



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

**DISEÑO DE UN MODELO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA
DEL GENOMA RETROVIRAL CAUSANTE DEL SINDROME DE
INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA, USANDO UN SISTEMA
ADAPTATIVO NEURO DIFUSO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EXACTAS,
SISTEMAS Y DE LA INFORMACION**

Presenta

ING. JAIME RUTILIO DE LA TORRE SIFUENTES

Tutor

**DR. ALEJANDRO PADILLA DIAZ
DR. FRANCISCO JAVIER LUNA ROSAS**

Comité tutorial

**DR. JULIO CESAR MARTINEZ ROMO
DR. CARLOS ALBERTO OCHOA ORTIZ ZEZZATTI
DRA. EUNICE ESTHER PONCE DE LEON SENTI**

Aguascalientes, Ags. Mayo de 2010

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al Dr. Francisco Javier Luna Rosas, por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto, sin su ayuda el trabajo reflejado en este documento nunca hubiera existido.

Al Dr. Alejandro Padilla Díaz, por su desinterés y conducción durante todo el proceso, tanto en lo académico como en lo administrativo

A los integrantes del comité doctoral, por sus correcciones y aportaciones a este proyecto.

A los compañeros que desinteresadamente brindaron apoyo a un servidor.

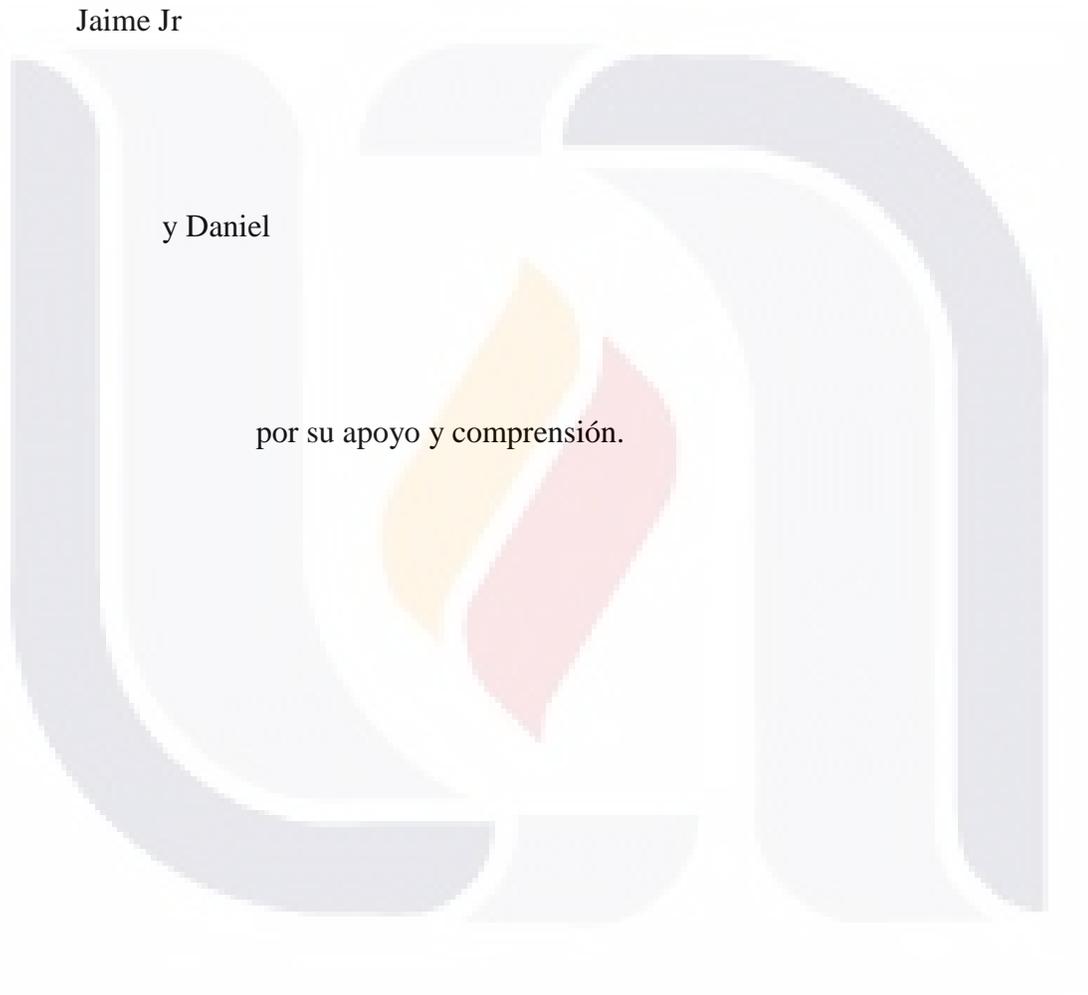
DEDICATORIAS

A: Mary

Jaime Jr

y Daniel

por su apoyo y comprensión.





Centro de Ciencias Básicas

**M. E.M. JAIME RUTILIO DE LA TORRE SIFUENTES
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EXACTAS,
SISTEMAS Y DE LA INFORMACIÓN
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) de la Torre:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulado: **“Diseño de un Modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 28 de mayo de 2010
“LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



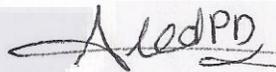
c.c.p.- Archivo

Aguascalientes, Ags. Mayo de 2010

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Presente:

Por este conducto hago de su conocimiento que el **M.E.M. Jaime Rutilio De La Torre Sifuentes**, egresado del **Doctorado en Ciencias Exactas, Sistemas y de la Información** del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ha integrado satisfactoriamente el documento de tesis titulado **“Diseño de un modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso”**, por lo que doy mi voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

Atentamente:



Dr. Alejandro Padilla Díaz
Director de Tesis

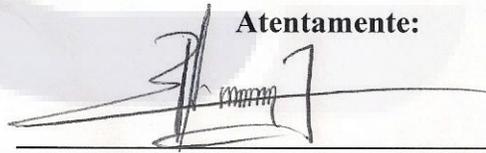
Aguascalientes, Ags. Mayo de 2010

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

P r e s e n t e:

Por este conducto hago de su conocimiento que el **M.E.M Jaime Rutilio De La Torre Sifuentes**, egresado del **Doctorado en Ciencias Exactas, Sistemas y de la Información** del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ha integrado satisfactoriamente el documento de tesis titulado **“Diseño de un modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso”**, por lo que doy mi voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

Atentamente:

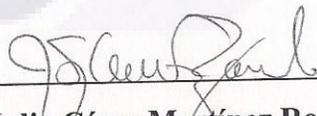


Dr. Francisco Javier Luna Rosas
Director de Tesis

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
P r e s e n t e:

Por este conducto hago de su conocimiento que el **M.E.M Jaime Rutilio De La Torre Sifuentes**, egresado del **Doctorado en Ciencias Exactas, Sistemas y de la Información** del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ha integrado satisfactoriamente el documento de tesis titulado **“Diseño de un modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso”**, por lo que doy mi voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

Atentamente:



Dr. Julio César Martínez Romo

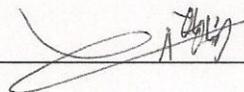
Asesor de Tesis

Aguascalientes, Ags. Mayo de 2010

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Presente:

Por este conducto hago de su conocimiento que el M.E.M. **Jaime Rutilio De La Torre Sifuentes**, egresado del **Doctorado en Ciencias Exactas, Sistemas y de la Información** del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ha integrado satisfactoriamente el documento de tesis titulado “**Diseño de un modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso**”, por lo que doy mi voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

Atentamente:



Dr. Carlos Alberto Ochoa Ortiz Zezzatti

Asesor de tesis

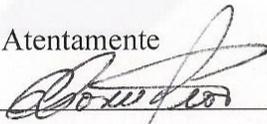
Aguascalientes, Ags. Mayo de 2010

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

P r e s e n t e:

Por este conducto hago de su conocimiento que el **M.E.M. Jaime Rutilio De La Torre Sifuentes**, egresado del **Doctorado en Ciencias Exactas, Sistemas y de la Información** del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ha integrado satisfactoriamente el documento de tesis titulado **“Diseño de un modelo para determinar la presencia del genoma retroviral causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, usando un sistema adaptativo neuro difuso”**, por lo que doy mi voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

Atentamente



Dra. Eunice Esther Ponce De León Sentí

Asesor de Tesis

PROLOGO

El cáncer de próstata, colon, pulmón y de seno son los más comunes en la actualidad (BIO-RAD, 2006), pero la frecuencia de casos de otros tipos de cáncer ha aumentado, tal es el caso del cáncer en sangre, específicamente en el sistema linfático, piel, sistema digestivo y sistema urinario.

A raíz de la aparición del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida comúnmente conocida como SIDA por sus siglas, surgieron varias necesidades respecto a esta enfermedad; como la necesidad de diagnóstico rápido y veraz, necesidad de encontrar los mecanismos de acción de los agentes causantes para detener o minimizar el daño, y la necesidad de encontrar un tratamiento eficiente para curar al paciente con el síndrome mencionado.

Este trabajo nació por la necesidad de encontrar un método de diagnóstico alternativo a los existentes para detectar la presencia del agente causante de SIDA. Es importante mencionar que el agente causante del SIDA es un retrovirus llamado Virus de la Inmuno deficiencia Humana, por sus siglas VIH, que actúa directamente en las células del sistema inmune del ser humano. Estas células son las células blancas o leucocitos, específicamente llamadas linfocitos T CD4. El retrovirus utiliza las células para sobrevivir y reproducirse, al hacer esto con el tiempo las células se deterioran y mueren. Esta fase de la enfermedad se le llama latencia, y contempla el tiempo que se lleva desde que ocurre la infección y hasta que se presentan los primeros síntomas de la enfermedad (SIDA).

La inquietud por parte del autor de este trabajo de buscar un método alternativo a este problema de diagnóstico implica utilizar nuevas herramientas, entre ellas las computacionales, específicamente, herramientas de la inteligencia artificial conocida como IA. Es por esto que se buscó conocer las herramientas actuales que contiene la IA que pudieran ayudar a elaborar una técnica nueva para diagnosticar la presencia del retrovirus en la sangre humana.

Después de analizar las características de las herramientas que ofrece la IA, se optó por utilizar sistemas neuro-difusos de los cuales existe una gran variedad ya probados y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

reportados en la literatura universal, de los cuales se selecciono el sistema adaptativo inferencial neuro difuso conocido por sus siglas en inglés como ANFIS. Este sistema cumple con las características que requerimos para procesar los datos Raman provenientes de laboratorio especializado, tanto los parámetros de lógica difusa como la arquitectura de la red neuronal.

Los datos Raman se obtienen con varias técnicas la más conocida y actual es con la tecnología de Exaltación Raman de Superficie SERS, (por sus siglas en inglés: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) (Shanmukh, 2008).

Descrito de otra forma, se diseñó un modelo para encontrar un patrón espectrográfico que contenga los picos Raman de una muestra de linfocitos T CD-4 infectadas con el genoma del Retrovirus llamado Virus de Inmunodeficiencia VIH (relaciones estructurales del ADN ocultas, antes ARN), mediante la técnica de exaltación espectrofotométrica Raman y una herramienta híbrida de la inteligencia artificial llamada Sistema Adaptativo Inferencial Neuro Difuso ANFIS.

