biomédica para el monitoreo de enfermedades dermatológicas por medio de la valoración de los tratamientos aplicados. En especial se estudio la aplicación de la cirugía láser fraccional ablativa como tratamiento para cicatrices de acné, ya que a pesar de ser considerada un estándar para el tratamiento de la enfermedad, sus efectos histológicos relacionados con la regeneración de la piel, no habían sido estudiados previamente. Al combinar la técnica de espectroscopía Raman con técnicas de aprendizaje automático en pacientes que se sometieron a este tratamiento, fue posible monitorear la presencia de colágenos tipo-I, tipo-III, tipo-IV y tipo-V, los cuáles están presentes durante el proceso de regeneración de la piel, el proceso de cicatrización de heridas, rejuvenecimiento, pigmentación y humectación de la piel regenerada, producto de la cirugía láser fraccional ablativa. Con la espectroscopía de reflectancia difusa se monitoreo el estado del eritema inducido por la cirugía láser, el cuál fue desapareciendo en el tiempo establecido por el personal médico.

Adicionalmente, se empleo la imagenología por termografía infrarroja digital para monitorear los incrementos de temperatura inducidos por la cirugía láser, los cuáles son necesarios para la regeneración de la piel. A pesar de lo establecido en el estado del arte, la termografía infrarroja, además de ser menos específica que las técnicas espectroscópicas, fue la técnica mas delicada durante este experimento, ya que al ser utilizada inapropiadamente es posible dañar el equipo o a el usuario. Esta medición fue de gran importancia ya que la estimulación para el crecimiento de estas proteínas requería una elevación considerable de temperatura. Con los resultados espectroscópicos y termográficos obtenidos, fue posible valorar la efectividad del tratamiento, así como la detección temprana de reincidencias de la enfermedad y la po-

sibilidad de efectuar una segunda sesión del tratamiento. Todos los pacientes involucrados en este estudio presentaron una respuesta favorable a el tratamiento, y el uso de las técnicas ópticas fue de gran utilidad para el personal médico, el cuál realizó el diagnóstico inicial de la enfermedad, efectuó el tratamiento y posteriormente proporcionó una valoración individualizada.

A partir del pequeño estudio de termografía infrarroja con la cirugía láser, se propuso el empleo de esta técnica para el diagnóstico temprano y clasificación de pacientes con rosácea a partir del patrón térmico facial. Aunque se observó un patrón de temperatura mayor en los pacientes con rosácea en comparación con individuos sanos, los resultados obtenidos no pudieron ser considerados significativos debido en gran parte a el reducido tamaño de la muestra. Finalmente para poder realizar una clasificación de pacientes, se empleo la espectroscopía Raman junto con las técnicas de aprendizaje automático utilizadas en el estudio de la cirugía láser, obteniendo así un resultado mas favorable e incluso mas preciso.

La óptica biomédica es una área novedosa que proporciona herramientas para diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Durante la realización de las investigaciones propuestas en esta tesis, se observó la cada vez mas demandante necesidad de aplicaciones de técnicas ópticas que sean capaces de proporcionar resultados individualizados mas precisos y menos invasivos. Con el surgimiento de equipo de computo mas potente, nuevas fuentes mas seguras y detectores mas rápidos y precisos, se visualiza que las técnicas de la óptica biomédica sean establecidas como estándares de oro en un futuro no muy lejano.

Capítulo 7

Conclusiones y Trabajo a Futuro

Anteriormente, los efectos de la cirugía láser fraccional ablativa involucrados en la regeneración de la piel no habían sido estudiados en su totalidad. Dicha deficiencia en el entendimiento podía ser considerada como un mecanismo de regeneración de forma empírica. Al integrar métodos ópticos a el estudio de enfermedades de la piel, fue posible realizar un estudio cuantitativo sobre la presencia de diversas proteínas, las cuáles, se han establecido como biomarcadores en el desarrollo de enfermedades. En esta tesis se propuso un nuevo abordaje para el monitoreo de enfermedades dermatológicas utilizando técnicas ópticas no-invasivas, realizando una valoración de los tratamientos para cicatrices de acné y rosácea.

Como trabajo a futuro se ha planteado expandir las mediciones realizadas con diferentes abordajes. Para el monitoreo de la piel regenerada por efecto de la cirugía láser fraccional ablativa se pretende utilizar las mediciones DRS para extraer los parámetros ópticos de la piel con cicatrices de acné, y de esta forma estimar un espectro Raman de forma teórica y estudiar la propagación de la luz en el tejido con esta enfermedad para la propuesta de nuevos tratamientos basados en la luz. Además, para el análisis Raman, se busca integrar proteínas adicionales a las propuestas en esta tesis con el objetivo de profundizar mas en el estudio de las interacciones luz/tejido en procesos histológicos. Se tiene un especial interés en otras técnicas basadas en la luz, como la luz pulsada y sus aplicaciones para tratamiento en enfermedades dermatológicas como las cicatrices de acné, rosácea, melasma o psoriasis, así como el estudio de los efectos de la cirugía láser no-ablativa. Otra aproximación considerada para el estudio de cirugías basadas en la luz es la integración de mas data-sets a diferentes tiempos para valorar la efectividad del tratamiento y su evolución de forma individualizada.

En cuanto a el estudio del patrón térmico de pacientes con rosácea, se contempla el uso de técnicas de mas robustas que las presentadas en esta tesis, entre las cuáles se pueden mencionar las redes neuronales o máquinas de soporte vectorial para la clasificación de datos. Un aspecto importante a mencionar como trabajo a futuro es el incremento de la base de datos de termogramas de pacientes con rosácea para obtener

resultados mas precisos y de esta forma establecer la imagenología por termografía infrarroja digital como herramienta auxiliar en el manejo y diagnóstico de rosácea. Como un estudio complementario, se puede mencionar la inclusión de un análisis entre los diferentes tipos de rosácea para cuantificar los patrones térmicos de cada manifestación de la enfermedad.

El estudio de la propagación de la luz en tejidos biológicos es de gran interés debido al gran alcance que pueden alcanzar los modelos teóricos que fueron discutidos brevemente en la Sección 1.1. Esta tesis versó sobre el estudio experimental de técnicas ópticas para el monitoreo de enfermedades dermatológicas. Se utilizaron las técnicas de espectroscopía Raman, espectroscopía de reflectancia difusa y la imagenología por termografía infrarroja digital. Para el procesado y análisis de datos se emplearon técnicas del cada vez mas creciente concepto de *Data Science* o *Ciencia de Datos* para establecer criterios de clasificación, discriminación y correlación de los datasets obtenidos con las técnicas ópticas. Como principal trabajo a futuro, se plantea integrar el estudio teórico de la propagación de la luz en los tejidos biológicos, utilizando el método de Monte Carlo y el método del Elemento Finito, para la valoración de tratamientos no solo en la dermatología, sino en diversas áreas de la medicina como la oftalmología, la odontología, la neurología, etc.

Capítulo 8

Productividad Académica

8.1. Artículos Indexados

- **Dynamic Infrared Thermography of Nanoheaters Embedded in Skin-Equivalent Phantoms** [331].

Karla Alejandra López-Varela, Nicolas Cayetano-Castro, Eleazar Samuel Kolosovas-Machuca, Francisco Javier González, *Fernando Sebastián Chiwo* and Jose Luís Rodríguez-López.

Hindawi Journal of Nanomaterials Volume 2018, Article ID 3847348, 8 pages

DOI: 10.1155/2018/3847348

- **Design and Implementation of a Low-Cost Portable Raman Spectrometer** [9, 223].

Fernando Sebastián Chiwo and Francisco Javier González.

Revista Mexicana de Física 65(2019)274-277.

DOI: 10.31349/RevMexFis.65.274.

- **Use of Raman Spectroscopy in the Assessment of Skin after CO_2 Ablative Fractional Laser Surgery on Acne Scars** [38].

Fernando Sebastián Chiwo, Edgar Guevara, Miguel Ghebre Ramírez-Elías, Claudio Cayetano Castillo-Martínez, Carlos Eduardo Osornio-Martínez, Rodrigo Cabrera-Alonso, Francisco Pérez-Atamoros and Francisco Javier González.

Skin Research and Technology 2019;00 : 1-5.

DOI: 10.1111/srt.12722

8.2. Participación en Concursos

- **Diseño y Construcción de un Sistema Portátil de Espectroscopía Raman para Diagnóstico Médico No-Invasivo** [9].

Fernando Sebastián Chiwo and Francisco Javier González.

Concurso de Carteles de Estudiantes de Posgrado 2014, San Luís Potosí, S.L.P., México.

- **Tratamiento de Enfermedades de la Piel utilizando Técnicas Ópticas** [38, 223].

Fernando Sebastián Chiwo and Francisco Javier González.

Concurso de Carteles de Estudiantes de Posgrado 2017, San Luís Potosí, S.L.P., México.

8.3. Presentación en Congresos Nacionales e Internacionales

- **Thermal Pattern Determination in Patients with Rosacea using Infrared Thermography** [199].

Susana Ramírez-Valladolid, *Fernando Sebastián Chiwo*, Carlos Eduardo Osornio, Rodrigo Cabrera-Alonso, Benjamín Moncada and Francisco Javier González.

Clinical Research: Pathophysiology and Therapeutics.

Journal of Investigative Dermatology 138(5):S83

International Investigative Dermatology 2018, Orlando, Florida, USA.

DOI: 10.1016/j.jid.2018.03.495.

- **Noninvasive Detection of Collagen Regeneration after an Isotretinoin Treatment and Ablative Laser Surgery in Patients with Acne Scars by Raman Spectroscopy.** [290]

Fernando Sebastián Chiwo, Edgar Guevara, Miguel Ghebré Ramírez-Elías, Claudio Castillo-Martínez, Carlos Eduardo Osornio-Martínez, Rodrigo Cabrera-Alonso, Francisco Pérez- Atamoros and Francisco Javier González.

SPIE Optics+Photonics 2018, San Diego, California, USA.

DOI: 10.1117/12.2320016.

- **Capacitors Dopped with Nanoparticles for Biological Sensing.**

Fernando Sebastián Chiwo, Brhayllan Mora-Ventura, Gabriel González and Francisco Javier González.

Sociedad Mexicana de Materiales A.C.

8.4. Artículos de Divulgación

- **Fabricación de Micro y Nano Biosensores para Detección de Enfermedades** [332].
Brhayllan Mora-Ventura, Gabriel González and *Fernando Sebastián Chiwo*.
Universitarios Potosinos 2020.

- **Diseño y Fabricación de Sustratos SERS para Detección de Enfermedades Orales** [333].
Javier Méndez Lozoya, *Fernando Sebastian Chiwo*, Juan Roberto Moreno-García and Francisco
Javier González.
Lazos 2022.