Enseguida se mencionan brevemente las contribuciones más importantes que presenta éste trabajo que se engloban en el diseño y descripción de las etapas que describen el modelo para encontrar patrones espectrográficos a partir de picos Raman de una muestra de sangre infectada con el virus de la Inmuno Deficiencia Humana, entre otros.

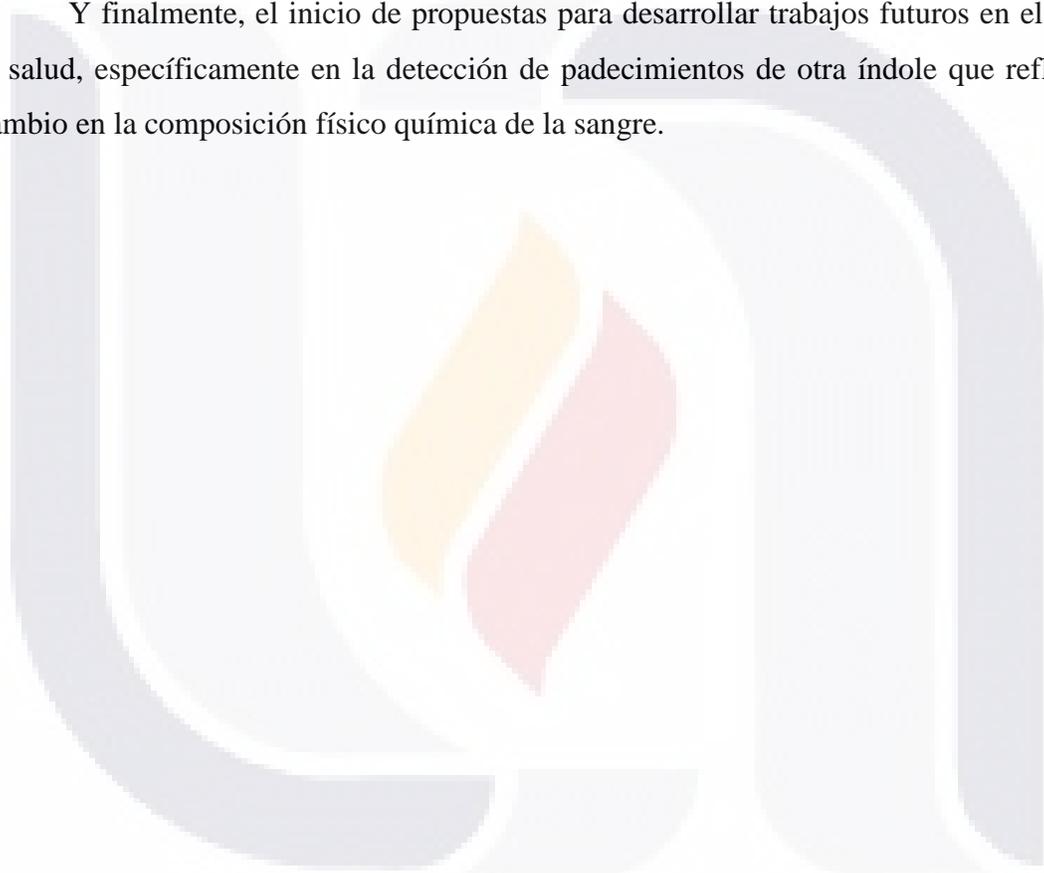
Se creó una nueva forma de inferir picos Raman de la señal limpia de ruido utilizando un sistema inferencial neuro difuso que en este caso fue ANFIS, apoyado en un software comprobado, MatLab 2007. Es decir, esta nueva metodología después de eliminar el ruido de alta frecuencia y fluorescencia de la señal original de forma rápida, encuentra los picos Raman característicos de la muestra.

Otra aportación es la reducción de la Dimensionalidad, es decir la obtención de los picos Raman en forma individual, puesto que los métodos existentes procesan el espectro completo, por lo que se complica la identificación de los picos.

No existen extractores automáticos de picos Raman, generalmente se realiza este proceso de forma visual por los expertos en el área, por lo que está presente el error humano.

Además al tener una clasificación más clara de los picos Raman inferidos por ANFIS con las características básicas que marca la literatura, se puede diseñar un patrón espectrográfico de la muestra en análisis. Esto está en proceso aun.

Y finalmente, el inicio de propuestas para desarrollar trabajos futuros en el área de la salud, específicamente en la detección de padecimientos de otra índole que reflejen un cambio en la composición físico química de la sangre.



RESUMEN

Existen múltiples factores que favorecen la aparición de padecimientos en distintas partes del cuerpo humano, en órganos femeninos como el cáncer de seno, en órganos masculinos como cáncer de próstata, pero también en órganos y sistemas comunes en ambos géneros; un ejemplo de ellos es la sangre donde existen diferentes padecimientos como la leucemia causada por la presencia y acción de un retrovirus (delta retrovirus), al igual que el Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) que es causado por la presencia y acción de otro retrovirus conocido como virus de la inmunodeficiencia humana o VIH (Lentivirus), afectando directamente las células CD-4 presentes en la sangre.

Este trabajo se enfoca en el diseño de un modelo para encontrar un patrón espectrográfico que contenga los picos Raman característicos de una muestra de células dañadas, estos picos son extraídos de los datos Raman (espectro) obtenidos con el uso de la técnica de exaltación espectrofotométrica Raman y una herramienta híbrida de la inteligencia artificial llamada Sistema Adaptativo Inferencial Neuro Difuso (ANFIS por sus siglas en inglés). Esta metodología novedosa podrá ser trasladada al diseño de patrones similares, por ejemplo células de la sangre específicamente linfocitos T CD-4 infectados con el genoma del Retrovirus llamado Virus de Inmunodeficiencia VIH (relaciones estructurales del ADN ocultas, antes ARN). Estas son una parte importante del sistema inmune en un ser humano que al ser atacadas por este retrovirus se presenta un daño en las células causando el Síndrome de Inmuno deficiencia humana conocido por sus siglas como SIDA.

Mediante la tecnología de Raman de Superficie se obtuvieron los datos Raman (Pichardo, 2006) y con el apoyo de herramientas de la Inteligencia Artificial (IA) como lo son las Redes Neuronales (RN) y la Lógica Difusa (LD) contenidos en una herramienta llamada ANFIS, se procesaron los datos para determinar los picos Raman del espectro a fin de tener un patrón de células infectadas o dañadas. El descubrimiento y diseño de dichos patrones fue el punto medular de este trabajo.

El trabajo descrito tiene la finalidad de apoyar a los especialistas en el diagnóstico temprano de enfermedades como el cáncer o el Síndrome de Inmuno Deficiencia

Adquirida (SIDA) a menor costo que los métodos tradicionales los cuales serán descritos en secciones posteriores en este documento.

Lo anterior se logró mediante el diseño de un método compuesto por 3 fases:

- 1.- La primera fase contempla la obtención de datos Raman.
- 2.- La segunda fase contempla el algoritmo de remoción de ruido y obtención de picos Raman característicos
- 3.- La tercera fase contempla la construcción del patrón para diagnóstico.

Las tres fases están subdivididas en 7 etapas, con metodologías novedosas en tres ámbitos de la ciencia: biológica, foto electrónica e informática específicamente en inteligencia artificial.

En la primera etapa se introducen los datos Raman provenientes del Centro de Investigaciones en Óptica, tomadas directamente de células dañadas comprobadas por los métodos tradicionales. En la segunda etapa se normalizan los datos Raman a fin de que el computador trabaje en forma óptima al mantener un rango estándar.

La tercera etapa consiste en filtrar la señal con el objetivo de eliminar los ruidos de alta frecuencia y fluorescencia. Estas frecuencias electromagnéticas son contaminación que pueden interferir en la detección de los verdaderos picos Raman.

En la cuarta etapa se buscan los candidatos a ser picos Raman, alimentando al computador con las especificaciones propias de un pico Raman, en cuanto a las amplitudes y longitudes específicas. Se evalúan para tener la certeza que son picos Raman reales, esto se logra en la quinta etapa.

En la sexta etapa se utiliza el sistema adaptativo inferencial ANFIS, herramienta de la inteligencia artificial, para inferir los picos Raman completos, puesto que los picos anteriormente evaluados no quedaron completos, requieren de ANFIS para completarlos.

Y finalmente la última etapa con los picos identificados y completos, se construye el espectro patrón con los picos Raman específicos de la muestra de células dañadas.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
CARTAS DE LIBERACION	iii
PROLOGO	ix
RESUMEN	xii
INTRODUCCION	
1 JUSTIFICACION DEL MODELO PROPUESTO	1
2 MARCO TEORICO. Linfocitos con VIH, objeto de estudio de espectroscopia e Inteligencia artificial	
2.1 Biología Celular	7
2.1.1. Componentes de la célula	7
2.1.2. El núcleo de la célula	7
2. 2 El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	9
2.2.1 Clasificación de la taxonomía viral	10
2.2.2 Clasificación de Retrovirus	11
2. 2.3 El genoma retroviral	12
2.2.4 Retrovirus más comunes en humanos	13
2.2.5. El Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida	15
2.2.5.1 Orígenes y descubrimiento del SIDA	16
2.2.5.2 Estadísticas actuales	16
2.3.5.3 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	17
2.3. Sistema inmune del ser humano	18
2.3.1 Linfocitos y su clasificación	19
2.3.1.1 Clasificación de Linfocitos B	19
2.3.1.2 Clasificación de Linfocitos T	20
2.3.2 Daños celulares causantes por VIH	21
2.3.3 Análisis que revelan la presencia de VIH en seres humanos	22
2.3.4 Etapas de desarrollo del VIH en el organismo humano	24
2.4. Inteligencia Artificial y Bioinformática	26
2.4.1 El concepto de Bioinformática	26
2.4.2 Orígenes de la Bioinformática	27
2.4.3 Instituciones y Centros de Investigación en México y el mundo	28
2.5. Sistema Inferencial Adaptativo Neuro-Difuso.	30
2.5.1 Algunas Técnicas recientes de Inteligencia Artificial	30
2.5.2 Lógica Difusa	32
2.5.2.1 Sistemas Tipo Mamdani	42
2.5.2.2 Sistemas Tipo Takagi-Sugeno	43
2.5.2.3 Métodos de defuzzificación	44
2.5.3 Redes Neuronales artificiales	45
2.5.3.1 El Perceptrón simple	47
2.5.3.2 El Perceptrón multicapas	51
2.5.3.3 Estructuras de las Redes Neuronales Artificiales	59

2.5.3.4 Clasificación de Redes Neuronales Artificiales	61
2.5.4 Sistemas Neuro difusos.	65
2.5.4.1 Arquitecturas de sistemas neuro-difusos.	67
2.5.5 Comparativo de Sistemas Neuro difusos	69
2.5.6 Sistema Inferencial Adaptativo Neuro difuso	73
2.6 Espectroscopia RAMAN	77
2.6.1 Fenómeno de la Absorción y dispersión.	77
2.6.2 Dispersión Raman	80
2.6.2.1 Exaltación superficial de dispersión Raman (SERS)	85
2.6.3 Resonancia exaltada Superficial en dispersión Raman (SERRS)	86
2.6.4 Aplicaciones	86
2.7 La Inteligencia Artificial en el campo del VIH/SIDA	87
2.7.1 Diagnóstico de VIH/SIDA	88
2.7.2 Prevención del VIH/SIDA	90
2.7.3 Tratamiento del VIH/SIDA	91
2.7.4 Análisis de datos estadísticos	91
2.7.5 Aplicaciones de nanotecnología y espectroscopia Raman	92
3. MARCO METODOLOGICO (Diseño Experimental)	94
3.1 Objetivos	94
3.2 Metas	95
3.3 Planteamiento del problema	96
3.4 Hipótesis	97
3.5 Descripción de la población y diseño de la muestra	97
3.5.1 Muestreo y Protocolo	98
3.6 Selección de técnicas e instrumentos de investigación	99
3.6.1 Descripción del algoritmo de Remoción de ruido	99
3.6.2 Pseudocódigos del algoritmo Backpropagation	103
3.6.3 Complejidad computacional de ANFIS	104
4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	105
4.1 Descripción de resultados del desarrollo de las etapas	106
4.1.1 Cargar señal Raman	106
4.1.2 Normalización de datos	106
4.1.3 Filtrar señal	107
4.1.4 Buscando candidatos a picos	108
4.1.5 Evaluando para obtener picos reales	109
4.1.6 Configuración de ANFIS desarrollada	110
4.1.7 Obtención del espectro	119
4.2 Conclusiones finales	120
4.3 Trabajo futuro	123
5. ANEXOS. Publicaciones	124
6. GLOSARIO	136
7. BIBLIOGRAFIA	139

1 JUSTIFICACION DEL MODELO PROPUESTO

En este apartado se busca que el lector tenga un panorama general del trabajo propuesto, que conozca los antecedentes y alcances del mismo, así como el desarrollo del trabajo y los resultados obtenidos y de esta forma plasmar las aportaciones de conocimientos nuevos a la ciencia.

Es indudable que algunas de las enfermedades humanas más agresivas en que han aparecido en los últimos años son el cáncer y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Existen diferentes tipos de cáncer en distintas partes del organismo humano y los factores que provocan estas enfermedades son variados. Una de las causas de cáncer que se han encontrado últimamente en sangre es un tipo de leucemia que es provocado por el ataque de un retrovirus (HTLV – I), los casos de personas que padecen esta enfermedad han ido incrementándose, al igual que el SIDA, que también es provocado por la acción de otro retrovirus (VIH), lo anterior según estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud en el año 2009. Los adelantos en conocimientos que la espectroscopia ha proporcionado están siendo integrados al diagnóstico de varias enfermedades, una de ellas es el cáncer de seno y el SIDA, específicamente en la detección del virus que la causa. Esto es posible al identificar patrones espectro gráficos de microorganismos, células, material biológico, etc.

La creación de los patrones espectrográficos que reflejen la presencia de patrones genómicos básicos ocultos obtenidos a través de espectroscopia con el apoyo de la técnica Raman, SERS o SERRS, de células dañadas (cáncer) o infectadas con virus (linfocitos T CD4 con VIH), considerando el genoma modificado presente en el núcleo de la célula, proporcionan herramientas a la ciencia médica para diagnosticar de manera eficiente y rápida enfermedades que afectan a la humanidad, como el cáncer o el SIDA; y de esta forma combatir estas enfermedades en etapas tempranas.

Identificando éstos patrones espectrográficos y conectando esta información con otros niveles de conocimiento como el taxonómico, funcionalidad del gene, estructura

tridimensional de las cadenas de ADN, las estructuras proteicas que codifican, la replicación e inserción en los genomas de células huésped, etc. seguramente originará nuevo conocimiento sobre cómo estos patrones en el nivel de la información genómica se relacionan con la estructura viral y su dinámica a nivel molecular y celular. Es posible que los patrones espectro gráficos puedan ser mejorados utilizando una combinación de herramientas de Inteligencia Artificial, como la Lógica Difusa, Redes Neuronales artificiales, Algoritmos Genéticos, entre otras técnicas. La aparición de los sistemas neuro-difusos, formados por la hibridación de las Redes neuronales artificiales (RNA) y lógica difusa (LD), han facilitado el análisis y clasificación de información; pero el uso de un sistema neuro-difuso que además es adaptativo, específicamente un Sistema Adaptativo Inferencial Neuro difuso o ANFIS, seguramente perfeccionará los espectros de manera más eficiente.

Este proyecto propone obtener características del espectro Raman detectando picos específicos, eliminando el ruido de alta frecuencia (HF) y fluorescencia de la señal obtenida con SERS. Con el espectro limpio de ruido (HF y fluorescencia) las características del espectro Raman de cada célula, microorganismo o retrovirus (VIH) son definidas. Es importante aclarar que no se realizan experimentos para adquirir señales a través de SERS por la carencia de la tecnología apropiada, este enfoque se centra en el uso de técnicas de Inteligencia artificial para: a) Limpiar la señal Raman (remover ruido), b) reconocer picos Raman, y c) clasificar el espectro en células sanas, dañadas o infectadas; los resultados son validos ya que la tecnología Raman produce el mismo espectro, desde la perspectiva del análisis de la señal.

Por lo anterior, el proyecto está enfocado en el uso de ANFIS, que es una herramienta de la inteligencia artificial, exclusivamente a los datos que originan el espectro Raman de cualquier célula o tejido, en este caso obtenidos de células cancerosas y cuyo procesamiento y resultados pueden ser aplicados también a datos Raman obtenidos de retrovirus VIH presentes en los linfocitos T CD-4 infectados y sanos, para establecer patrones específicos (con los picos Raman definidos), y de esta forma aportar herramientas científicas nuevas en el diagnóstico del cáncer en etapas tempranas o del Síndrome de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Inmunodeficiencia Adquirida en el caso de linfocitos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en etapas iniciales de la infección.

La ventaja de esta metodología con respecto a otras técnicas convencionales es que se pueden detectar cambios significativos en las células provocados por desordenes genéticos o por organismos intrusos, causando daños estructurales. Con estas detecciones se pueden detectar las enfermedades en etapas tempranas, generalmente imperceptibles por los métodos convencionales

En el caso del cáncer, se pueden detectar cambios en el núcleo de la célula al estarse replicando de forma desordenada (característica del cáncer) con la consecuente aparición de tumores. En el caso de la detección de linfocitos infectados por el VIH, se realizará en la fase de latencia de la enfermedad conocida como SIDA, y donde las técnicas biológicas no son muy eficientes en etapas tempranas.

El modelo propuesto contempla 3 fases: En la primera fase se obtienen datos Raman, en la segunda, se implementa un algoritmo para remoción de ruido y además de la obtención de picos Raman característicos. Y en la tercera fase, la construcción del patrón con los picos Raman característicos con el propósito de facilitar el diagnóstico.

La primera fase contempló obtener con el apoyo del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) datos Raman de células de personas sanas y enfermas. Los procedimientos y técnicas utilizadas son las mencionadas en el artículo respectivo (Pichardo, 2006).

En la segunda fase se contempló utilizar un algoritmo de Remoción de ruido y obtención de los picos Raman característicos. Implica llevar a cabo el proceso en 6 etapas. En la etapa 1 únicamente se carga la señal Raman en el sistema computacional, se introduce el vector de datos que contiene la señal Raman proporcionada, compuesta de varios espectros; para realizar el análisis de cada uno de los espectros se genera un archivo el cual contiene la cantidad de espectros a los que se les desea eliminar el ruido de HF y de fluorescencia.

En la etapa 2 se normalizan los datos en una gráfica mediante la implementación del método de interpolación lineal; el objetivo de realizar una normalización es para tener la

señal Raman bajo una misma escala. Para llegar a este objetivo, en el eje de las abscisas se toman 1000 muestras de forma arbitraria. Para el eje de las ordenadas de igual forma se requiere normalizar, sólo que en este caso la escala fue de 0 a 1.

La etapa 3 contempla filtrar la señal de los espectros. Esta es una etapa muy importante puesto que se busca eliminar el ruido de alta frecuencia. El tipo de filtro que se utilizó es “la mediana”, con este método se logra la eliminación del ruido de alta frecuencia, siendo estos causa de una mala interpretación del espectro y por ende generan confusión. El filtro de mediana es una técnica no lineal de mejora de la señal que en la teoría de Procesamiento Digital de Imágenes (PDI) encuentra su aplicación en la mejora de la imagen. Esta técnica se utiliza comúnmente para aplicaciones tales como el suavizado de imágenes y la eliminación de ruidos, presentando la ventaja con respecto a otros operadores (p. e. filtro paso bajo) de que mantiene la información de borde.

El principio en que se basa este filtro de mediana, es ir obteniendo el promedio de los valores que presenta el espectro. Este filtrado se ejecuta aun y cuando el espectro presente el ruido de alta frecuencia o no, y no causa desplazamiento de la señal. De los resultados obtenidos en esta etapa se puede obtener el ruido que se eliminó, esto con la finalidad de saber si es que realmente la señal presentaba ruido de alta frecuencia.

En las 4 etapas siguientes se obtienen los picos Raman característicos. Específicamente en la etapa 4 se buscan los candidatos a picos Raman. Se implementó método que es capaz de ir evaluando la señal resultante del filtrado. La manera en que se abordó esta parte del problema fue implantando un muestreo por ventaneo, con la longitud de ventana igual a 15 muestras. La técnica de ventaneo se basa en a la respuesta de un filtro al aplicarle la ventana deseada, la ventana hace que en el filtro real diseñado se tengan menos variaciones de transición o supresión y con esto se logre un filtrado más efectivo.

Al muestrear la señal de esta manera, lo que se encontró son los máximos dentro de la ventana, pero para poder ir delimitándolos se realizó una evaluación que consistió en ir considerando “pico Raman” si está centrado ese valor máximo, y si se carga hacia algún costado se descartó. De esta forma se encontraron las porciones del espectro que pueden tener forma de pico.

En la etapa 5 se evalúan los picos candidatos para obtener picos Raman reales. La metodología usada para determinar si es pico o no implicó dos aspectos: Ensanchamiento de la ventana y determinación de picos Raman. Inicialmente, una vez que se obtuvieron todos los posibles picos de la señal, se parte de los valores máximos adquiridos para evaluar. Se evaluó punto a punto en forma descendente el ángulo que se forma, y si el ángulo que se tiene está dentro del rango de 60° a -60° , se continúa evaluando y se detiene cuando este ángulo resultante no está dentro del rango establecido para el ángulo. En los puntos en que no se cumple con la condición se almacenaron, y se consideraron a éstos como el inicio y término de un pico.

La forma en que se determinó cuál de los posibles picos que se encontraron anteriormente es un pico Raman, es mediante una razón dada que se llamó Razón de Aspecto (R.A.). Se obtiene la anchura y altura del posible pico, es decir, se le aplica la relación siguiente: si $R.A = \frac{\text{alto}}{\text{ancho}} \geq 0.6$, se le considera como pico Raman, en caso de valor diferente a esa consideración no es pico Raman.

En la etapa 6 se implanta un sistema adaptativo neuro-difuso llamado ANFIS con el apoyo de Matlab (Matlab, 2007); Esto es debido a que una vez que se concluyó con la etapa 5, se tienen los picos Raman de la señal, pero que aún presentan el problema de la fluorescencia, este problema mediante ANFIS se eliminó.