Bibliografía

- [1] Robert Splinter and Brett A. Hooper. *An Introduction to Biomedical Optics*. CRC Press Taylor & Francis, 2007.
- [2] David A. Boas, C. Pitris, and N. Ramanujam. *Handbook of Biomedical Optics*, volume 12. CRC Press LLC, 2011.
- [3] Gerd Keiser. *Biophotonics: Concepts to Applications*. Springer Graduate Texts in Physics, 2016.
- [4] Tuan Vo-Dinh. *Biomedical Photonics*. 2003.
- [5] Frank S. Barnes and Ben Greenebaum. *Handbook of Biological Effects of Electromagnetics Fields: Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields*, volume 47. Taylor & Francis, 3rd edition, 2007.
- [6] P.N. Prasad. *Introduction to Biophotonics*. Wiley-Interscience, 2003.
- [7] Robert R. Alfano, Darayash B. Tata, Julius Cordero, Michele A. Alfano, Philip Tomashefsky, and Frank W. Longo. Laser Induced Fluorescence Spectroscopy from Native Cancerous and Normal Tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 20(12):1507–1511, 1984.
- [8] Irving J Bigio and Judith R Mourant. Optical Biopsy. *Encyclopedia of Optical Engineering*, pages 1577–1593, 2011.
- [9] Fernando Sebastián Chiwo. *Diseño y Construcción de un Sistema Portátil de Espectroscopía Raman para Diagnóstico Médico No-Invasivo*. Tesis, Posgrado en Ingeniería Electrónica, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2015.
- [10] Seok Hyun Yun and Sheldon J.J. Kwok. Light in diagnosis, therapy and surgery. *Nature Biomedical Engineering*, 1(1), 2017.
- [11] V. Tuchin. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics*. SPIE Press, 3rd edition, 2015.

- [12] Rongguang Liang. *Optical Design for Biomedical Imaging*. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2010.
- [13] L.V. Wang and H. Wu. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. Wiley-Interscience, 2007.
- [14] J.G. Fujimoto, D.L. Farkas, and B.R. Masters. *Biomedical Optical Imaging*. Number 5. 2010.
- [15] Peter Lasch and Janina Kneipp. *Biomedical Vibrational Spectroscopy*. 2007.
- [16] F.J. González. *Noninvasive Detection of Filaggrin Molecules by Raman Spectroscopy, Book Chapter in Filaggrin*. Springer-Verlag, 2014.
- [17] Valery Tuchin. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostis*. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2015.
- [18] Robert H. Wilson, Kyle P. Nadeau, Frank B. Jaworski, Bruce J. Tromberg, and Anthony J. Durkin. Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization. *Journal of Biomedical Optics*, 20(3):030901, 2015.
- [19] Lingyan Shi, Laura A. Sordillo, Adrián Rodríguez-Contreras, and Robert Alfano. Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging. *Journal of Biophotonics*, 9(1-2):38–43, 2016.
- [20] Diana C. Sordillo, Laura A. Sordillo, Peter P. Sordillo, Lingyan Shi, and Robert R. Alfano. Short wavelength infrared optical windows for evaluation of benign and malignant tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 22(4):045002, 2017.
- [21] Fabrizio Martelli, Samuele Del Bianco, Andrea Ismaelli, and Giovanni Zaccanti. *Light Propagation through Biological Tissue*. 2010.
- [22] Lihong Wang, Steven L. Jacques, and Liqiong Zheng. MCML-Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47(2):131–146, 1995.
- [23] Vijitha Periyasamy and Manojit Pramanik. Advances in Monte Carlo Simulation for Light Propagation in Tissue. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 10:122–135, 2017.
- [24] Caigang Zhu and Quan Liu. Review of Monte Carlo modeling of light transport in tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 18(5):050902, 2013.
- [25] Alexander P. Dumont, Qianqian Fang, and Chetan A. Patil. A computationally efficient Monte-Carlo model for biomedical Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 14(7):1–11, 2021.
- [26] Qianqian Fang. Mesh-based Monte Carlo method using fast ray-tracing in Plücker coordinates. *Biomedical Optics Express*, 1(1):165, 2010.

- [27] Ruoyang Yao, Xavier Intes, and Qianqian Fang. Generalized mesh-based Monte Carlo for wide-field illumination and detection via mesh retessellation. *Biomedical Optics Express*, 7(1):171, 2016.
- [28] Ruoyang Yao, Xavier Intes, and Qianqian Fang. Direct approach to compute Jacobians for diffuse optical tomography using perturbation Monte Carlo-based photon “replay”. *Biomedical Optics Express*, 9(10):4588, 2018.
- [29] Shijie Yan, Anh Phong Tran, and Qianqian Fang. Dual-grid mesh-based Monte Carlo algorithm for efficient photon transport simulations in complex three-dimensional media. *Journal of Biomedical Optics*, 24(02):1, 2019.
- [30] Yaoshen Yuan, Shijie Yan, and Qianqian Fang. Light transport modeling in highly complex tissues using implicit mesh-based Monte Carlo algorithm. *Biomedical Optics Express*, 12(1):147–161, 2020.
- [31] Dominik Marti, Rikke N. Aasbjerg, Peter E. Andersen, and Anders K. Hansen. MCmatlab: an open-source, user-friendly, MATLAB-integrated three-dimensional Monte Carlo light transport solver with heat diffusion and tissue damage. *Journal of Biomedical Optics*, 23(12):1, 2018.
- [32] Alekski A Leino, Aki Pulkkinen, and Tanja Tarvainen. ValoMC: a Monte Carlo software and MATLAB toolbox for simulating light transport in biological tissue. *OSA Continuum*, 2(3):957, 2019.
- [33] M. Schweiger, S.R. Arridge, M. Hiraoka, and D.T. Delpy. The finite element method for the propagation of light in scattering media: boundary and source conditions. *Med Phys.*, 1995.
- [34] Kawthar Shurrab, Nabil Kochaji, and Wesam Bachir. Development of temperature distribution and light propagation model in biological tissue irradiated by 980 nm laser diode and using COMSOL simulation. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 8(3):118–122, 2017.
- [35] Andrea Mendizabal, Rémi Bessard Duparc, Huu Phuoc Bui, Christoph J. Paulus, Igor Peterlik, and Stéphane Cotin. Face-based smoothed finite element method for real-time simulation of soft tissue. *Medical Imaging 2017: Image-Guided Procedures, Robotic Interventions, and Modeling*, 10135(March 2017):101352H, 2017.
- [36] Yongping Lin, Zhifang Li, Yang-Huan Luo, and Hui Li. Finite element simulation of pulsed laser-induced thermotherapy for biological liver tissue. (October 2018):134, 2018.
- [37] Haiyang Song, Peiliang Qi, Dongqing Peng, Xiaoman Zhang, and Lili Zhu. Propagation of ultrasound-modulated scattered light in biological tissue by using COMSOL multiphysics. 1118612(November 2019):37, 2019.

- [38] Fernando Sebastian Chiwo, Edgar Guevara, Miguel Ghebre Ramírez-Elías, Claudio Cayetano Castillo-Martínez, Carlos Eduardo Osornio-Martínez, Rodrigo Cabrera-Alonso, Francisco Pérez-Atamoros, and Francisco Javier González. Use of Raman spectroscopy in the assessment of skin after CO₂ ablative fractional laser surgery on acne scars. *Skin Research and Technology*, 25(6):805–809, 2019.
- [39] M. Gnyba, J. Smulko, A. Kwiatkowski, and P. Wierzba. Portable Raman spectrometer - Design rules and applications. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 59(3):325–330, 2011.
- [40] Debbie Lauwers, Anna Garcia Hutado, Vinka Tanevska, Luc Moens, Danilo Bersani, and Peter Vandenaabeele. Characterisation of a portable Raman spectrometer for in situ analysis of art objects. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118:294–301, 2014.
- [41] Urs Utzinger and Rebecca R. Richards-Kortum. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 8(1):121, 2003.
- [42] James F. Kelly, Thomas A. Blake, Bruce E. Bernacki, and Timothy J. Johnson. Design Considerations for a Portable Raman Probe Spectrometer for Field Forensics. *International Journal of Spectroscopy*, 2012:1–15, 2012.
- [43] Jason T. Motz, Martin Hunter, Luis H. Galindo, Joseph A. Gardecki, John R. Kramer, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld. Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Applied Optics*, 43(3):542–554, 2004.
- [44] Ranganathan Parthasarathy, Ganesh Thiagarajan, Xiaomei Yao, Yu-Ping Wang, Paulette Spencer, and Yong Wang. Application of multivariate spectral analyses in micro-Raman imaging to unveil structural/chemical features of the adhesive/dentin interface. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1):014020, 2008.
- [45] J. L. Pichardo-Molina, C. Araujo-Andrade, and G. Gutiérrez-Juárez. Optical spectroscopy and multivariate analysis of biomedical optics. *Revista Mexicana de Física*, 54(3):180–187, 2008.
- [46] Dongliang Song, Fan Yu, Shilin Chen, Yishen Chen, Qingli He, Zhe Zhang, Jingyuan Zhang, and Shuang Wang. Raman spectroscopy combined with multivariate analysis to study the biochemical mechanism of lung cancer microwave ablation. *Biomedical Optics Express*, 11(2):1061, 2020.
- [47] Jing Zhang. Multivariate analysis and machine learning in cerebral palsy research. *Frontiers in Neurology*, 8(DEC):1–13, 2017.
- [48] C.V. Raman. The Colour of the Sea. *Nature*, 108:367, 1921.
- [49] C.V. Raman. The Nobel Prize, 2021.

- [50] Eugene Hecht. *Optics 4th Edition*. 2002.
- [51] David J Lockwood. *Encyclopedia of Color Science and Technology*. 2016.
- [52] E. Smith and G. Dent. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. Wiley, 2019.
- [53] P Vandenabeele. *Practical Raman Spectroscopy - An Introduction*. Wiley, 2013.
- [54] J.M. Hollas. *Modern Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2004.
- [55] G. Kortüm. *Reflectance Spectroscopy Principles, Methods, Applications*. 1969.
- [56] Bert M. Weckhuysen and Robert A. Schoonheydt. Recent progress in diffuse reflectance spectroscopy of supported metal oxide catalysts. *Catalysis Today*, 49(4):441–451, 1999.
- [57] Emilie Péry, Walter C.P.M. Blondel, Cédric Thomas, Jacques Didelon, and François Guillemin. Diffuse reflectance spectroscopy Monte-Carlo modeling: Elongated arterial tissues optical properties. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*, 6(PART 1):41–46, 2006.
- [58] A. J. Moy and J. W. Tunnell. Diffuse Reflectance Spectroscopy and Imaging. *Imaging in Dermatology*, pages 203–215, 2016.
- [59] PIKE. Diffuse Reflectance – Theory and Applications. Technical report, 2011.
- [60] F. J. González, M. Martínez-Escanamé, R. I. Muñoz, B. Torres-Álvarez, and B. Moncada. Diffuse reflectance spectrophotometry for skin phototype determination. *Skin Research and Technology*, 16(4):397–400, 2010.
- [61] S. Lis, R. Dylewicz, J. Myśliwiec, A. Miniewicz, and S. Patela. Application of flowable oxides in photonics. *Materials Science- Poland*, 26(1):189–194, 2008.
- [62] José Meseguer, Isabel Pérez-Grande, and Angel Sanz-Andrés. Thermal radiation heat transfer. *Spacecraft Thermal Control*, pages 73–86, 2012.
- [63] Waldemar Minkina. Theoretical basics of radiant heat transfer—practical examples of calculation for the infrared (IR) used in infrared thermography measurements. *Quantitative InfraRed Thermography Journal*, 00(00):1–14, 2020.
- [64] Akshay A. Sarawade and Nadir N. Charniya. Infrared Thermography and its Applications: A Review. *Proceedings of the 3rd International Conference on Communication and Electronics Systems, ICCES 2018*, (Icces):280–285, 2018.
- [65] Francisco J. González. Theoretical and clinical aspects of the use of thermography in non-invasive medical diagnosis. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 5(4):347–358, 2016.