ANFIS es el predictor (predecir) usado para la unión de los puntos en donde se consideró que inició y terminó algún pico del espectro. Para la aplicación del sistema neuro-difuso (ANFIS) se procedió de la siguiente manera: a) Preparación de datos: se almacenaron en un vector las amplitudes correspondientes de la señal Raman, removiendo los segmentos donde se detectaron los picos, siendo éstos la base para el funcionamiento de ANFIS. b) Entrenamiento de ANFIS: Los valores requeridos para el entrenamiento son los valores necesarios del inicio y final de los segmentos sin pico, así como el número de épocas. c) Predicción del ruido de f en las regiones v con pico Raman: Una vez entrenado el sistema neuro-difuso adaptativo pudo observar la predicción de la fluorescencia.

Y finalmente en la etapa 7 se obtiene el espectro con los picos Raman característicos de la muestra. Esta es la parte culminante del algoritmo, en la cual se realizó un empalme entre la gráfica del espectro con ruido y la obtenida por ANFIS. Con lo anterior, se efectuó una resta de las señales como se tiene en la expresión: $E_r = S_r - f$. Se obtiene el grafico característico con los picos Raman.

En la tercera fase, con los patrones espectro gráficos característicos de células sanas y enfermas, obtenidos en la fase anterior (fase 2), y con el apoyo de un sistema clasificador, se comparan éstos patrones espectro-gráficos con la muestra problema, para diagnosticar si las células están dañadas, infectadas o no, según sea el caso, y de esta forma facilitar al especialista de la salud el poder dar un diagnóstico acertado al paciente.

En forma general, las aportaciones de este proyecto son la utilización de ANFIS en datos Raman, así como la reducción de la Dimensionalidad al procesar los picos Raman en forma individual (puesto que otros autores procesan el espectro completo). También la extracción automática de picos Raman (no existía) y finalmente con esta información se tiene una clasificación más clara, esto último está en proceso de concluirse y se presenta como trabajo futuro.

2. MARCO TEORICO: Linfocitos con VIH, objeto de estudio de espectroscopia e Inteligencia artificial.

El capítulo 2 presenta un panorama general del estado del arte del mundo biológico en torno al virus de la inmunodeficiencia humana y las células que infecta comúnmente específicamente los linfocitos T CD4 que forma parte del sistema inmune, el cual también se describe a detalle, así como las formas de infección, replicación y estados de desarrollo de la enfermedad que provoca que en este caso es el SIDA. Así como la descripción del estado del arte de la inteligencia artificial en el campo del SIDA, específicamente en el diagnóstico, prevención, tratamiento y análisis estadístico. Enseguida se describen los conceptos básicos de los sistemas neuro difusos, sus elementos y su funcionamiento así como de ANFIS que es el sistema que se utilizó en el proyecto. Y finalmente se describe el estado del arte de la espectroscopia Raman, que aunque no forma parte del trabajo realizado, puesto que se partió de los espectros Raman proporcionados, es importante mencionar cuáles son los principios del fenómeno Raman, sus adelantos en el campo y sus aplicaciones.

2.1 Biología Celular

En este apartado se expresan los elementos básicos de una célula animal para tener un marco contextual base para los apartados siguientes, y conocer los organelos y las acciones llevadas a cabo en el proceso de infección y replicación.

2.1.1. Componentes de la célula.

La aglomeración organizada de moléculas orgánicas conforman los organelos y que a su vez están clasificados en tres grupos principalmente (Karp, 2002), Núcleo celular, Organelos citoplásmicos y Citoesqueleto; Este trabajo se enfoca principalmente en el núcleo de la célula. En el siguiente esquema se presentan los modelos actuales.

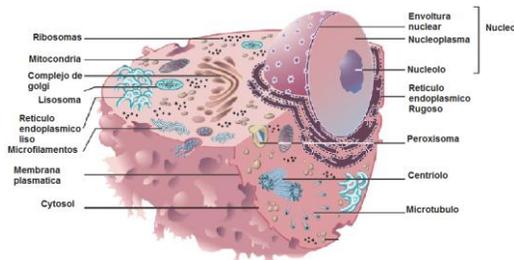


Figura 2.1 Estructura de la célula animal
(Copyright © 2000-2002 by John Wiley & Sons, Inc).

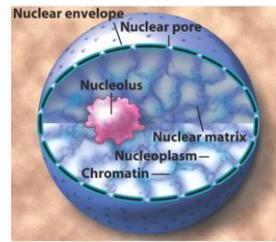


Figura 2.2 Estructura del núcleo
(Copyright © 2000-2002 by John Wiley & Sons, Inc)

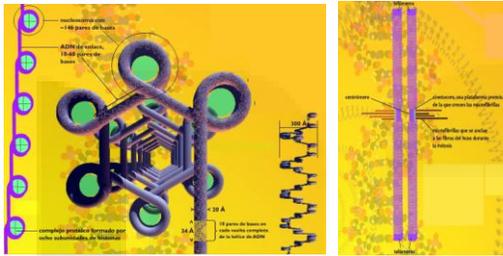


Figura 2.3 Estructura del cromosoma
(Copyright © 2009 por John Kyrk)

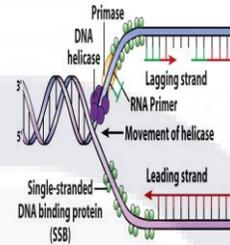


Figura 2.4 Replicación del ADN
(Copyright © 2000-2002 by John Wiley & Sons, Inc).

2.1.2 El núcleo de la célula

Los cromosomas están formados por un material complejo llamado cromatina, el cual consiste en una serie de largos filamentos que contienen alrededor de 60% de proteínas, 40% de ácidos nucleicos como el Acido Desoxirribonucleico (ADN) y el Acido Ribonucleico (ARN). El ADN fue aislado por Friedrich Miescher en 1869 (Olins, 2003). Durante los años 20's, el bioquímico P.A. Levene analizó los componentes del ADN, y encontró que contenía cuatro bases nitrogenadas: citosina, timina, adenina, y guanina; el azúcar desoxirribosa; y un grupo fosfato. Los ácidos nucleicos formados por cadenas de nucleótidos, se dividen en pequeñas unidades llamadas genes, que son los portadores de la mayor parte del material genético que condicionan la organización de la vida y las características hereditarias de cada especie. Cada cromosoma puede tener cientos de miles de genes. La demostración de que los genes están en los cromosomas se realizó por Calvin Bridges y Nettie Stevens en 1912 y fue Alfred Henry Sturtevant quien probó que los genes se hallan dispuestos linealmente a lo largo del cromosoma (Olins, 2003).

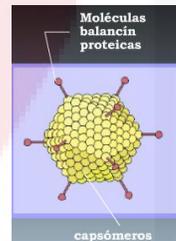
El término genoma definido por Hans Winkler, como un acrónimo de las palabras gene y cromosoma (Landerberg, 2001). En el caso de los seres humanos, el genoma tiene 6.000 millones de pares de bases.

2.2 El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

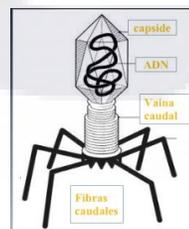
Específicamente la estructura de un virus es conocida como virión, y está compuesto de una molécula de ácido nucléicos que puede ser ADN o ARN, una envoltura proteica y la presencia de algún tipo de enzima con diferente función (transcriptasa inversa de los retrovirus). La envoltura proteica recibe el nombre de cápside la cual está formada por unas subunidades idénticas denominadas capsómeros. Los capsómeros son proteínas globulares que en ocasiones tienen una parte glicídica unida y están compuestos de unidades denominadas protómeros (Caspar, 1962). Considerando la forma de la cápsida, existen tres tipos de virus: a) Virus cilíndricos o helicoidales; b) Virus icosaédricos, c) Virus complejos.



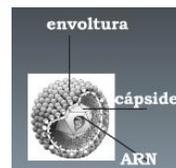
Cilíndrico o Helicoidal



Icosaédricos



Complejo



Complejo

Figura 2.5 Estructura general de virus de acuerdo a su cápside.

La relación entre el ARNm viral y el ácido nucleico de la parte infectada es la base para clasificar virus, es decir, la composición del genoma viral y de su relación con el ARNm viral es el principio usado para clasificar virus (Lodish, 1999).

2.2.1 Clasificación taxonómica viral

En este trabajo se mencionan las clasificaciones internacionales más conocidas, que se presentan en los esquemas siguientes; la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971) e International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV, 2007).

Clasificación Baltimore:

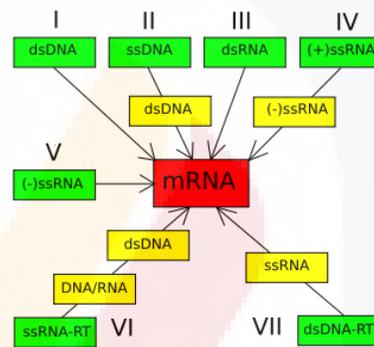


Figura 2.6 Clasificación de Baltimore de acuerdo a la base química del genoma.

Clasificación del Comité Internacional para la taxonomía viral.- Por sus siglas en Inglés, “International Committee for Taxonomy of Viruses” (ICTV), propone una clasificación universal que pueda funcionar como un estándar de clasificación de los virus. Es de interés para ese trabajo resaltar el contenido de la clase VI viral, perteneciente a los retrovirus, puesto que el trabajo experimental está fundamentado en esta clase.

La clase VI, llamada Retroviridae, es un grupo de virus de ARN que infectan animales y seres humanos. Aunque el nombre de retrovirus fue asignado como tal hasta 1974 (Baltimore, 1974), las enfermedades retrovirales fueron descubiertas mucho antes. La mayoría de los virus introducen su ARN a la célula huésped y actúa como mARN o es transcrito en mARN. Retroviridae es diferente, lleva con ellos una enzima única llamada

transcriptasa reversa. Esta enzima es una polimerasa ARN-dependiente del ADN que convierte el ARN viral en ADN (Gladwin, 2004).

Una característica importante de algunos retrovirus es que son citotóxicos para ciertas células. El más notable es el virus del síndrome de la inmunodeficiencia en humanos que destruye los linfocitos T-CD4 que infecta, llamado virus de la inmunodeficiencia humana o VIH.

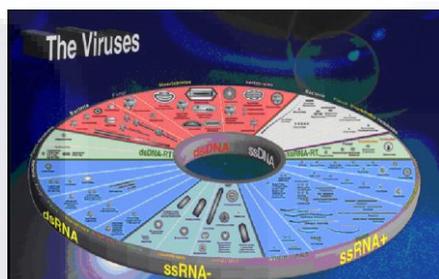


Figura 2.7 Clasificación de virus (ICTV) Academic Press 2007

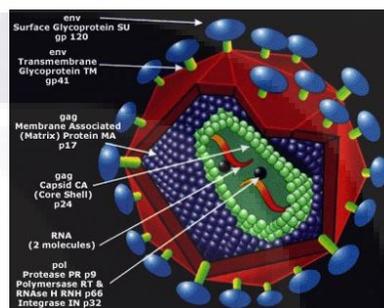


Figura 2.8 Visualización de la estructura de retrovirus (Baxter Lab, 2006)

A principios de los 80's una nueva epidemia fue detectada llamada síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Investigadores estimularon células-T en cultivo con interleukin-2 y fueron capaces de encontrar el ARN y ADN, lo cual sugirió una etiología retroviral. El virus que fue identificado posteriormente, fue llamado virus de la inmunodeficiencia humana VIH, que es la causa de la epidemia actual más temida en el mundo actual, SIDA (Baltimore, 1974), y del cual se mencionara en detalle más adelante.

2.2.2 Clasificación de Retrovirus

Los retrovirus son virus que contienen una envoltura que presentan un genoma de ARN monocatenario y se replican de manera inusual a través de una forma intermedia de ADN bicatenario. Este proceso los lleva a cabo una enzima, llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, que dirige la síntesis de ADN a través de ARN.

Los retrovirus se clasifican actualmente en 7 géneros (ICTV, 2007), los cuales se puede apreciar en la figura 2.9. La característica importante de Alpharetrovirus, Betaretrovirus,

Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus es que contienen genomas simples; y Lentivirus, Spumavirus, Deltaretrovirus es que contienen genomas complejos. Es importante remarcar que sólo los retrovirus con genoma simple y Spumavirus llegan a ser retrovirus endógenos en sus huéspedes.

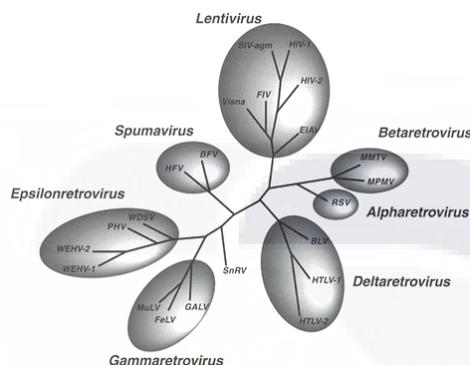


Figura 2.9 Análisis filogenético de retroviruses (Quackenbush, S. and Casey, J.) Academic Press 2000

Existen 2 géneros de retrovirus que atacan a humanos identificados: el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo (VIH), y los virus linfotrópicos de células T humanos (HTLV).

2.2.3 El genoma retroviral

Todos los genomas retrovirales consisten en dos cadenas (filamentos positivos) idénticas de moléculas de ARN, por lo que son los únicos virus diploides conocidos. La conservación del genoma diploide de los retrovirus tiene un papel dominante en el ciclo vital del virión. El genoma diploide parece estar ligado físicamente y el sitio en el cual el acoplamiento ocurre se le llama sitio del acoplamiento del dímero (DLS). Debido a su proximidad, el DLS contribuye como señal para la encapsulación de retrovirus. El Retrovirus es una familia diversa, y sus ciclos vitales individuales varían extensamente.

Específicamente el ciclo vital retroviral comienza en el núcleo de una célula infectada. En esta etapa del ciclo vital el genoma retroviral es un elemento del ADN integrado en el ADN de la célula huésped. Este proceso se invierte cuando el virus infecta una nueva célula. Una vez dentro de la misma, la transcriptasa inversa del virus copia en

ADN el ARN viral, luego elimina el ARN y sintetiza una segunda hebra o cadena, complementaria, del ADN, este ADN de cadena doble se inserta en el genoma de la célula y se transcribe. En cuanto a su estructura todos los retrovirus patógenos humanos tienen en su genoma los tres genes fundamentales: GAG, POL y ENV.

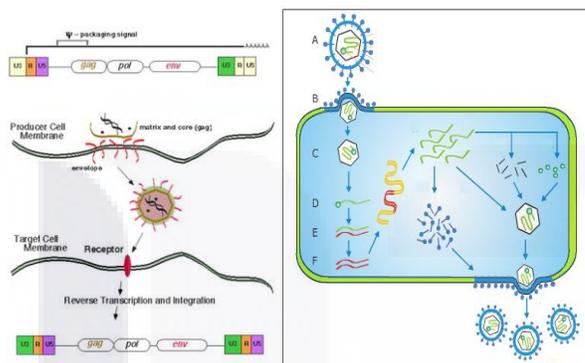


Figura 2.10 Ciclo vital de retrovirus (Baxter Lab, 2006)

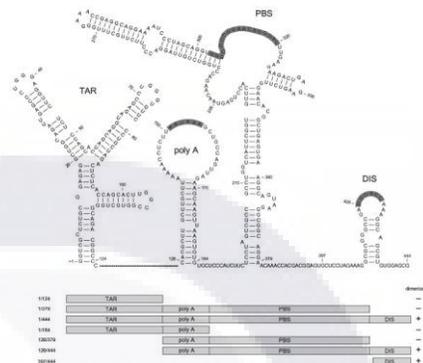


Figura 2.11 Estructura de la región líder del VIH-2 (Griffin, 1997)

2.2.4 Retrovirus más comunes en humanos

En la década de los 70's surgieron dos retro virólogos, Luc Montagnier (Montagnier, 2002) y Robert Gallo (Gallo, 1984), en Francia y EEUU respectivamente, los cuales se dedicaron afanosamente a encontrar retrovirus asociados a los cánceres y a las leucemias que se presentaban en el hombre. Robert Gallo anuncia el descubrimiento de un retrovirus patógeno en el hombre específicamente en las células T de un linfoma cutáneo humano al que denominaron HTLV (Human T-lymphotropic virus), así se precisó este retrovirus oncogénico humano. El HTLV-I es un retrovirus oncogénico que causa un cuadro de leucemia-linfomas de células T y un cuadro neurológico en el 5% de los pacientes que infecta. Transcurrió mucho tiempo antes que se desarrollaran las técnicas para lograr identificar un retrovirus humano; fue en el año 1980 que 2 equipos de investigadores, uno en Japón y otro en los Estados Unidos, de forma casi simultánea, anunciaron el descubrimiento del primer retrovirus humano, el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I). Uno de estos autores fue Poiesz (Poiesz, 1980) y colaboradores. Este hallazgo no fue fortuito, sino el resultado de una insidiosa y casi obsesiva búsqueda hasta

lograr demostrar en la especie humana lo que ya era conocido en otras especies (Takatsuki, 1992).

Los estudios realizados en Japón sobre este peculiar proceso linfoproliferativo frecuente en ese país al que llamaron leucemia / linfoma tipo T del adulto (LLTA) sirvieron de base para el descubrimiento de su agente etiológico, el HTLV-I. Posteriormente, este retrovirus se ha asociado con otras enfermedades como la paraparesia espástica tropical (PET) o mielopatía asociada al HTLV-I y entidades como el síndrome linforreticular (LRS) de la edad pediátrica, uveítis, dermatomicosis y otros (Poiesz, 1980; Grant, 2002; Blank, 1992; Soriano, 1994; Takatsuki, 1992).

Existen otros dos retrovirus aislados a partir de muestras humanas: el HTLV-II que se ha aislado de algunos casos de leucemias y los espumavirus, presentes en sistema nervioso central. Sin embargo, para ninguno de estos dos virus se ha podido demostrar una relación causa efecto con alguna patología. Siguen siendo por tanto "virus a la búsqueda de una enfermedad" (Alcami, 2007).

A partir del año 1983, el descubrimiento de otro retrovirus patógeno al ser humano se llevo a cabo, al que Gallo llamó HTLV-III (hoy conocido como VIH), mientras que Montagnier, le llamó "Virus de Inmuno Deficiencia Humana" VIH agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); es con este suceso que los retrovirus adquieren una gran importancia médica como agentes infecciosos novedosos. (Barre, 1983).

El VIH-1, causante de la inmensa mayoría de los casos de la actual pandemia del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue aislado por primera vez en el Instituto Pasteur de París en 1983. El VIH-2, menos patógeno, con una baja transmisión y por tanto menos extendido, causa SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida) en un porcentaje muy pequeño de los sujetos infectados y se encuentra limitado esencialmente a países del área del golfo de Guinea. Fue también aislado en el Instituto Pasteur en 1986.

El genoma del VIH-1, cuando está integrado en el ADN del huésped, es decir provirus, mide 9,8 kpb (9.800 pares de nucleótidos). Ambos extremos aparecen

flanqueados por secuencias repetitivas (LTR). El provirus contiene 9 genes. Tres de ellos codifican para proteínas estructurales comunes a todos los retrovirus (los genes *gag*, *pol* y *env*), siendo los seis restantes genes no estructurales, que codifican para dos proteínas reguladoras (genes *tat* y *rev*) y cuatro para proteínas de acceso (genes *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*). El genoma del VIH-2 es algo más largo (10,3 kpb) y le falta el gen *vpu*, presentando en su lugar otro llamado *vpx*. Las proteínas estructurales son codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*, y su secuencia cubre la mayor parte del genoma viral, quedando sólo una parte menor para el resto de los genes.

2.2.5 El Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida: SIDA

SIDA son las siglas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida y es una enfermedad que afecta a los seres humanos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El virus causante del SIDA es un retrovirus no transformante perteneciente a la familia de los Lentivirus. Los Lentivirus son retrovirus citopáticos que causan fundamentalmente cuadros de inmunodeficiencia, síndromes neurológicos y enfermedades autoinmunes de evolución lenta. El sida consiste en la incapacidad del sistema inmunitario del ser humano para hacer frente a las infecciones y otros procesos patológicos, y se desarrolla cuando el nivel de Linfocitos T CD4 desciende drásticamente en la sangre. Los linfocitos T CD4 son el tipo de células a las que ataca el VIH. Aunque existen muchas preguntas abiertas, los análisis de los virus existentes en el chimpancé sugieren que la subespecie "Pan troglodytes troglodytes" es probablemente el hospedador natural del VIH, a partir del cual se produjo el salto a la especie humana, se cree que fue así como emergió el virus *causante* del SIDA. No se puede dar una fecha precisa sino señalar periodos en que esta probabilidad fue mayor. Sin duda el "salto" inter-especie se ha producido en numerosas ocasiones, ya que los chimpancés albergan el SIVcpz (virus con alta homología con el VIH: SIV) desde hace miles de años. Sin embargo, los análisis de secuencias demuestran que el salto inter especie que ha dado origen a la actual pandemia de SIDA es muy reciente, y se sitúa entre los años 1930-1950. En este período se construyeron infraestructuras en África Central que movilizaron miles de obreros que frecuentemente se alimentaban de carne de primates, y que vivían en condiciones de hacinamiento y esto probablemente facilitó el

éxito del "salto". Según estas hipótesis, los sujetos infectados volvieron a sus lugares de origen o migraron a los suburbios de las capitales africanas diseminando la epidemia. A partir de 1960, coincidiendo con los procesos de descolonización y los movimientos migratorios, se produce la expansión de la epidemia de SIDA en el planeta.

2.2.5.1 Orígenes y descubrimiento del SIDA

Los primeros casos de SIDA fueron descritos en la ciudad de Los Ángeles (EEUU), en junio de 1981, allí el Dr. Michael Gottlich y colaboradores describen la inusual aparición de enfermedades características de pacientes inmuno-deprimidos en pacientes jóvenes previamente sanos. Después se detectaron en las ciudades de San Francisco, y Nueva York también. Dos años después en el Instituto Pasteur de Paris, el profesor Luc Montagnier y su equipo examinan un ganglio extirpado de un enfermo y determinan que existían rastros de la actividad bioquímica de un retrovirus, por lo que lo asociaron al SIDA. Al año siguiente en los USA, el profesor Roberto Gallo y sus colaboradores aíslan un virus y confirman los trabajos de Montagnier.

En Enero de 1985 Montagnier y Gallo publican las secuencias genéticas de los virus del SIDA que han identificado. Francia y EE.UU. comparten los derechos de la patente. En 1987 el presidente de Estados Unidos, Ronald Reagan y el entonces, primer ministro francés Jacques Chirac, emiten un comunicado común que pone fin a la controversia sobre la paternidad del descubrimiento del nuevo virus. A partir de ese momento ambos científicos Gallo y Montagnier son descritos como los "co-descubridores" del VIH".