- [66] B. B. Lahiri, S. Bagavathiappan, T. Jayakumar, and John Philip. Medical applications of infrared thermography: A review. *Infrared Physics and Technology*, 55(4):221–235, 2012.
- [67] F. J. González, J. L. Porter, and G. D. Boreman. Antenna-coupled infrared focal plane array. *Microwave and Optical Technology Letters*, 48(1):165–166, 2006.
- [68] T. H. Maiman. Paper-Maiman.Pdf, 1960.
- [69] A. L. Schawlow and C. H. Townes. Infrared and optical masers. *Physical Review*, 112(6):1940–1949, 1958.
- [70] H.P. Berlien and G.J. Muller. *Applied Laser Medicine*. Springer, New York City, springer-v edition, 2003.
- [71] R. Rox Anderson and John A. Parrish. Selective photothermolysis: Precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220(4596):524–527, 1983.
- [72] G. B. Altshuler, R. R. Anderson, D. Manstein, H. H. Zenzie, and M. Z. Smirnov. Extended theory of selective photothermolysis. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29(5):416–432, 2001.
- [73] G Moller, K Dorschel, and H Kar. Llill Lillll. 1991, 1991.
- [74] Keith P. Thompson and Qiushi S. Ren. Therapeutic and diagnostic application of lasers in ophthalmology. *Lasers in Medicine*, 80(6):211–245, 2001.
- [75] Rahul Yadav. Encyclopedia of Ophthalmology. *Encyclopedia of Ophthalmology*, pages 1–2, 2016.
- [76] Dix P. Poppas, Robert B. Stewart, J. Mathieu Massicotte, Andrea E. Wolga, Robert T.V. Kung, Alan B. Retik, and Michael R. Freeman. Temperature-controlled laser photocoagulation of soft tissue: In vivo evaluation using a tissue welding model. *Lasers in Surgery and Medicine*, 18(4):335–344, 1996.
- [77] Michael R Hamblin, Marcelo Victor, and Pires De Sousa. *Handbook of Low-Level Laser Therapy*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2016.
- [78] O. Raab. No TitleUeber die Wirkung Fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. *Z Biol*, (39):524 – 46, 1900.
- [79] Sulbha K. Sharma, Pawel Mroz, Tianhong Dai, Ying Ying Huang, Tyler G.St Denis, and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy for cancer and for infections: What is the difference? *Israel Journal of Chemistry*, 52(8-9):691–705, 2012.
- [80] Macrene Alexiades-Armenakas. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in Dermatology*, 24(1):16–25, 2006.

- [81] Rolf Markus Szeimies, Julia Dräger, Christoph Abels, and Michael Landthaler. Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology. *Comprehensive Series in Photosciences*, 2(C):3–15, 2001.
- [82] Julia G. Levy. Photodynamic therapy. *Trends in Biotechnology*, 13(1):14–18, 1995.
- [83] John D. Spikes. The origin and meaning of the term "photodynamic"(as used in "photodynamic therapy", for example). *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 9(3-4):369–371, 1991.
- [84] Stanisław Kwiatkowski, Bartosz Knap, Dawid Przystupski, Jolanta Saczko, Ewa Kędzierska, Karolina Knap-Czop, Jolanta Kotlińska, Olga Michel, Krzysztof Kotowski, and Julita Kulbacka. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(July):1098–1107, 2018.
- [85] C. A. Robertson, D. Hawkins Evans, and H. Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1):1–8, 2009.
- [86] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(1 SPEC. ISS.):1–23, 2005.
- [87] Tom Lister, Philip A. Wright, and Paul H. Chappell. Optical properties of human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 17(9):0909011, 2012.
- [88] Vadim D. Genin, Prisca Rakotomanga, Sergey M. Zaytsev, Elina A. Genina, Ekaterina N. Lazareva, Grégoire Khairallah, Marine Amouroux, Charles Soussen, Hang Chen, Wei Feng, Dan Zhu, Alexey N. Bashkatov, Walter Blondel, and Valery V. Tuchin. Research and development of effective optical technologies for diagnostics in dermatology. page 102, 2019.
- [89] Ekaterina Borisova, Petya Pavlova, Elmira Pavlova, Petranka Troyanova, and Latchezar Avramov. Optical biopsy of human skin - A tool for cutaneous tumours' diagnosis. *International Journal Bioautomation*, 16(1):53–72, 2012.
- [90] Steven L. Jacques. Optical properties of biological tissues: A review. *Physics in Medicine and Biology*, 58(11), 2013.
- [91] Steven L. Jacques and Brian W. Pogue. Tutorial on diffuse light transport. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4):041302, 2008.
- [92] F. J. González, J. Alda, B. Moreno-Cruz, M. Martínez-Escanamé, M. G. Ramírez-Elías, B. Torres-Álvarez, and B. Moncada. Use of Raman spectroscopy for the early detection of filaggrin-related atopic dermatitis. *Skin Research and Technology*, 17(1):45–50, 2011.

- [93] Francisco J. González, Rodrigo Valdes-Rodríguez, Miguel G. Ramírez-Elías, Claudio Castillo-Martínez, Victor M. Saavedra-Alanis, and Benjamín Moncada. Noninvasive detection of filaggrin gene mutations using Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(12):3363, 2011.
- [94] Javier Alda, Claudio Castillo-Martínez, Rodrigo Valdes-Rodríguez, Diana Hernández-Blanco, Benjamín Moncada, and Francisco J. González. Use of Raman spectroscopy in the analysis of nickel allergy. *Journal of Biomedical Optics*, 18(6):061206, 2012.
- [95] Edgar Guevara, Juan Carlos Torres-Galván, Miguel G. Ramírez-Elías, Claudia Luevano-Contreras, and Francisco Javier González. Use of Raman spectroscopy to screen diabetes mellitus with machine learning tools. *Biomedical Optics Express*, 9(10):4998, 2018.
- [96] J. F. Villa-Manríquez, J. Castro-Ramos, F. Gutiérrez-Delgado, M. A. López-Pacheco, and A. E. Villanueva-Luna. Raman spectroscopy and PCA-SVM as a non-invasive diagnostic tool to identify and classify qualitatively glycosylated hemoglobin levels in vivo. *Journal of Biophotonics*, 10(8):1074–1079, 2017.
- [97] Jeon Woong Kang, Yun Sang Park, Hojun Chang, Woochang Lee, Surya Pratap Singh, Wonjun Choi, Luis H. Galindo, Ramachandra R. Dasari, Sung Hyun Nam, Jongae Park, and Peter T.C. So. Direct observation of glucose fingerprint using in vivo Raman spectroscopy. *Science Advances*, 6(4):2–10, 2020.
- [98] B. Moncada, C. Castillo-Martínez, E. Arenas, F. León-Bejarano, M. G. Ramírez-Elías, and F. J. González. Raman spectroscopy analysis of the skin of patients with melasma before standard treatment with topical corticosteroids, retinoic acid, and hydroquinone mixture. *Skin Research and Technology*, 22(2):170–173, 2016.
- [99] R. Cabrera-Alonso, E. Guevara, M. G. Ramírez-Elías, B. Moncada, and F. J. González. Detection of hydroquinone by Raman spectroscopy in patients with melasma before and after treatment. *Skin Research and Technology*, 25(1):20–24, 2019.
- [100] Miguel G. Ramírez-Elías, E. S. Kolosovas-Machuca, David Kershenobich, Carolina Guzmán, Galileo Escobedo, and Francisco J. González. Evaluation of liver fibrosis using Raman spectroscopy and infrared thermography: A pilot study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 19:278–283, 2017.
- [101] Fernando Sebastián Chiwo, Edgar Guevara, Miguel Ghebre Ramírez-Elías, Claudio Castillo-Martínez, Rodrigo Osornio-Martínez, Carlos Eduardo Cabrera-Alonso, Francisco Pérez-Atamoros, and Francisco Javier González Contreras. Noninvasive detection of collagen regeneration after an isotretinoin treatment and ablative laser surgery in patients with acne scars by Raman spectroscopy. *Proceedings of SPIE*, (September):22, 2018.

- [102] Peter J. Caspers, Claudio Nico, Tom C. Bakker Schut, Johanna Sterke, Paul D. A. Pudney, Patricia R. Curto, Abigail Illand, and Gerwin J. Puppels. Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal Raman spectroscopy . *Translational Biophotonics*, 1(1-2):1–10, 2019.
- [103] Francisco J. González, Claudio Castillo-Martínez, Marcela Martínez-Escanamé, Miguel G. Ramírez-Elías, Francisco I. Gaitan-Gaona, Cuauhtémoc Oros-Ovalle, and Benjamín Moncada. Noninvasive estimation of chronological and photoinduced skin damage using Raman spectroscopy and principal component analysis. *Skin Research and Technology*, 18(4):442–446, 2012.
- [104] Aurélie Villaret, Céilia Ipinazar, Tuvana Satar, Eléonore Gravier, Céline Mias, Emmanuel Questel, Anne Marie Schmitt, Valérie Samouillan, Florence Nadal, and Gwendal Josse. Raman characterization of human skin aging. *Skin Research and Technology*, 25(3):270–276, 2019.
- [105] Giuseppe Pezzotti, Marco Boffelli, Daisuke Miyamori, Takeshi Uemura, Yoshinori Marunaka, Wengliang Zhu, and Hiroshi Ikegaya. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. *Journal of Biomedical Optics*, 20(6):065008, 2015.
- [106] Peter J. Caspers. *In vivo skin characterization by confocal Raman microspectroscopy*. PhD thesis, Erasmus Universiteit Rotterdam, 2003.
- [107] Sishan Cui, Shuo Zhang, and Shuhua Yue. Raman Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnosis. *Journal of Healthcare Engineering*, 2018, 2018.
- [108] Anita Mahadevan-Jansen Richards-Kortum and Rebecca. RAMAN SPECTROSCOPY FOR THE DETECTION OF CANCERS AND PRECANCERS. *Journal of Biomedical Optics*, 1(1):31–70, 1996.
- [109] Shiyamala Duraipandian, Mads Sylvest Bergholt, Wei Zheng, Khék Yu Ho, Ming Teh, Khay Guan Yeoh, JJimmy Bok Yan So, Asim Shabbir, and Zhiwei Huang. Real-time Raman spectroscopy for , online gastric cancer diagnosis during clinical endoscopic examination in vivo Shiyamala. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10), 2012.
- [110] Xu Feng, Austin J. Moy, Hieu T. M. Nguyen, Yao Zhang, Matthew C. Fox, Katherine R. Sebastian, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Raman spectroscopy reveals biophysical markers in skin cancer surgical margins. (February):9, 2018.
- [111] Thiago de Oliveira Mendes, Liliane Pereira Pinto, Laurita dos Santos, Vamshi Krishna Tippavajhala, Claudio Alberto Téllez Soto, and Airton Abrahão Martin. Statistical strategies to reveal potential vibrational markers for in vivo analysis by confocal Raman spectroscopy . *Journal of Biomedical Optics*, 21(7):075010, 2016.