2.2.5.2 Estadísticas actuales

En el año 2007, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (UNAIDS , 2008; WHO, 2008) publicó y estimó que aproximadamente 33 millones de personas tienen SIDA en el mundo, pero existen 2.7 millones de personas que fueron recientemente infectadas en este año. La OMS reporta además que el total de personas muertas por causa del SIDA en el año 2007 son 2 millones aproximadamente. Mas referencias sobre estos datos el lector puede apreciar la tabla 3, que se encuentra enseguida.

Específicamente en México, el último reporte que ha difundido OMS es del año 2008 (UNAIDS, 2008) donde publica datos del año 2005 y 2007, informa que existían 180000 personas infectadas con VIH (adultos y niños) en el año 2005 y en el 2007 se incremento a 200000 personas.

UNAIDS presenta en su documento “AIDS epidemic update” (UNAIDS, 2009) los siguientes datos:

- Personas viviendo con VIH en 2008: 33.4 millones [31.1–35.8]
- Nuevos infectados con VIH en 2008: 2.7 millones [2.4–3.0]
- Muertes causadas por el SIDA en 2008: 2.0 millones [1.7–2.4]

2.2.5.3 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es el virus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y pertenece a la familia de los retrovirus, se incluye en el género Lentivirus y se han identificado dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 causa la mayoría de las infecciones por el VIH en el mundo, mientras que el VIH-2 se presenta sobre todo en África Occidental. El virión mide unos 120 nm de diámetro y es aproximadamente esférico, dotado de una envoltura y una cápside proteica. Su genoma en una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse provisionalmente a ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta (ver figura 12).

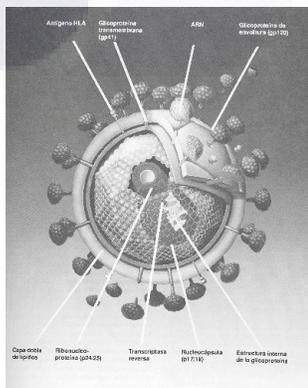


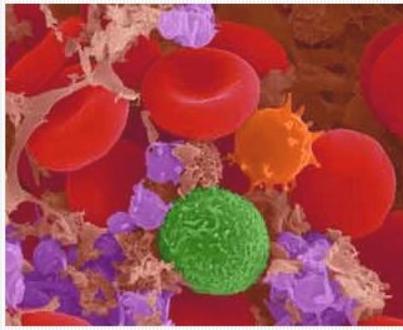
Figura 2.12 Estructura del VIH. (Baxter Lab, 2006)

El VIH, es un paradigma del agente infeccioso que utiliza todos los mecanismos de evasión de la respuesta inmune e infecta las células CD4 T del sistema inmune cuya función es la presentación de antígenos; ingresa a las células utilizando receptores de superficie que participan en la respuesta inmunológica como la molécula CD4 y los componentes de la familia de receptores de quimosinas (CXCR4, CCR5 y CCR3) y posee una alta frecuencia de mutación que le permite cambiar sus determinantes antigénicos.

2.3 Sistema inmune del ser humano

Los leucocitos son células con núcleo, mitocondrias y otros orgánulos celulares que son capaces de moverse libremente mediante pseudópodos, su tamaño oscila entre los 8 y 20 μm (micrómetro). Son las células responsables de las respuestas inmunitarias (Delves, 2000) por lo que juegan un rol fundamental en la respuesta inmune, es decir su función es proteger el organismo de infecciones producidas por gérmenes. Al igual que los glóbulos rojos, los glóbulos blancos se forman en la médula ósea y son creados por una célula madre; Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros. Hay diferentes grupos de glóbulos blancos: los llamados polimorfonucleares que comprende los neutrófilos, eosinófilos y los basófilos (conocidos como granulocitos); y los mononucleares que contiene los linfocitos y los monocitos. Los linfocitos se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente. Es conveniente aclarar que las respuestas inmunes específicas se dan en dos niveles: celular, en el que participan los linfocitos B y T; y humoral que viene dada por proteínas en disolución, llamadas inmunoglobulinas.

Los glóbulos blancos pueden atravesar las paredes de los capilares (los más diminutos vasos sanguíneos) para atacar, destruir y consumir a los gérmenes invasores.



a)



b)

Figura 2.13 a) Glóbulos blancos, plaquetas (violeta), linfocito T (verde) y monocitos (dorado)
Dennis Kunkel, Ph. D. b) Clasificación de Glóbulos Blancos

© 2000

Específicamente, los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos; los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células, así como de funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes, incluida la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

2.3.1 Linfocitos y su clasificación

Los linfocitos son las células encargadas de la defensa específica del sistema inmune. Estas células presentan receptores en su membrana, el TCR (por sus siglas en inglés: T cell receptor) en los linfocitos T y los anticuerpos en los linfocitos B, que les permiten reconocer una enorme variedad de invasores patógenos en el organismo. El TCR consiste en un conjunto de cadenas proteicas capaces de reconocer fragmentos de antígeno presentados por moléculas MHC (por sus siglas en inglés: major histocompatibility complex) y transmitir la información (señal) al interior (Weil, 2004). Como se menciono anteriormente y considerando estos receptores en la membrana se presenta comenta la clasificación siguiente.

2.3.1.1 Clasificación de Linfocitos B

Linfocitos B: Son células especializadas que poseen receptores con distribución clonal que tras interactuar con su ligando específico (antígeno) secretan inmunoglobulinas (Ig) denominadas ahora anticuerpos (Ac).

Los linfocitos B se originan y maduran en medula ósea pero una vez que hayan completado estos cambios se ubican en los ganglios linfáticos, donde se activan en presencia de un agente extraño, con la ayuda de otro tipo celular, los Linfocitos T CD4 + o Linfocitos T helper.

Los linfocitos B se clasifican en dos tipos: B-1 que producen anticuerpos IgM sin ayuda de los linfocitos T y se subdividen en B-1a (células reaccionan ante polisacáridos extraños) y B-1b (reconocen autoantígenos); y los B-2 conocidos como los convencionales, se pueden diferenciar en dos subtipos por su expresión de antígenos de superficie y por su localización: las células B de la zona del manto que darán lugar a una respuesta primaria rápida, fundamentalmente de Ig M, mientras que las foliculares darán lugar a respuestas de isótopos cambiados.

2.3.1.2 Clasificación de Linfocitos T

Los linfocitos T se clasifican en tres tipos (Regueiro, 1997). Las subpoblaciones de linfocitos, de las que existen más de 130, se pueden diferenciar por lo que, genéricamente, se denominan antígenos de diferenciación de leucocitos humanos y se designan como CD (cluster of differentiation; el término cluster hace referencia al grupo de anticuerpos monoclonales que los detectan).

1.- Linfocito T citotóxico: Son llamados también linfocitos T asesinos o T “killers” son los encargados de atacar y destruir los antígenos o las células que los portan. Son células de ataque directo, generalmente mediante la inyección de sustancias citotóxicas. Pueden atacar a muchos organismos diferentes. Destruyen células pre-cancerosas y cancerosas. Estas células también son llamadas linfocitos T CD8+; el término CD8 significa cluster of differentiation 8, en inglés, y representa en la superficie de éstas células, la existencia una glucoproteína del tipo inmunoglobulinas formada por dos cadenas, alfa y beta.

2.- Linfocito T Colaboradores. Conocidos también como linfocitos T auxiliares o en inglés "T Helper Cells", están involucrados en la activación y dirección de otras células inmunitarias, y son particularmente importantes en la respuesta inmune adaptativa. Son los más numerosos y ayudan a otros componentes del sistema inmune llevando a cabo varias

funciones como aumentar la activación de linfocitos B los cuales forman anticuerpos, de los linfocitos T exterminadores (citotóxicos) y linfocitos T supresores; pero también aumentando la actividad bactericida de fagocitos como los macrófagos; es por esto que el origen de su nombre de auxiliares o cooperadores.

Estas células también son llamadas linfocitos T CD4+; el término CD4 significa “cluster of differentiation 4”, en inglés, y representa la existencia, en la superficie de éstas células T una glucoproteína monomérica del tipo inmunoglobulinas.

Los linfocitos T helper se subdividen en TH1 y TH2 dependiendo del patrón de citocinas que secretan. Los linfocitos TH1 participan en las respuestas celulares ayudando a macrófagos y células citotóxicas en la destrucción de patógenos intracelulares (virus, micobacterias...). Los linfocitos TH2, sin embargo, cooperan con los linfocitos B en las respuestas humorales frente a patógenos extracelulares (bacterias, helmintos...).

3.- Linfocito T supresor: Conocido también como Linfocito T regulador. Inhibe la función de otros linfocitos T, para evitar respuestas inmunitarias excesivas. Son importantes para que el sistema inmune no ataque a los propios tejidos del individuo, manteniendo así la homeostasis y la tolerancia autoinmune. En esta sub-población se encuentran TCD4+ y TCD25+

2.3.2 Daños celulares causantes por VIH

Las células humanas que infecta el VIH con más frecuencia son los leucocitos T-CD4, y cuando éstos se multiplican para combatir infecciones, también hacen más copias del VIH involuntariamente. En infecciones prolongadas por VIH, el número de células T-CD4 disminuye. Este es un signo de que el sistema inmune se ha debilitado. Cuanto más bajo sea el recuento de células T-CD4, más posibilidades hay que el individuo se enferme. Cuando el VIH se acopla a una célula T-CD4, utiliza moléculas, específicamente proteínas, presentes en la superficie de la célula, estas se llaman receptores o quimosinas. El primer receptor que el VIH utiliza es la molécula CD4 del linfocito T. El virus luego usa un “correceptor”, que es otra proteína que se encuentra en la membrana del linfocito la proteína CCR5 o CXCR4.

El término CCR5 Significa en Inglés “chemokine (C-C motif) receptor 5” donde C-C es un dímero del aminoácido Cistina. La proteína CCR5 funciona como un receptor químico (chemokine), y en los humanos es codificada por el gene CCR5 (Samson , 1996) el cual se localiza en el cromosoma 3 en la posición 21. El CCR5 también ha sido designado recientemente CD195 (Cluster de diferenciación 195). Por otra parte el término CXCR4 significa “CXC chemokine receptors” donde CXC representa un trímero de aminoácidos Cistina-otro AA-Cistina. Esta proteína también es llamada Fusina y se encuentra en la membrana y funciona también como un receptor químico.

El VIH generalmente usa uno u otro de éstos correceptores para ingresar al linfocito. El VIH que usa el correceptor CCR5 se llama “trópico para el CCR5” o “R5 trópico”. Sin embargo, el tropismo viral puede ser CCR5, CXCR4 ó “doble/mezclado” (D/M) si algunas de las cepas de virus usan un solo correceptor o ambos.

El síndrome de inmunodeficiencia humana o SIDA, es la expresión final de la infección por el VIH. Es decir cuando el VIH ha penetrado los linfocitos T-CD4+. La infección por este virus ocasiona la destrucción del sistema inmune principalmente. Estas manifestaciones clínicas se deben al tropismo tanto macrofágico como linfocitario del virus (Kedzierska, 2003). El VIH presenta una preferencia para infectar a linfocitos T-CD4 (Alcami, 2000; Haase, 1996) en los que la replicación es activa y muy agresiva, lo que provoca como característica de la infección una profunda inmunosupresión.