- [112] Jianhua Zhao, Harvey Lui, Sunil Kalia, and Haishan Zeng. Real-time Raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection: an independent validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(27):8373–8379, 2015.
- [113] Xu Feng, Matthew C. Fox, Jason S. Reichenberg, Fabiana C. P. S. Lopes, Katherine R. Sebastian, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Biophysical basis of skin cancer margin assessment using Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 10(1):104, 2019.
- [114] Xu Feng, Austin J. Moy, Hieu T. M. Nguyen, Yao Zhang, Jason Zhang, Matthew C. Fox, Katherine R. Sebastian, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 23(05):1, 2018.
- [115] Xu Feng, Austin J. Moy, Hieu T. M. Nguyen, Jason Zhang, Matthew C. Fox, Katherine R. Sebastian, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Raman active components of skin cancer. *Biomedical Optics Express*, 8(6):2835, 2017.
- [116] Jianyong Fan and Huilan Yang. Construction and immune response of HSV-2gD-Hsp70 DNA vaccine. *Journal of Dermatological Science*, 57(1):64–66, 2010.
- [117] Abdullah Chandra Sekhar Talari, Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, and Ihtesham Ur Rehman. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(1):46–111, 2015.
- [118] Ines Latka, Eliana Cordero, Ines Latka, Christian Matthäus, Iwan W. Schie, Jürgen Popp, and In-vivo Raman. In-vivo Raman spectroscopy : from basics to applications In-vivo Raman spectroscopy : from basics. 23(7), 2020.
- [119] Elisabeth Papazoglou, Chetana Sunkari, Mike Neidrauer, John F. Klement, and Jouni Uitto. Non-invasive assessment of UV-induced skin damage: Comparison of optical measurements to histology and MMP expression. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1):138–145, 2010.
- [120] Chao-Kai Hsu, Shih-Yu Tzeng, Chao-Chun Yang, Julia Yu-Yun Lee, Lynn Ling-Huei Huang, Wan-Rung Chen, Michael Hughes, Yu-Wen Chen, Yu-Kai Liao, and Sheng-Hao Tseng. Non-invasive evaluation of therapeutic response in keloid scar using diffuse reflectance spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 6(2):390, 2015.
- [121] K. M. Cross, L. Leonardi, J. R. Payette, M. Gomez, M. A. Levasseur, B. J. Schattka, M. G. Sowa, and J. S. Fish. Clinical utilization of near-infrared spectroscopy devices for burn depth assessment. *Wound Repair and Regeneration*, 15(3):332–340, 2007.
- [122] G. N. Stamatas, B. Z. Zmudzka, N. Kollias, and J. Z. Beer. In vivo measurement of skin erythema and pigmentation: New means of implementation of diffuse reflectance spectroscopy with a commercial instrument. *British Journal of Dermatology*, 159(3):683–690, 2008.

- [123] E. Guevara and F. J. González. Joint optical-electrical technique for noninvasive glucose monitoring. *Revista Mexicana de Física*, 56(5):430–434, 2010.
- [124] Sharmin Akter, Md Golzar Hossain, Izumi Nishidate, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu. Medical applications of reflectance spectroscopy in the diffusive and sub-diffusive regimes. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 26(6):337–350, 2018.
- [125] Liang Lim, Brandon Nichols, Michael R. Migden, Narasimhan Rajaram, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, Merrick I. Ross, and James W. Tunnell. Clinical study of noninvasive in vivo melanoma and nonmelanoma skin cancers using multimodal spectral diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 19(11):117003, 2014.
- [126] Yao Zhang, Austin J. Moy, Xu Feng, Hieu T. M. Nguyen, Katherine R. Sebastian, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Diffuse reflectance spectroscopy as a potential method for nonmelanoma skin cancer margin assessment. *Translational Biophotonics*, 2(3):1–9, 2020.
- [127] Lynn K. Pershing, Vidyanath P. Tirumala, Joel L. Nelson, Judy L. Corlett, Anne G. Lin, Laurence J. Meyer, and Sancy A. Leachman. Reflectance spectrophotometer: The dermatologists’ sphygmomanometer for skin phototyping? *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7):1633–1640, 2008.
- [128] George Zonios, Julie Bykowski, and Nikiforos Kollias. Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6):1452–1457, 2001.
- [129] Walter Blondel, Alain Delconte, Grégoire Khairallah, Frédéric Marchal, Amélie Gavaille, and Marine Amouroux. Spatially-resolved multiply-excited autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: Spectrolive medical device for skin in vivo optical biopsy. *Electronics (Switzerland)*, 10(3):1–20, 2021.
- [130] Narasimhan Rajaram, Timothy J. Aramil, Kelvin Lee, Jason S. Reichenberg, Tri H. Nguyen, and James W. Tunnell. Design and validation of a clinical instrument for spectral diagnosis of cutaneous malignancy. *Applied Optics*, 49(2):142–152, 2010.
- [131] R. P. Clark and M. R. Goff. Medical thermography: current status. *Infrared Technology and Applications*, 1320(October 1990):242, 1990.
- [132] Aldo Di Carlo. Thermography and the possibilities for its applications in clinical and experimental dermatology. *Clinics in Dermatology*, 13(4):329–336, 1995.
- [133] E. Benjumea, Y. Morales, C. Torres, and J. Vilardy. Characterization of thermographic images of skin cancer lesions using digital image processing. *Journal of Physics: Conference Series*, 1221(1), 2019.

- [134] Sebastián E. Godoy, David A. Ramirez, Stephen A. Myers, Greg Von Winckel, Sanchita Krishna, Marianne Berwick, R. Steven Padilla, Pradeep Sen, and Sanjay Krishna. Dynamic infrared imaging for skin cancer screening. *Infrared Physics and Technology*, 70:147–152, 2015.
- [135] Jose David Medina-Preciado, Eleazar Samuel Kolosovas-Machuca, Ezequiel Velez-Gomez, Ariel Miranda-Altamirano, and Francisco Javier González. Noninvasive determination of burn depth in children by digital infrared thermal imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 18(6):061204, 2012.
- [136] Daniel Alejandro Hernandez-Contreras, Hayde Peregrina-Barreto, Jose De Jesus Rangel-Magdaleno, and Francisco Javier Renero-Carrillo. Plantar Thermogram Database for the Study of Diabetic Foot Complications. *IEEE Access*, 7:161296–161307, 2019.
- [137] Claudio Castillo-Martínez, Rodrigo Valdes-Rodríguez, Eleazar S. Kolosovas-Machuca, Benjamín Moncada, and Francisco J. González. Use of digital infrared imaging in the assessment of childhood psoriasis. *Skin Research and Technology*, 19(1):549–551, 2013.
- [138] L. Tizek, M. C. Schielein, F. Seifert, T. Biedermann, A. Böhner, and A. Zink. Skin diseases are more common than we think: screening results of an unreferred population at the Munich Oktoberfest. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(7):1421–1428, 2019.
- [139] Christiana O. Akingbola and Jui Vyas. Dermatological history and examination. *Medicine (United Kingdom)*, 49(6):343–349, 2021.
- [140] Hongfeng Li, Yini Pan, Jie Zhao, and Li Zhang. Skin disease diagnosis with deep learning: A review. *Neurocomputing*, 464:364–393, 2021.
- [141] Ömer Kutlu and Ahmet Metin. Relative changes in the pattern of diseases presenting in dermatology outpatient clinic in the era of the COVID-19 pandemic. *Dermatologic Therapy*, 33(6), 2020.
- [142] C. Carlomagno, D. Bertazioli, A. Gualerzi, S. Picciolini, P. I. Banfi, A. Lax, E. Messina, J. Navarro, L. Bianchi, A. Caronni, F. Marengo, S. Monteleone, C. Arienti, and M. Bedoni. COVID-19 salivary Raman fingerprint: innovative approach for the detection of current and past SARS-CoV-2 infections. *Scientific Reports*, 11(1):1–13, 2021.
- [143] John Eder Sanchez, Sierra A. Jaramillo, Erik Settles, J. Jesus Velazquez Salazar, Alexander Lehr, Javier Gonzalez, Carmen Rodríguez Aranda, Hugo R. Navarro-Contreras, Marlee O. Raniere, Maxx Harvey, David M. Wagner, Andrew Koppisch, Robert Kellar, Paul Keim, and Miguel Jose Yacaman. Detection of SARS-CoV-2 and its S and N proteins using surface enhanced Raman spectroscopy. *RSC Advances*, 11(41):25788–25794, 2021.
- [144] Marija Tasic-Kostov, Milica Martinović, Dusan Ilic, and Maja Cvetkovic. Cotton versus medical face mask influence on skin characteristics during COVID-19 pandemic: A short-term study. *Skin Research and Technology*, (July):1–5, 2021.

- [145] Jongwook Kim, Suji Yoo, Oh Sun Kwon, Eui Taek Jeong, Jun Man Lim, and Sun Gyoo Park. Influence of quarantine mask use on skin characteristics: One of the changes in our life caused by the COVID-19 pandemic. *Skin Research and Technology*, 27(4):599–606, 2021.
- [146] Sae ra Park, Jiyeon Han, Yeong Min Yeon, Na Young Kang, and Eunjoo Kim. Effect of face mask on skin characteristics changes during the COVID-19 pandemic. *Skin Research and Technology*, 27(4):554–559, 2021.
- [147] Gang Yin, Lintao Li, Shun Lu, Yu Yin, Yuanzhang Su, Yilan Zeng, Mei Luo, Maohua Ma, Hongyan Zhou, Lucia Orlandini, Dezhong Yao, Gang Liu, and Jinyi Lang. An efficient primary screening of COVID-19 by serum Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(5):949–958, 2021.
- [148] Lothar Lilge, Angelica Manalac, Madrigal Weersink, Fynn Schwiegelshohn, Tanner Young-Schultz, Abdallatif Satti Abdalrhman, Chengjin Wang, Aldrich Ngan, Frank X. Gu, Vaughn Betz, and Ron Hofmann. Light propagation within N95 filtered face respirators: A simulation study for UVC decontamination. *Journal of Biophotonics*, 13(12):1–10, 2020.
- [149] L. Tizek, M. C. Schielein, F. Seifert, T. Biedermann, A. Böhner, and A. Zink. Skin diseases are more common than we think: screening results of an unreferral population at the Munich Oktoberfest. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(7):1421–1428, 2019.
- [150] Yuji Masuda, Toyonobu Yamashita, Tetsuji Hirao, and Motoji Takahashi. An innovative method to measure skin pigmentation. *Skin Research and Technology*, 15(2):224–229, 2009.
- [151] Izumi Nishidate, Yoshihisa Aizu, Naomichi Yokoi, Tomonori Yuasa, and Hiromichi Mishina. Color appearance of skin tissues and blood vessels: in-vitro and in-vivo experiments. *Optical Engineering for Sensing and Nanotechnology (ICOSN 2001)*, 4416(May 2001):380, 2001.
- [152] Dmitry Yudovsky and Laurent Pilon. Rapid and accurate estimation of blood saturation, melanin content, and epidermis thickness from spectral diffuse reflectance. *Applied Optics*, 49(10):1707–1719, 2010.
- [153] Mamta Shah, Rebecca Heath, and Sarah Chadwick. Abnormal pigmentation within cutaneous scars: A complication of wound healing. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2):403–411, 2012.
- [154] Michael J. Mendenhall, Abel S. Nunez, and Richard K. Martin. Human skin detection in the visible and near infrared. *Applied optics*, 54(35):10559–10570, 2015.
- [155] Susanna K. Fistarol and Peter H. Itin. Disorders of pigmentation. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 8(3):187–202, 2010.
- [156] R. S. Barros and M. Walter. Synthesis of Human Skin Pigmentation Disorders. *Computer Graphics Forum*, 36(1):330–344, 2017.

- [157] Joseph Michael Yardman-Frank and David E. Fisher. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Experimental Dermatology*, pages 1–12, 2020.
- [158] John C. Mavropoulos and Bernard A. Cohen. *Disorders of Pigmentation*. Elsevier Ltd, fourth edition, 2013.
- [159] S. Schalka. New data on hyperpigmentation disorders. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31:18–21, 2017.
- [160] Daniel Barolet, François Christiaens, and Michael R. Hamblin. Infrared and skin: Friend or foe. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 155:78–85, 2016.
- [161] Thierry Passeron and Mauro Picardo. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 31(4):461–465, 2018.
- [162] So Min Kim, Eun So Lee, Seonghyang Sohn, and You Chan Kim. Histopathological Features of Riehl Melanosis. *The American Journal of dermatopathology*, 42(2):117–121, 2020.
- [163] K. Sardana, V. Relhan, V. Garg, and N. Khurana. An observational analysis of erythromelanosis follicularis faciei et colli. *Clinical and Experimental Dermatology*, 33(3):333–336, 2008.
- [164] N. Leung, M. Oliveira, M. A. Selim, L. McKinley-Grant, and E. Lesesky. Erythema dyschromicum perstans: A case report and systematic review of histologic presentation and treatment. *International Journal of Women’s Dermatology*, 4(4):216–222, 2018.
- [165] A. C. Katoulis, N. G. Stavrianeas, S. Georgala, E. Bozi, D. Kalogeromitros, E. Koumantaki, and A. D. Katsambas. Poikiloderma of Civatte: A clinical and epidemiological study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19(4):444–448, 2005.
- [166] Alexander Zink and Johannes Ring. Phototoxic Dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 371(6):559–559, 2014.
- [167] Victor Czerkasij. *Skin of color*, volume 38. 2013.
- [168] Jung Min Bae, Han Mi Jung, Bo Young Hong, Joo Hee Lee, Won Joon Choi, Ji Hae Lee, and Gyong Moon Kim. Phototherapy for vitiligo: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatology*, 153(7):666–674, 2017.
- [169] Oma Agbai, Iltefat Hamzavi, and Jared Jagdeo. Laser treatments for postinflammatory hyperpigmentation a systematic review. *JAMA Dermatology*, 153(2):199–206, 2017.
- [170] Katrice M. Karanfilian, Sara Behbahani, Muriel W. Lambert, Albert Alhatem, Joseph Masessa, Jose Espinal-Mariotte, Robert A. Schwartz, and W. Clark Lambert. The pathophysiology of pityriasis alba: Time-dependent histologic changes. *Clinics in Dermatology*, 38(3):354–356, 2020.

- [171] Mohammed D. Saleem. Biology of human melanocyte development, Piebaldism, and Waardenburg syndrome. *Pediatric Dermatology*, 36(1):72–84, 2019.
- [172] Mohammed D. Saleem, Elias Oussedik, Mauro Picardo, and Jennifer J. Schoch. Acquired disorders with hypopigmentation: A clinical approach to diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(5):1233–1250.e10, 2019.
- [173] Seemal R. Desai. Hyperpigmentation therapy: A review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7(8):13–17, 2014.
- [174] Adrienne S. Glaich, Zakia Rahman, Leonard H. Goldberg, and Paul M. Friedman. Fractional resurfacing for the treatment of hypopigmented scars: A pilot study. *Dermatologic Surgery*, 33(3):289–294, 2007.
- [175] Kulwadee Laosakul and Premjit Juntongjin. Efficacy of tip cryotherapy in the treatment of idiopathic guttate hypomelanosis (IGH): a randomized, controlled, evaluator-blinded study. *Journal of Dermatological Treatment*, 28(3):271–275, 2017.
- [176] Mohammed D. Saleem, Elias Oussedik, Mauro Picardo, and Jennifer J. Schoch. Acquired disorders with hypopigmentation: A clinical approach to diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(5):1233–1250.e10, 2019.
- [177] Christos C. Zouboulis, Andreas D. Katsambas, and Albert M. Kligman. *Pathogenesis and treatment of acne and rosacea*. 2013.
- [178] Anna Hwee Sing Heng and Fook Tim Chew. Systematic review of the epidemiology of acne vulgaris. *Scientific Reports*, 10(1):1–29, 2020.
- [179] Galvan, Federico R., Violeta Barranco, Juan C. Galvan, Santiago Batlle, Sebastian FeliuFajardo, and García. We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1%. In *Intech*, volume i, page 13. 2016.
- [180] Theo Vos, Abraham D. Flaxman, Mohsen Naghavi, Rafael Lozano, Catherine Michaud, Majid Ez-zati, Kenji Shibuya, Joshua A. Salomon, Safa Abdalla, Victor Aboyans, Jerry Abraham, Ilana Ackerman, Rakesh Aggarwal, Stephanie Y. Ahn, Mohammed K. Ali, Mohammad A. Almazroa, Miriam Alvarado, H. Ross Anderson, Laurie M. Anderson, Kathryn G. Andrews, Charles Atkinson, Larry M. Baddour, Adil N. Bahalim, Suzanne Barker-Collo, Lope H. Barrero, David H. Bartels, Maria Gloria Basáñez, Amanda Baxter, Michelle L. Bell, Emelia J. Benjamin, Derrick Bennett, Eduardo Bernabé, Kavi Bhalla, Bishal Bhandari, Boris Bikbov, Aref Bin Abdulhak, Gretchen Birbeck, James A. Black, Hannah Blencowe, Jed D. Blore, Fiona Blyth, Ian Bolliger, Audrey Bonaventure, Soufiane Boufous, Rupert Bourne, Michel Boussinesq, Tasanee Braithwaite, Carol Brayne, Lisa Bridgett, Simon Brooker, Peter Brooks, Traolach S. Brugha, Claire Bryan-Hancock, Chiara

Bucello, Rachele Buchbinder, Geoffrey Buckle, Christine M. Budke, Michael Burch, Peter Burney, Roy Burstein, Bianca Calabria, Benjamin Campbell, Charles E. Canter, H el ene Carabin, Jonathan Carapetis, Loreto Carmona, Claudia Cella, Fiona Charlson, Honglei Chen, Andrew Tai Ann Cheng, David Chou, Sumeet S. Chugh, Luc E. Coffeng, Steven D. Colan, Samantha Colquhoun, K. Ellicott Colson, John Condon, Myles D. Connor, Leslie T. Cooper, Matthew Corriere, Monica Cortinovic, Karen Courville De Vaccaro, William Couser, Benjamin C. Cowie, Michael H. Criqui, Marita Cross, Kaustubh C. Dabhadkar, Manu Dahiya, Nabila Dahodwala, James Damsere-Derry, Goodarz Danaei, Adrian Davis, Diego De Leo, Louisa Degenhardt, Robert Dellavalle, Allyne Delossantos, Julie Denenberg, Sarah Derrett, Don C. Des Jarlais, Samath D. Dharmaratne, Mukesh Dherani, Cesar Diaz-Torne, Helen Dolk, E. Ray Dorsey, Tim Driscoll, Herbert Duber, Beth Ebel, Karen Edmond, Alexis Elbaz, Suad Eltahir Ali, Holly Erskine, Patricia J. Erwin, Patricia Espindola, Stalin E. Ewoigbokhan, Farshad Farzadfar, Valery Feigin, David T. Felson, Alize Ferrari, Cleusa P. Ferri, Eric M. F evre, Mariel M. Finucane, Seth Flaxman, Louise Flood, Kyle Foreman, Mohammad H. Forouzanfar, Francis Gerry R. Fowkes, Richard Franklin, Marlene Fransen, Michael K. Freeman, Belinda J. Gabbe, Sherine E. Gabriel, Emmanuela Gakidou, Hammad A. Ganatra, Bianca Garcia, Flavio Gaspari, Richard F. Gillum, Gerhard Gmel, Richard Gosselin, Rebecca Grainger, Justina Groeger, Francis Guillemin, David Gunnell, Ramyani Gupta, Juanita Haagsma, Holly Hagan, Yara A. Halasa, Wayne Hall, Diana Haring, Josep Maria Haro, James E. Harrison, Rasmus Havmoeller, Roderick J. Hay, Hideki Higashi, Catherine Hill, Bruno Hoen, Howard Hoffman, Peter J. Hotez, Damian Hoy, John J. Huang, Sydney E. Ibeanusi, Kathryn H. Jacobsen, Spencer L. James, Deborah Jarvis, Rashmi Jasrasaria, Sudha Jayaraman, Nicole Johns, Jost B. Jonas, Ganesan Karthikeyan, Nicholas Kassebaum, Norito Kawakami, Andre Keren, Jon Paul Khoo, Charles H. King, Lisa Marie Knowlton, Olive Kobusingye, Adofo Koranteng, Rita Krishnamurthi, Ratilal Lalloo, Laura L. Laslett, Tim Lathlean, Janet L. Leasher, Yong Yi Lee, James Leigh, Stephen S. Lim, Elizabeth Limb, John Kent Lin, Michael Lipnick, Steven E. Lipshultz, Wei Liu, Maria Loane, Summer Lockett Ohno, Ronan Lyons, Jixiang Ma, Jacqueline Mabweijano, Michael F. MacIntyre, Reza Malekzadeh, Leslie Mallinger, Sivabalan Manivannan, Wagner Marcenes, Lyn March, David J. Margolis, Guy B. Marks, Robin Marks, Akira Matsumori, Richard Matzopoulos, Bongani M. Mayosi, John H. McAnulty, Mary M. McDermott, Neil McGill, John McGrath, Maria Elena Medina-Mora, Michele Meltzer, Ziad A. Memish, George A. Mensah, Tony R. Merriman, Ana Claire Meyer, Valeria Miglioli, Matthew Miller, Ted R. Miller, Philip B. Mitchell, Ana Olga Mocumbi, Terrie E. Moffitt, Ali A. Mokdad, Lorenzo Monasta, Marcella Montico, Maziar Moradi-Lakeh, Andrew Moran, Lidia Morawska, Rintaro Mori, Michele E. Murdoch, Michael K. Mwaniki, Kovin Naidoo, M. Nathan Nair, Luigi Naldi, K. M. Venkat Narayan, Paul K. Nelson, Robert G. Nelson, Michael C. Nevitt, Charles R. Newton, Sandra Nolte, Paul Norman, Rosana Norman, Martin O'Donnell, Simon O'Hanlon, Casey Olives, Saad B. Omer, Katrina Ortblad, Richard Osborne, Doruk Ozgediz, Andrew Page, Bishnu

Pahari, Jeyaraj Durai Pandian, Andrea Panozo Rivero, Scott B. Patten, Neil Pearce, Rogelio Perez Padilla, Fernando Perez-Ruiz, Norberto Perico, Konrad Pesudovs, David Phillips, Michael R. Phillips, Kelsey Pierce, Sébastien Pion, Guilherme V. Polanczyk, Suzanne Polinder, C. Arden Pope, Svetlana Popova, Esteban Porrini, Farshad Pourmalek, Martin Prince, Rachel L. Pullan, Kapa D. Ramaiah, Dharani Ranganathan, Homie Razavi, Mathilda Regan, Jürgen T. Rehm, David B. Rein, Guiseppe Remuzzi, Kathryn Richardson, Frederick P. Rivara, Thomas Roberts, Carolyn Robinson, Felipe Rodriguez De León, Luca Ronfani, Robin Room, Lisa C. Rosenfeld, Lesley Rushton, Ralph L. Sacco, Sukanta Saha, Uchechukwu Sampson, Lidia Sanchez-Riera, Ella Sanman, David C. Schwebel, James Graham Scott, Maria Segui-Gomez, Saeid Shahraz, Donald S. Shepard, Hwashin Shin, Rupak Shivakoti, Donald Silberberg, David Singh, Gitanjali M. Singh, Jasvinder A. Singh, Jessica Singleton, David A. Sleet, Karen Sliwa, Emma Smith, Jennifer L. Smith, Nicolas J.C. Stapelberg, Andrew Steer, Timothy Steiner, Wilma A. Stolk, Lars Jacob Stovner, Christopher Sudfeld, Sana Syed, Giorgio Tamburlini, Mohammad Tavakkoli, Hugh R. Taylor, Jennifer A. Taylor, William J. Taylor, Bernadette Thomas, W. Murray Thomson, George D. Thurston, Imad M. Tleyjeh, Marcello Tonelli, Jeffrey A. Towbin, Thomas Truelsen, Miltiadis K. Tsilimbaris, Clotilde Ubeda, Eduardo A. Undurraga, Marieke J. Van Der Werf, Jim Van Os, Monica S. Vavilala, N. Venketasubramanian, Mengru Wang, Wenzhi Wang, Kerriane Watt, David J. Weatherall, Martin A. Weinstock, Robert Weintraub, Marc G. Weisskopf, Myrna M. Weissman, Richard A. White, Harvey Whiteford, Steven T. Wiersma, James D. Wilkinson, Hywel C. Williams, Sean R.M. Williams, Emma Witt, Frederick Wolfe, Anthony D. Woolf, Sarah Wulf, Pon Hsiu Yeh, Anita K.M. Zaidi, Zhi Jie Zheng, David Zonies, Alan D. Lopez, and Christopher J.L. Murray. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859):2163–2196, 2012.