2.3.3 Análisis que revelan la presencia de VIH en el ser humano

Existen varios métodos o análisis para detectar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); el análisis del VIH se refiere a las pruebas que determinan si un individuo está o no infectado con el VIH, que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad extendida por todo el planeta. Existen varios tipos de análisis que generalmente se practican en muestras de sangre obtenidas de individuos en estudio, aunque también se utilizan muestras de orina y otros fluidos corporales, inclusive en raspados de mejilla. Los diferentes tipos de análisis en la muestra son del tipo físico, químico y genómico. Lamentablemente, las pruebas de sangre no

funcionan muy bien durante las primeras semanas de infección. Si la prueba sale negativa la persona debe esperar unas semanas o hasta 3 meses para hacerse de nuevo la prueba ya que el virus no se detecta muy bien durante las primeras semanas de infección.

Los análisis más comunes para detectar si una persona está infectada con VIH se mencionan de forma general enseguida.

Análisis de detección de anticuerpos: Estos análisis buscan “anticuerpos” contra el VIH en la sangre, saliva u orina. Laboratorios Abbot (Abbot Lab, 2006) produce dos tipos de prueba: “MEIA” o “ELISA” (Denis, 1998), y “Western Blot” (Denis, 1998; BIO-RAD, 2006)

Análisis de carga viral: Mide la cantidad de VIH en la sangre. Existen varios tipos de análisis. Laboratorios Roche y Abbott. (Roche Lab, 2006; Abbott Lab, 2006), utilizan el método PCR (polymerase chain reaction). Bayer (Bayer Lab, 2006) utiliza el método bDNA (branched DNA) que combina la muestra con un material que emite luz. BioMerieux (Biomerieux, 2006), produce el método NASBA que amplifica las proteínas virales para producir un conteo.

Análisis de linfocitos T: Consiste en realizar un conteo de células CD4 y CD8 en la muestra.

Detección de virus con SERS: Los principios del fenómeno de exaltación (dispersión) Raman por sus siglas en inglés SERS, actualmente se están aplicando en múltiples áreas científicas, como la Física y la química (Matthew, 2004; Alexandre, 2004), pero ha tomado gran importancia la aplicación en bioquímica, específicamente en la detección de virus (Shanmukh, 2008; Kinkade, 2007). Recientemente se han realizado estudios para detectar la presencia de virus en la sangre con la técnica de SERS. La técnica SERS fue usada para obtener un espectro Raman de las cadenas (A1/long, B1 y A2) del virus respiratorio sincytial (RSV), causante de un tipo de gripe (Shanmukh, 2008), donde este estudio presenta un índice de reproductividad alto, y el tiempo que se requiere para obtener resultados es muy corto comparado con otros análisis bioquímicos tradicionales como el PCR. La diferencia es de horas a segundos. Considerando el alto índice de mutación que

presentan los virus en la actualidad, la eficiente detección de éstos en el organismo es fundamental, para prevenir enfermedades y contagios posteriores. (Kinkade, 2007; Shanmukh, 2006)

Con espectroscopia Raman mejorada con el uso de nano partículas (nanorods) de plata, Yiping Zhao y colaboradores de la Universidad de Georgia en USA, han reportado que encontraron los espectros de diferentes tipos de virus (Shanmukh, 2006). Los espectros reportados son Adenovirus, Rhinovirus y VIH. Este es un adelanto importante en el campo de la medicina puesto que el diagnóstico rápido y efectivo de la presencia de estos microorganismos en el ser humano favorecerá la pronta prescripción médica y por lo tanto la disminución de morbilidad y mortalidad de la población.

2.3.4 Etapas de desarrollo del VIH en el organismo humano

El VIH al ingresar en el organismo del ser humano pasa por varias etapas: infección, incubación, comienzo de la enfermedad y el VIH avanzado (SIDA).

1) Etapa de infección

Ocurre durante las primeras cuatro semanas después que una persona se infecta con el VIH. En esta etapa el paciente puede sentir síntomas de un resfriado como irritación de garganta, fiebre, dolor de cabeza, dolor de estómago, diarrea y cansancio. Otros síntomas que presenta el paciente son manchas en la cara o pecho, sudores por la noche, dolor en las coyunturas y los músculos, náusea, vómitos e inflamación en las glándulas linfáticas (brazos, cuello y abdomen). En forma menos frecuente el VIH puede causar una inflamación en el cerebro, que causa confusión, dolor de cabeza, problemas en el sistema nervioso y hasta coma.

2) Etapa de incubación

Los pacientes, después de recuperarse de los síntomas antes mencionados y que usualmente es muy rápida, entran en el periodo de incubación. Este periodo puede durar hasta 10 años o más. Durante la incubación los pacientes son asintomáticos, se ven y se sienten saludables. La mayoría de los adultos en el mundo con VIH están en esta etapa

3) Comienzo de la enfermedad

Después del periodo de incubación las personas con VIH se enferman. El virus debilita tanto su sistema inmunológico que empiezan a tener infecciones que un sistema saludable pudiera combatir fácilmente. Las personas comienzan a perder mucho peso y pueden sufrir de malnutrición si no comen alimentos adecuados.

4) VIH avanzado (SIDA)

Una vez la persona desarrolla una o varias enfermedades o infecciones oportunistas y las células T4 disminuyen en el cuerpo, la persona es diagnosticada con SIDA. En esta etapa la salud de la persona empeora a medida que la enfermedad oportunista (cáncer, pulmonía o tuberculosis) progresa en el cuerpo. Eventualmente la persona muere por una de estas enfermedades.

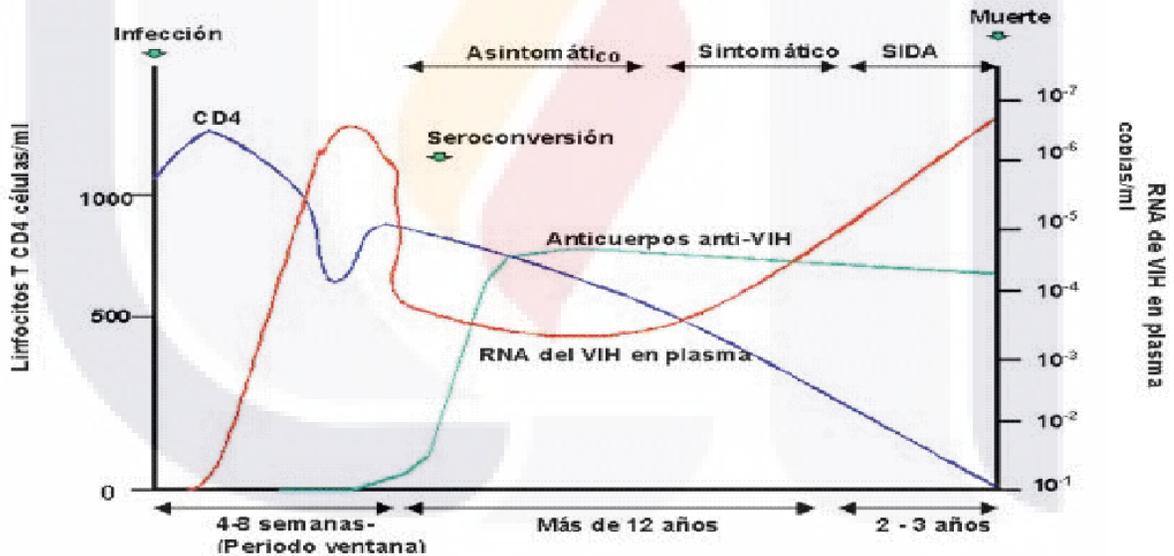


Figura No.2.14 Comportamiento CD4, RNA del VIH y Anticuerpos anti-VIH

2.4 Inteligencia Artificial y Bioinformática

2.4.1 El concepto de Bioinformática.

Los instrumentos proporcionados por la Biología Computacional (BC) permite actualmente a los científicos trabajar con simulaciones de sistemas de bio-moléculas activos, análisis de datos en forma acelerada, este fenómeno es conocido como “en silico” (Miramontes, 1992). La BC se define como “el desarrollo y la aplicación de métodos analíticos en datos, en modelado matemático y en técnicas de simulación computacionales obtenidas del estudio de sistemas biológicos, psicológicos y sociales” (BISTI, 2000). La biología computacional proporciona hipótesis de investigación de un problema biológico específico usando computadoras y datos simulados. Con la aplicación de estas técnicas computacionales al procesamiento de la información biológica (sistemas biológicos) y el uso y aplicación de métodos propios de disciplinas como matemáticas aplicadas, ciencias computacionales (informática), estadística, inteligencia artificial (Heurísticas), ciencias de la salud, etc. nació la Bioinformática (en Inglés: Bioinformatics), esta nueva ciencia proporciona a los científicos una nueva arquitectura de soporte. Formalmente la Bioinformática fue definido como “Investigación, desarrollo y aplicación de instrumentos computacionales y acercamientos para ampliar el uso de datos biológicos, médicos, comportamiento y de salud, incluso aquellos para adquirir, almacenar, organizar, archivar, analizar, o visualizar tales datos” (BISTI, 2000). En otras palabras, la Bioinformática se encarga de abordar los problemas de almacenamiento y de análisis de la información que se produce a partir del creciente desarrollo de las tecnologías aplicadas a los sistemas biológicos. Es importante considerar la existencia de grandes áreas de investigación de la Inteligencia Artificial como son los algoritmos genéticos y de las herramientas informáticas existentes como son las bases de datos, almacenes de datos (data warehouse), minería de datos (data mining), minería de datos en la Web (web mining), tecnologías colaborativas, algunos lenguajes de programación, etc. Es importante saber si existen diferencias entre Biología Computacional (BC) y Bioinformática; Hoy, los límites entre bioinformática y biología computacional no están claros. Las ramas de la biología como el estudio de la estructura tridimensional de las biomoléculas, como parte de la filogenética el

establecimiento de inferencias evolutivas a partir de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, estudio de asociación que se refiere al estudio de la implicación de diferentes alelos en procesos patológicos; tienen un punto en común que es el uso ineludible de herramientas computacionales, es por esto que durante muchos años estuvieron agrupadas bajo la denominación general de Biología Computacional (BC). Pero actualmente las ramas de la biología mencionadas e inclusive las nuevas ramas (se mencionan más adelante), están siendo agrupadas en el concepto de Bioinformática. Si fuera posible definir diferencias entre BC y Bioinformática, es que la Bioinformática se aplica preferiblemente a la obtención de conocimiento con sentido biológico a partir de datos, más que a la búsqueda de nuevas vías para el manejo y gestión de estos.

2.4.2 Orígenes de la Bioinformática

El término Bioinformática se comenzó a utilizar en la década de los 90's, pero se ha venido gestando desde que comenzaron a utilizarse las computadoras en las universidades y centros de investigación para ensayos biológicos a mediados de los años 60's.

Desde los descubrimientos de Watson y Crick en 1953 (Watson, 1953) y el desciframiento del genoma humano en el año 2000, descubrimientos de gran alcance están siendo constantemente hechos. La finalización de la secuenciación del genoma humano en el abril de 2003 marcó el principio de una nueva era para la biología moderna, estamos ahora en una era genómica y como se mencionó previamente, tuvo lugar la aparición de la Bioinformática con sus áreas actuales.