- [181] J. F. Shannon. Why do humans get acne? A hypothesis. *Medical Hypotheses*, 134(August 2019):109412, 2020.
- [182] Hayley Smith, Alison M. Layton, Diane Thiboutot, Abbey Smith, Heather Whitehouse, Waseem Ghumra, Meenakshi Verma, Jerry Tan, Georgina Jones, Kathryn Gilliland, Megha Patel, Elaine Otchere, and Anne Eady. Identifying the Impacts of Acne and the Use of Questionnaires to Detect These Impacts: A Systematic Literature Review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 22(2):159–171, 2021.
- [183] Diane M. Thiboutot, Brigitte Dréno, Abdullah Abanmi, Andrew F. Alexis, Elena Araviiskaia, Maria Isabel Barona Cabal, Vincenzo Bettoli, Flordeliz Casintahan, Steven Chow, Adilson da Costa, Tam El Ouazzani, Chee Leok Goh, Harald P.M. Gollnick, Minerva Gomez, Nobukazu Hayashi, Maria Isabel Herane, Juan Honeyman, Sewon Kang, Lajos Kemeny, Raj Kubba, Julien Lambert, Alison M. Layton, James J. Leyden, Jose Luis López-Estebanz, Nopadon Noppakun, Falk Och-

- sendorf, Cristina Oprica, Beatriz Orozco, Montserrat Perez, Jaime Piquero-Martin, Jo Ann See, Dae Hun Suh, Jerry Tan, Vicente Torres Lozada, Patricia Troielli, and Leihong Flora Xiang. Practical management of acne for clinicians: An international consensus from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(2):S1–S23.e1, 2018.
- [184] Hywel C. Williams, Robert P. Dellavalle, and Sarah Garner. Acne vulgaris. *The Lancet*, 379(9813):361–372, 2012.
- [185] Gerd Plewig, Bodo Melnik, and WenChieh Chen. *Acne and Rosacea*. 2019.
- [186] Tanya Greywal, Andrea L. Zaenglein, Hilary E. Baldwin, Neal Bhatia, Karen A. Chernoff, James Q. Del Rosso, Lawrence F. Eichenfield, Marc H. Levin, James J. Leyden, Diane M. Thiboutot, Guy F. Webster, and Sheila Fallon Friedlander. Evidence-based recommendations for the management of acne fulminans and its variants. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(1):109–117, 2017.
- [187] B. Dréno. Recent data on epidemiology of acne. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 137(12 SUPPL. 1):3–5, 2010.
- [188] D. M. Thiboutot. The role of follicular hyperkeratinization in acne. *Journal of Dermatological Treatment*, 11(SUPPL. 2):5–8, 2000.
- [189] Eftychia Platsidaki and Clio Dessinioti. Recent advances in understanding Propionibacterium acnes (Cutibacterium acnes) in acne. *F1000Research*, 7(0), 2018.
- [190] John D. Murphy, Dale Sandler, Alexandra J. White, and Katie M. O’Brien. Severe acne and risk of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 177(2):487–495, 2019.
- [191] Tahir Ch.M. Pathogenesis of acne vulgaris: Simplified. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 20(2):93–97, 2010.
- [192] D. H. Suh and H. H. Kwon. What’s new in the physiopathology of acne? *British Journal of Dermatology*, 172(S1):13–19, 2015.
- [193] Laura J. Savage and Alison M. Layton. Treating acne vulgaris: Systemic, local and combination therapy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(4):563–580, 2010.
- [194] Roshaslinie Ramli, Aamir Saeed Malik, Ahmad Fadzil Mohamad Hani, and Adawiyah Jamil. Acne analysis, grading and computational assessment methods: An overview. *Skin Research and Technology*, 18(1):1–14, 2012.

- [195] Anthony H.T. Jeremy, Diana B. Holland, Susan G. Roberts, Kathryn F. Thomson, and William J. Cunliffe. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(1):20–27, 2003.
- [196] Danielle Well. Acne Vulgaris: A review of causes and treatment options. Technical Report 1, 2013.
- [197] Christos C. Zouboulis. Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology*, 22(5):360–366, 2004.
- [198] Anatomical Chart Co. Atlas of Pathophysiology 3rd. Ed. Technical report, 2010.
- [199] S. Ramirez-Valladolid, F. S. Chiwo, R. Osornio-Martinez, C. Cabrera-Alonso, B. Moncada, and F.J. Gonzalez. Thermal pattern determination in patients with rosacea using infrared thermography. In *Journal of Investigative Dermatology*, volume 138, page S83, 2018.
- [200] Frank Powell. *Rosacea: Diagnosis and Management*, volume 4. Informa Healthcare USA, Inc., 2009.
- [201] S. Ayres and N.P. Anderson. Acne Rosacea. *JAMA Dermatology*, 1933.
- [202] E. Bonnar, P. Eustace, and F. C. Powell. The Demodex mite population in rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28(3):443–448, 1993.
- [203] Fabienne M.N. Forton. The Pathogenic Role of Demodex Mites in Rosacea: A Potential Therapeutic Target Already in Erythematotelangiectatic Rosacea? *Dermatology and Therapy*, 10(6):1229–1253, 2020.
- [204] Authors Daniel Morgado-carrasco, Corinne Granger, Carles Trullas, and Jaime Piquero-casals. Impact of ultraviolet radiation and exposome on rosacea. Key role of photoprotection in optimizing treatment. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2021.
- [205] J. Tan, L. M.C. Almeida, A. Bewley, B. Cribier, N. C. Dlova, R. Gallo, G. Kautz, M. Mannis, H. H. Oon, M. Rajagopalan, M. Steinhoff, D. Thiboutot, P. Troielli, G. Webster, Y. Wu, E. J. van Zuuren, and M. Schaller. Updating the diagnosis, classification and assessment of rosacea: recommendations from the global ROSacea COnsensus (ROSCO) panel. *British Journal of Dermatology*, 176(2):431–438, 2017.
- [206] Yafeng Ma, Lulu Li, Jia Chen, Tian Chen, and Chao Yuan. Distinguishing rosacea from sensitive skin by reflectance confocal microscopy. *Skin Research and Technology*, 26(5):671–674, 2020.
- [207] Hamidullah Binol, Alisha Plotner, Jennifer Sopkovich, Benjamin Kaffenberger, Muhammad Khalid Khan Niazi, and Metin N. Gurcan. Ros-NET: A deep convolutional neural network for automatic identification of rosacea lesions. *Skin Research and Technology*, 26(3):413–421, 2020.

- [208] Jonathan Wilkin, Mark Dahl, Michael Detmar, Lynn Drake, Matthew H. Liang, Richard Odom, and Frank Powell. Standard grading system for rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(6):907–912, 2004.
- [209] Carsten Sauer Mikkelsen, Helene Ringe Holmgren, Petra Kjellman, Michael Heidenheim, Ari Kappinen, Peter Bjerring, and Theis Huldtd-Nystrøm. Rosacea: A clinical review. *Dermatology Reports*, 8(1):8–12, 2016.
- [210] Z. Zaidi and K. Hussain. *Treatment of Skin Diseases A Practical Guide*. Springer International Publishing, 2019.
- [211] Matt Venus, Jacqueline Waterman, and Ian McNab. Basic physiology of the skin. *Surgery*, 28(10):469–472, 2010.
- [212] Rodrigo Hernando Valdes-Rodríguez. *Metodos No Invasivos para el Estudio de Enfermedades de la Piel Presenta*. PhD thesis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2013.
- [213] B. W. Barry, H. G.M. Edwards, and A. C. Williams. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands. *Journal of Raman Spectroscopy*, 23(11):641–645, 1992.
- [214] Xu Feng, Austin J. Moy, Hieu T. M. Nguyen, Yao Zhang, Jason Zhang, Matthew C. Fox, Katherine R. Sebastian, Jason S. Reichenberg, Mia K. Markey, and James W. Tunnell. Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 23(05):1, 2018.
- [215] Miguel Ghebre Ramirez-Elias. Raman Spectroscopy for In Vivo Medical Diagnosis. In *Raman Spectroscopy*, page 29. 2018.
- [216] F. Korinth, A. S. Mondol, C. Stiebing, I. W. Schie, C. Krafft, and J. Popp. New methodology to process shifted excitation Raman difference spectroscopy data: a case study of pollen classification. *Scientific Reports*, 10(1):1–12, 2020.
- [217] Laura E. Masson, Christine M. O’Brien, Isaac J. Pence, Jennifer L. Herington, Jeff Reese, Ton G. Van Leeuwen, and Anita Mahadevan-Jansen. Dual excitation wavelength system for combined fingerprint and high wavenumber Raman spectroscopy. *Analyst*, 143(24):6049–6060, 2018.
- [218] Kay Sowoidnich and Heinz-Detlef Kronfeldt. Fluorescence Rejection by Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy at Multiple Wavelengths for the Investigation of Biological Samples. *ISRN Spectroscopy*, 2012:1–11, 2012.
- [219] Jianhua Zhao, Harvey Lui, David I. Mclean, and Haishan Zeng. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 61(11):1225–1232, 2007.

- [220] A. Savitzky and M.J.E. Golay. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8):1639–1643, 1964.
- [221] Jianwen Luo, Kui Ying, and Jing Bai. Savitzky-Golay smoothing and differentiation filter for even number data. *Signal Processing*, 85(7):1429–1434, 2005.
- [222] Sinead J. Barton, Tomas E. Ward, and Bryan M. Hennelly. Algorithm for optimal denoising of Raman spectra. *Analytical Methods*, 10(30):3759–3769, 2018.
- [223] F. S. Chiwo and F. J. González. Design and implementation of an experimental Raman spectrometer. *Revista Mexicana de Física*, 65(3):274–277, 2019.
- [224] Shang Yang. High-Wavenumber Raman Analysis. In *Recent Developments in Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy for Materials Characterization*. 2021.
- [225] Karima Belbachir, Razia Noreen, Gilles Gouspillou, and Cyril Petibois. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(3):829–837, 2009.
- [226] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, R. Wolthuis, H. A. Bruining, and G. J. Puppels. In vitro and in vivo raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*, 4(5 SUPPL. 1), 1998.
- [227] T. T. Nguyen, C. Gobinet, J. Feru, S. Brassart Pasco, M. Manfait, and O. Piot. Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Spectroscopy (New York)*, 27(5-6):421–427, 2012.
- [228] Huaxu Liu, Yongyan Dang, Zhan Wang, Xinyu Chai, and Qiushi Ren. Laser induced collagen remodeling: A comparative study in vivo on mouse model. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(1):13–19, 2008.
- [229] Helena Kuivaniemi and Gerard Tromp. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, pages 151–171, 2019.
- [230] A. Sudhakar and R. Kalluri. Molecular mechanisms of angiostasis. *Encyclopedia of the Eye*, pages 52–59, 2010.
- [231] J. M.B. Sand, F. Genovese, N. S. Gudmann, and M. A. Karsdal. *Type IV collagen*. Elsevier Inc., second edition, 2019.
- [232] Ana Maria Abreu Velez and Michael S. Howard. Collagen IV in normal and in disease process. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(1):1–8, 2012.

- [233] Juliana Baptista, Manoela Domingues Martins, Vanessa Christina Santos Pavesi, Sandra Kalil Busadori, Kristianne Porta Santos Fernandes, Décio Dos Santos Pinto Júnior, and Raquel Agnelli Mesquita Ferrari. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29(1):11–17, 2011.
- [234] Morten A. Karsdal. *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: Structure, function and biomarkers*. 2019.
- [235] D. E. Birk. Type V collagen: Heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*, 32(3):223–237, 2001.
- [236] Ki M. Mak, Chien Yi M. Png, and Danielle J. Lee. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anatomical Record*, 299(5):613–629, 2016.
- [237] N. Patel and M. Clement. Selective Nonablative Treatment of Acne Scarring With 585 nm Flashlamp Pulsed Dye Laser. *Dermatol Surg*, 2002.
- [238] Greg J Goodman. Post-acne scarring: A short review of its pathophysiology. *Australasian Journal of Dermatology*, 42(2):84–90, 2001.
- [239] Greg J. Goodman. Post acne scarring: A review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 5(2):77–95, 2003.
- [240] Julien Lanoue and Gary Goldenberg. Acne scarring: A review of cosmetic therapies. *Cutis*, 95(5):276–281, 2015.
- [241] Gerd Plewig, Bodo Melnik, and WenChieh Chen. *Plewig and Kligman’s Acne and Rosacea*. 2019.
- [242] Gabriella Fabbrocini, M. C. Annunziata, V. D’Arco, V. De Vita, G. Lodi, M. C. Mauriello, F. Pastore, and G. Monfrecola. Acne scars: Pathogenesis, classification and treatment. *Dermatology Research and Practice*, 2010(1), 2010.
- [243] Brigitte Dréno and Linda Stein Gold. Acne Scarring: Why We Should Act Sooner Rather Than Later. *Dermatology and Therapy*, 11(4):1075–1078, 2021.
- [244] Greg J. Goodman and Jennifer A. Baron. Postacne scarring: A qualitative global scarring grading system. *Dermatologic Surgery*, 32(12):1458–1466, 2006.
- [245] Maya Valeska Gozali, Bingrong Zhou, and Dan Luo. Effective treatments of atrophic acne scars. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 8(5):33–40, 2015.
- [246] Douglas Fife. Practical evaluation and management of atrophic acne scars: Tips for the general dermatologist. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 4(8):50–57, 2011.

- [247] Douglas Fife and Christopher B. Zachary. Combining Techniques for Treating Acne Scars. *Current Dermatology Reports*, 1(2):82–88, 2012.
- [248] Diane Thiboutot, Harald Gollnick, Vincenzo Bettoli, Brigitte Dréno, Sewon Kang, James J. Leyden, Alan R. Shalita, Vicente Torres Lozada, Diane Berson, Andrew Finlay, Chee Leok Goh, María Isabel Herane, Ana Kaminsky, Raj Kubba, Alison Layton, Yoshiki Miyachi, Montserrat Perez, Jaime Piquero Martin, Marcia Ramos-e Silva, Jo Ann See, Neil Shear, and John Wolf. New insights into the management of acne: An update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne Group. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(5 SUPPL. 1), 2009.
- [249] Shashank Bhargava, Paulo R. Cunha, Jennifer Lee, and George Kroumpouzou. Acne Scarring Management: Systematic Review and Evaluation of the Evidence. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(4):459–477, 2018.
- [250] Rei Ogawa. Total scar management: From lasers to surgery for scars, keloids, and scar contractures. *Total Scar Management: From Lasers to Surgery for Scars, Keloids, and Scar Contractures*, pages 1–184, 2019.
- [251] Carolyn I. Jacob, Jeffrey S. Dover, and Michael S. Kaminer. Acne scarring: A classification system and review of treatment options. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(1):109–117, 2001.
- [252] Azadeh Goodarzi, Elham Behrangi, Mohammadreza Ghassemi, Niloufar Najari Nobari, Afsaneh Sadeghzadeh-Bazargan, and Masoumeh Roohaninasab. ACNE scar; A review of classification and treatment. *Journal of Critical Reviews*, 7(7):1108–1114, 2020.
- [253] Kachiu C. Lee, Carlos G. Wambier, Seaver L. Soon, J. Barton Sterling, Marina Landau, P. Rullan, and Harold J. Brody. Basic chemical peeling: Superficial and medium-depth peels. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(2):313–324, 2019.
- [254] Qiao Chen, Nanze Yu, Zhifei Liu, Wenchao Zhang, Fei Long, Ang Zeng, Lin Zhu, and Xiaojun Wang. The Clinical Efficacy of ReCell® Autologous Cell Regeneration Techniques Combined with Dermabrasion Treatment in Acne Scars. *Aesthetic Plastic Surgery*, 44(2):535–542, 2020.
- [255] Brandon E. Cohen, Jeremy A. Brauer, and Roy G. Geronemus. Acne scarring: A review of available therapeutic lasers. *Lasers in Surgery and Medicine*, 48(2):95–115, 2016.
- [256] Neil S. Sadick and Andrea Cardona. Laser treatment for facial acne scars: A review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 20(7-8):424–435, 2018.
- [257] Athanasios I. Pavlidis and Andreas D. Katsambas. Therapeutic approaches to reducing atrophic acne scarring. *Clinics in Dermatology*, 35(2):190–194, 2017.

- [258] M. W S Ong and S. J. Bashir. Fractional laser resurfacing for acne scars: A review. *British Journal of Dermatology*, 166(6):1160–1169, 2012.
- [259] Lisa A. Zaleski-Larsen, Sabrina G. Fabi, Timothy McGraw, and Mark Taylor. Acne scar treatment: A multimodality approach tailored to scar type. *Dermatologic Surgery*, 42:S139–S149, 2016.
- [260] Elizabeth Schoenberg, Mackenzie O’Connor, Jordan V. Wang, Sherry Yang, and Nazanin Saedi. Microneedling and PRP for acne scars: A new tool in our arsenal. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1):112–114, 2020.
- [261] Ali Asilian, Gita Faghihi, Alireza Asemi Esfahani, Fatemeh Mokhtari, Mohammadali Nilforoushza-deh, and Samaneh Mozafarpour. Comparison of two methods of subcision Nokor and blunt blade in acne scars treatment. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(6):1788–1793, 2019.
- [262] Rania S. Abou Eitta, Aisha A. Ismail, Rania A. Abdelmaksoud, Naser A. Ghezlan, and Radwa A. Mehanna. Evaluation of autologous adipose-derived stem cells vs. fractional carbon dioxide laser in the treatment of post acne scars: a split-face study. *International Journal of Dermatology*, 58(10):1212–1222, 2019.
- [263] Tyler Long, Akhil Gupta, Steven Ma, and Sylvia Hsu. Platelet-rich plasma in noninvasive procedures for atrophic acne scars: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(4):836–844, 2020.
- [264] Tina S. Alster, Elizabeth L. Tanzi, and Melissa Lazarus. The use of fractional laser photothermolysis for the treatment of atrophic scars. *Dermatologic Surgery*, 33(3):295–299, 2007.
- [265] M. Manfredini, M. Greco, F. Farnetani, G. Mazzaglia, S. Ciardo, V. Bettoli, A. Virgili, and G. Pellacani. In vivo monitoring of topical therapy for acne with reflectance confocal microscopy. *Skin Research and Technology*, 23(1):36–40, 2017.
- [266] Ding Ding Zhang, Wan Yi Zhao, Qing Qing Fang, Zheng Cai Wang, Xiao Feng Wang, Min Xia Zhang, Yan Yan Hu, Bin Zheng, and Wei Qiang Tan. The efficacy of fractional CO2 laser in acne scar treatment: A meta-analysis. *Dermatologic Therapy*, 34(1), 2021.
- [267] Giovanni Cannarozzo, Gilda Fazia, Luigi Bennardo, Federica Tamburi, Giuseppe Fabrizio Amoroso, Ester Del Duca, and Steven Paul Nisticò. A New 675 nm Laser Device in the Treatment of Facial Aging: A Prospective Observational Study. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 39(2):118–122, 2021.
- [268] Dieter Manstein, G. Scott Herron, R. Kehl Sink, Heather Tanner, and R. Rox Anderson. Fractional photothermolysis: A new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers in Surgery and Medicine*, 34(5):426–438, 2004.

- [269] Mohamed L. Elsaie, Shady M. Ibrahim, and Wael Saudi. Ablative fractional 10600 nm carbon dioxide laser versus non-ablative fractional 1540 nm erbium-glass laser in Egyptian post-acne scar patients. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 9(1):32–35, 2018.
- [270] R. Anderson and J. Parrish. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220(4596):524–527, 1983.
- [271] C. K.N. Patel. Interpretation of CO₂ Optical MASER Experiments. *Physical Review Letters*, 1964.
- [272] C. K.N. Patel. Continuous-Wave Laser Action on Vibrational-Rotational Transitions of CO₂. *Physical Review*, 136(5A), 1964.
- [273] I. Kaplan and S. Giler. *CO₂ Laser Surgery*, volume 53. Springer-Verlag, 1984.
- [274] Isaac Kaplan. The CO₂ surgical laser. *Photomedicine and laser surgery*, 28(6):847–848, 2010.
- [275] Isaac Kaplan. Review article: The CO₂ laser as a versatile surgical modality. *Laser Therapy*, 16(1):25–38, 2007.
- [276] Tokuya Omi and Kayoko Numano. The Role of the CO₂ Laser and Fractional CO₂ Laser in Dermatology. pages 49–60, 2014.
- [277] Lene Hedelund, Christina S. Haak, Katrine Togsverd-Bo, Morten K. Bogh, Peter Bjerring, and Merete Hædersdal. Fractional CO₂ laser resurfacing for atrophic acne scars: A randomized controlled trial with blinded response evaluation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 44(6):447–452, 2012.
- [278] Yaqin Xu and Yunhua Deng. Ablative Fractional CO₂ Laser for Facial Atrophic Acne Scars. *Facial Plastic Surgery*, 34(2):205–219, 2018.
- [279] K. Nouri. *Lasers in Dermatology and Medicine*. Springer, 2011.
- [280] R.C. Blasiak, C.R. Stamey, C.N. Burkhart, A. Lugo-Somolinos, and D.S. Morrell. High-dose isotretinoin treatment and the rate of retreatment, relapse, and adverse effects in patients with acne vulgaris. *JAMA Dermatology*, 149(12):1392–1398, 2013.
- [281] M. Kingsley, E. Graber, and Y.S.C. Bae-Harboe. Treatment of acne scarring with ablative fractionated laser resurfacing following isotretinoin therapy. In *Journal of the American Academy of Dermatology*, volume 66, page AB216, 2012.
- [282] Byalakere Shivanna Chandrashekar, Danda Venkatesh Varsha, Vani Vasanth, Puttarangappa Jagadish, Chandraiah Madura, and Maragowdanahalli Lingegowda Rajashekar. Safety of performing invasive acne scar treatment and laser hair removal in patients on oral isotretinoin: A retrospective study of 110 patients. *International Journal of Dermatology*, 53(10):1281–1285, 2014.

- [283] Jong Hyun Yoon, Eun Joo Park, In Ho Kwon, Chul Woo Kim, Geun Soo Lee, Seung Kyung Hann, Kwang Ho Kim, and Kwang Joong Kim. Concomitant use of an infrared fractional laser with low-dose isotretinoin for the treatment of acne and acne scars. *Journal of Dermatological Treatment*, 25(2):142–146, 2014.
- [284] Omprakash Heggadahalalli Mahadevappa, Venkataram Mysore, Vishalakshi Viswanath, Salim Thurakkal, Imran Majid, Suresh Talwar, Sanjeev J. Aurangabadkar, Manas Chatterjee, Ramesh Bhat, Shyamanta Barua, and Anil Ganjoo. Surgical outcome in patients taking concomitant or recent intake of oral isotretinoin: A multicentric Study-ISO-AIMS study. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 9(2):106–112, 2016.
- [285] H. P. Gollnick, V. Bettoli, J. Lambert, E. Araviiskaia, I. Binic, C. Dessinoti, I. Galadari, R. Ganceviciene, N. Ilter, M. Kaegi, L. Kemeny, J. L. López-Estebanz, A. Massa, C. Oprica, W. Sinclair, J. C. Szepietowski, and B. Dréno. A consensus-based practical and daily guide for the treatment of acne patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(9):1480–1490, 2016.
- [286] Yun Zhu Mu, Lu Jiang, and Hao Yang. The efficacy of fractional ablative carbon dioxide laser combined with other therapies in acne scars. *Dermatologic Therapy*, 32(6):1–6, 2019.
- [287] Steven Halepas, Kevin C. Lee, Zachary L. Higham, and Elie M. Ferneini. A 20-Year Analysis of Adverse Events and Litigation With Light-Based Skin Resurfacing Procedures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 78(4):619–628, 2020.
- [288] Dan Li, Shi Bin Lin, and Biao Cheng. Complications and posttreatment care following invasive laser skin resurfacing: A review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 20(3):168–178, 2018.
- [289] Peter R. Shumaker, Julia M. Kwan, Evangelos V. Badiavas, Jill Waibel, Stephen Davis, and Nathan S. Uebelhoer. Rapid healing of scar-associated chronic wounds after ablative fractional resurfacing. *Archives of Dermatology*, 148(11):1289–1293, 2012.
- [290] Fernando Sebastián Chiwo González, Miguel Ghebre Ramírez-Elías, Francisco Pérez-Atamoros, Rodrigo Cabrera-Alonso, Carlos Eduardo Osornio-Martínez, Edgar Guevara, Claudio Castillo-Martínez, and Francisco Javier González Contreras. Noninvasive detection of collagen regeneration after an isotretinoin treatment and ablative laser surgery in patients with acne scars by Raman spectroscopy. (September):22, 2018.
- [291] Yun Zhu Mu, Lu Jiang, and Hao Yang. The efficacy of fractional ablative carbon dioxide laser combined with other therapies in acne scars. *Dermatologic Therapy*, 32(6):1–6, 2019.
- [292] Sunila Walia and Tina S. Alster. Prolonged clinical and histologic effects from CO₂ laser resurfacing of atrophic acne scars. *Dermatologic Surgery*, 25(12):926–930, 1999.

- [293] Nicolette Nadene Houreld. The use of lasers and light sources in skin rejuvenation. *Clinics in Dermatology*, 37(4):358–364, 2019.
- [294] Samia M. Esmat, Mona R.E. Abdel-Halim, Heba I. Gawdat, Marwa Kamel, Amany ElRamly, Kholoud Helmy, and Soheir M. Esmat. Persistent Pixel Stamping Marks: a novel complication of fractional CO₂ laser in scar treatment. *Lasers in Medical Science*, 34(6):1125–1135, 2019.
- [295] Ying Lei, Michael H. Gold, Hua-Wei Ouyang, and Jun Tan. Fractional CO₂ laser-assisted scar regeneration and repair: A review . *Dermatological Reviews*, 2(1):23–33, 2021.
- [296] Ali Ghahramani, Guillermo Castro, Burcin Becerik-Gerber, and Xinran Yu. Infrared thermography of human face for monitoring thermoregulation performance and estimating personal thermal comfort. *Building and Environment*, 109:1–11, 2016.
- [297] Da Li, Carol C. Menassa, and Vineet R. Kamat. Non-intrusive interpretation of human thermal comfort through analysis of facial infrared thermography. *Energy and Buildings*, 176:246–261, 2018.
- [298] Shehroz S. Khan and Michael G. Madden. New similarity metrics for Raman spectroscopy. *Cheminometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 114:99–108, 2012.
- [299] C. Carey, T. Boucher, S. Mahadevan, P. Bartholomew, and M. D. Dyar. Machine learning tools for mineral recognition and classification from Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(10):894–903, 2015.
- [300] Jie Liang and Taotao Mu. Recognition of big data mixed Raman spectra based on deep learning with smartphone as Raman analyzer. *Electrophoresis*, 41(16-17):1413–1417, 2020.
- [301] Iwan W. Schie, Clara Stiebing, and Jürgen Popp. Looking for a perfect match: multimodal combinations of Raman spectroscopy for biomedical applications. *Journal of Biomedical Optics*, 26(08):1–18, 2021.
- [302] Jiawei Han, Micheline Kamber, and Jian Pei. *Data Mining: Concepts and Techniques*. Elsevier Inc, 2012.
- [303] Vijay Kotu and Bala Deshpande. *Data Science Concepts and Practice*. Elsevier Inc, 2019.
- [304] Christian Heumann, Michael Schomaker, and Shalabh. *Introduction to Statistics and Data Analysis*, volume 44. Springer, 2016.
- [305] Max Bramer. *Principles of Data Mining*, volume 30. Springer, 2016.
- [306] Laura Igual and Santi Seguí. *Introduction to Data Science*. 2017.
- [307] Rasmus Bro and Age K. Smilde. Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9):2812–2831, 2014.

- [308] Miguel Ghebre Ramirez-Elias. *Uso De La Espectroscopía Raman Como Método No-Invasivo En El Diagnóstico Médico*. Ph.d dissertation thesis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2011.
- [309] Parinya Sanguansat. *PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS – ENGINEERING APPLICATIONS Edited by Parinya Sanguansat*. 2012.
- [310] Zhiwei Huang, Harvey Lui, X. K. Chen, Abdulmajeed Alajlan, David I. McLean, and Haishan Zeng. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *Journal of Biomedical Optics*, 9(6):1198, 2004.
- [311] Horiba Jobin Yvon. In vivo Raman Measurements of Human Skin. Technical report.
- [312] Giuseppe Pezzotti, Marco Boffelli, Daisuke Miyamori, Takeshi Uemura, Yoshinori Marunaka, Wengliang Zhu, and Hiroshi Ikegaya. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. *Journal of Biomedical Optics*, 20(6):065008, 2015.
- [313] Hanglin Ye, Rahul, Uwe Kruger, Tianmeng Wang, Sufei Shi, Jack Norfleet, and Suvaranu De. Burn-related Collagen Conformational Changes in ex vivo Porcine Skin using Raman Spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1):1–9, 2019.
- [314] George Zonios, Julie Bykowski, and Nikiforos Kollias. Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6):1452–1457, 2001.
- [315] Ocean Insight. Noninvasive Tissue Monitoring Using UV-Vis and NIR Spectroscopy. Technical report, 2019.
- [316] Georgios N. Stamatias, Barbara Z. Zmudzka, Nikiforos Kollias, and Janusz Z. Beer. Non-invasive measurements of skin pigmentation in situ. *Pigment Cell Research*, 17(6):618–626, 2004.
- [317] G. N. Stamatias, B. Z. Zmudzka, N. Kollias, and J. Z. Beer. In vivo measurement of skin erythema and pigmentation: New means of implementation of diffuse reflectance spectroscopy with a commercial instrument. *British Journal of Dermatology*, 159(3):683–690, 2008.
- [318] George Zonios, Aikaterini Dimou, Ioannis Bassukas, Dimitrios Galaris, Argyrios Tsolakidis, and Efthimios Kaxiras. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1):014017, 2008.
- [319] N. Kollias and A. Baqer. Spectroscopic characteristics of human melanin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 85(1):38–42, 1985.
- [320] Georgios N. Stamatias and Nikiforos Kollias. Blood stasis contributions to the perception of skin pigmentation. *Journal of Biomedical Optics*, 9(2):315, 2004.

- [321] Steven L. Jacques and Scott Prahl. Laser Photomedicine and Biomedical Optics at Oregon Medical Laser Center.
- [322] W. G. Zijlstra, A. Buursma, and W. P. Meeuwse-van der Roest. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clinical Chemistry*, 37(9):1633–1638, 1991.
- [323] Diana L. Glennie, Joseph E. Hayward, Daniel E. McKee, and Thomas J. Farrell. Inexpensive diffuse reflectance spectroscopy system for measuring changes in tissue optical properties. *Journal of Biomedical Optics*, 19(10):105005, 2014.
- [324] N. Lacey, A. Russell-Hallinan, and F. C. Powell. Study of Demodex mites: Challenges and Solutions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(5):764–775, 2016.
- [325] Esther J. Van Zuuren and Zbys Fedorowicz. Interventions for rosacea. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 314(22):2403–2404, 2015.
- [326] Richard L. Gallo, Richard D. Granstein, Sewon Kang, Mark Mannis, Martin Steinhoff, Jerry Tan, and Diane Thiboutot. Rosacea comorbidities and future research: The 2017 update by the National Rosacea Society Expert Committee. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(1):167–170, 2018.
- [327] M. Schaller, L. M.C. Almeida, A. Bewley, B. Cribier, N. C. Dlova, G. Kautz, M. Mannis, H. H. Oon, M. Rajagopalan, M. Steinhoff, D. Thiboutot, P. Troielli, G. Webster, Y. Wu, E. van Zuuren, and J. Tan. Rosacea treatment update: recommendations from the global ROSacea COnsensus (ROSCO) panel. *British Journal of Dermatology*, 176(2):465–471, 2017.
- [328] Manal Abokwidir and Steven R. Feldman. Rosacea Management. *Skin Appendage Disorders*, 2(1-2):26–34, 2016.
- [329] Jonathan Wilkin, Mark Dahl, Michael Detmar, Lynn Drake, Matthew H. Liang, Richard Odom, and Frank Powell. Standard grading system for rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(6):907–912, 2004.
- [330] Paolo Rosina. Rosacea. *Dermatoscopy in Clinical Practice: Beyond Pigmented Lesions*, 0(0):103–105, 2009.
- [331] K. A. López-Varela, N. Cayetano-Castro, E. S. Kolosovas-Machuca, F. J. González, F. S. Chiwo, and J. L. Rodríguez-López. Dynamic Infrared Thermography of Nanoheaters Embedded in Skin-Equivalent Phantoms. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 2018.

- [332] Brhayllan Mora Ventura, Fernando Sebastián Chiwo, and Gabriel González. Fabricación de Micro y Nano Biosensores para Detección de Enfermedades. *Universitarios Potosinos*, 248:16–21, 2020.
- [333] Javier Méndez-Lozoya, Fernando Sebastian Chiwo-González, Juan Roberto Moreno-García, and Francisco Javier González Contreras. Diseño y Fabricación de Sustratos SERS para Detección de Enfermedades Orales. *Lazos UC*, pages 34–38, 2022.