Estas áreas o campos a que se refiere el texto son términos científicos creados a partir de cambios en la estructura de palabras que desde su etimología, donde se sustituye el sufijo -omas (en inglés -omes) por el sufijo -ómico (en inglés -omics), dando lugar a nuevos campos de estudio. Enseguida se expresan algunos ejemplos para explicar lo antes dicho. La palabra "Genomas" que se refiere al estudio de los genomas en cualquier especie (en inglés Genomes) se sustituye el sufijo -omas por el sufijo -ómico, creándose la palabra Genómico (en inglés Genomics), es decir, se creó la palabra Genómico a partir de

Genomas. A partir de lo anterior, se han creado una infinidad de nuevas ramas en las áreas de la Bioinformática.

2.4.3 Instituciones y Centros de Investigación en México y el mundo

En años recientes, Institutos y Centros de investigación alrededor del mundo se han fundado, en esta sección se mencionan solo los más importantes de acuerdo al prestigio y factor de impacto actual.

Importante y más utilizado es el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (siglas en inglés NCBI) fundado en 1988 (NCBI, 2009), donde es posible encontrar una gran cantidad de información, sobre genomas, proteínas, clasificación de microorganismos como bacterias y virus, etc.

El Instituto Sanger fundado en 1992 (SI, 2009), es un instituto de investigación sobre genomas, fundado inicialmente por Wellcome trust (WT, 2009), donde generan secuenciamiento (sequencing) en gran escala, mantienen y generan elementos informáticos y análisis de variación genética con la finalidad de entender la función de los genes, generar datos y recursos que apoyen la investigación biomédica, etc.

El Instituto de Bioinformática Europeo (Siglas en Inglés EBI) (EBI, 2009) que forma parte del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL) fundado en 1994, tiene investigación especializada y grupos de servicios que proporcionan datos biológicos valiosos y útiles para ayudar a la comunidad científica en el entendimiento de datos genómicos y proteómicos.

Se visualiza una futura era Genómica, donde la medida de niveles de ARN mensajero, análisis de expresión de proteínas, predicción de estructuras de proteínas, interacción es proteína-proteína, análisis de secuencias, análisis de expresión genética, análisis de regulación biológica, modelado de sistemas biológicos, métodos de secuenciamiento, etc., están ocurriendo.

En México el desarrollo de la Bioinformática con el uso de sus herramientas ha tenido lugar en varias instituciones y centros de investigación. Por mencionar los más

importantes, actualmente la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Centro de Ciencias Genómicas y la Sociedad Mexicana de Ciencias Genómicas colabora en el desarrollo y mantenimiento del Nodo Nacional de Bioinformática.

El Centro de Ciencias Genómicas (CCG), es miembro de la Red Europea de Biología Molecular (EMBnet), y tiene a su cargo el Nodo Nacional de Bioinformática (EMBnet México). Este centro de investigación cuenta además con bases de datos disponibles en internet e impulsa, mediante cursos y talleres, la formación de profesionistas y doctores en el área, entre otras actividades. Otra institución importante en nuestro país es el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), la cual está a la vanguardia en este campo. Otras instituciones participan también como UAM, ITESM y UAM están desarrollando proyectos Bioinformáticos.

El Dr. Julio Collado Vides, director del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM, es uno de los pioneros de la Bioinformática en México; recientemente fue reconocido con el premio “Robert F. Kennedy Visiting Professors in Latin American Studies Award”, que otorga la Universidad de Harvard.

2.5. Sistema Inferencial Adaptativo Neuro-Difuso

2.5.1 Algunas Técnicas recientes de Inteligencia Artificial.

Las técnicas de IA buscan soluciones a problemas de diferente índole y utilizan métodos de búsqueda que se dividen, en globales y locales. Los métodos globales tratan de encontrar el máximo absoluto (global) de un problema, mientras que los métodos locales se concentran en la vecindad de la solución generada inicialmente, y por lo tanto, necesitan alguna técnica adicional, para acercarse al máximo global o absoluto. Con lo anterior se pueden destacar dos tipos: Métodos híbridos y métodos exhaustivos.

En algunos problemas donde el espacio de búsqueda es suficientemente pequeño y enumerable, se pueden usar métodos de búsqueda exhaustiva (enumerativas): se examinan una por una todas las soluciones posibles, y se da por buena aquella que tenga el máximo valor de la función objetivo.

Los algoritmos de búsqueda local parten de una solución inicial, y, aplicándole operadores de variación, la van alterando; si la solución alterada es mejor que la original, se acepta, si no lo es, se vuelve a la inicial. El procedimiento se repite hasta que no se consigue mejora en la solución. Los procedimientos de búsqueda local más usados son los basados en el gradiente: en este caso, el operador de variación selecciona una nueva solución teniendo en cuenta la derivada de la función que se quiere optimizar en el punto, tratando de ascender o descender usando el gradiente hasta llegar a un punto de inflexión donde no se puede obtener ninguna mejora adicional.

Uno de los métodos más conocidos son los algoritmos voraces o greedy, que funcionan de la forma siguiente: para cada variable, se asigna aquél valor que maximice alguna función de utilidad. Los algoritmos voraces sustituyen un criterio de optimalidad global por un criterio en cada paso; no siempre los dos se corresponden, y por tanto, no tienen porqué hallar el máximo global del problema.

Los métodos de búsqueda global tratan de escaparse de los máximos locales, explorando más eficientemente el espacio de búsqueda. Generalmente, añaden algún

componente aleatorio a la búsqueda, de forma que, si se encuentra un mínimo local, se salte a otro punto del espacio de búsqueda, donde pueda haber otro máximo, posiblemente global.

Por mencionar algunas técnicas actuales, se puede mencionar varias técnicas o algoritmos, por ejemplo “Ascenso de colinas” el cual es un algoritmo de búsqueda local, el cual siempre hace la mejor elección disponible en cada paso, con la esperanza de que se pueda obtener el mejor resultado global. El método termina cuando no hay mejoras, o cuando se alcanza un número predefinido de iteraciones. Otra técnica de búsqueda local es el “Enfriamiento simulado” que a diferencia del Ascenso de Colinas, permite escapar de óptimos locales (Glover, 2003). Inicialmente el algoritmo fue propuesto por Kirkpatrick, Gelatt, y Vecchi en 1983 (Kirkpatrick, 1983); y desde entonces, se han reportado múltiples implementaciones muy exitosas en diferentes áreas; (Corana, 1987; Meijer, 1998; Coleman, 2004; Hsu, 1993; Michielsen, 1992; Pepper, 2000; Ohlmann, 2000; Wu, 1992; Klein, 1989; Marinari, 1992; Bohachevsky, 1988, entre otros.

La “Búsqueda tabú” (BT) es una técnica heurística para solucionar problemas de optimización combinatoria; sus orígenes se ubican a fines de los años 60s y principios de los 70s, y se atribuye a Fred Glover (Glover, 1986; Hansen, 1986).

BT es un procedimiento heurístico de "alto nivel" que se utiliza con gran éxito para resolver problemas de optimización cuya característica principal es la de "escapar" de los óptimos locales, y puede verse como una meta-heurística que se superpone a una técnica de búsqueda y que se encarga de evitar que dicha técnica caiga en óptimos locales prohibiendo (o, en un sentido más general, penalizando) ciertos movimientos. Este algoritmo se utiliza principalmente en la optimización de tiempos y movimientos en la industria, por ejemplo la optimización de agendas (Richards, 2003).

La meta-heurística llamada algoritmos genéticos (AG's), introducido por Koza (Koza, 1980) en el año de 1992. AG's mantiene una población de individuos $P(t)$ que evolucionan en cada generación que se crea. Cada individuo representa una solución potencial a un problema en estudio. Algunas aplicaciones recientes de esta meta heurística están, entre otras, en resolver problemas de calendarización de eventos, optimización de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismos químicos para la oxidación de hidrocarburos líquidos (Wade, 2005), conformación de muestras proteicas en el área de bioquímica (Yang, 2006), análisis de multi-componentes adaptativos en el área de química (Zinn, 2005), entre otros.

“Colonia de hormigas” algoritmo propuesto por Dorigo et al. (Dorigo, 1991; Dorigo, 1996), que se basa en el comportamiento colectivo de las hormigas en la búsqueda de alimentos para su subsistencia, de esta forma se abordan posibles soluciones a un problema en estudio. Estos son solo algunos ejemplos de técnicas de IA, pero si ser los mas importantes, este trabajo se centra en el uso y estudio de las técnicas de Lógica difusa y redes neuronales artificiales mezcladas en lo que se llama un sistema neuro-difuso, específicamente un sistema adaptativo inferencial neuro-difuso (ANFIS).

2.5.2 Lógica difusa

Conocida también como lógica borrosa (Fuzzy logic) se fundamenta en permitir manejar información vaga o de difícil especificación si se quisiera hacer cambiar con esta información el funcionamiento o el estado de un sistema específico. Se ha considerado de manera general que la lógica difusa se inició en 1965, en la Universidad de California en Berkeley por Lotfi A. Zadeh (Zadeh, 1988). Es entonces posible con la lógica borrosa gobernar un sistema por medio de reglas de “sentido común” las cuales se refieren a cantidades indefinidas. La lógica difusa es entonces definida como un sistema matemático que modela funciones no lineales, que convierte unas entradas en salidas acordes con los planteamientos lógicos que usan el razonamiento aproximado.

El término “difuso” se debe a que los valores de verdad no-deterministas utilizados en la lógica tienen, por lo general, una connotación de incertidumbre. La clave de esta adaptación al lenguaje, se basa en comprender los cuantificadores de nuestro lenguaje. Lo difuso puede entenderse como la posibilidad de asignar más valores de verdad a los enunciados que los clásicos “falso” o “verdadero”, es decir, se les asocia valores de verdad que son grados de veracidad o falsedad. El objetivo de todo sistema manejador de una lógica difusa es describir los grados de los enunciados de salida en términos de los de entrada.

En la lógica clásica o rígida (crisp logic) una proposición sólo admite dos valores: verdadero o falso, mientras que en la lógica difusa, admite múltiples valores de verdad, es decir, es una lógica multivaluada que no impone a sus enunciados únicamente valores falso o verdadero. La lógica difusa procura crear aproximaciones matemáticas en la resolución de ciertos tipos de problemas, es decir pretenden producir resultados exactos a partir de datos imprecisos, en otras palabras, la lógica difusa se caracteriza por querer cuantificar incertidumbre.

La lógica difusa es entonces, un intento por modelar incertidumbre o la imprecisión en el conocimiento (McNeill, 1994). La lógica difusa ha cobrado una gran fama por la variedad de sus aplicaciones, las cuales van desde el control de complejos procesos industriales, hasta el diseño de dispositivos artificiales de deducción automática, pasando por la construcción de artefactos electrónicos de uso doméstico y de entretenimiento, así como también de sistemas de diagnóstico. La expedición de patentes industriales de mecanismos basados en la lógica difusa tiene un crecimiento sumamente rápido en todas las naciones industrializadas del orbe.

El concepto clave para entender cómo trabaja la lógica difusa es el conjunto difuso. Es importante definir éste concepto. Un conjunto difuso es función que a cada elemento del universo le asocia su grado de pertenencia, es decir, es una colección bien definida de elementos donde a cada elemento del universo se le asocia un grado de pertenencia, que es un número entre 0 y 1. En tanto el grado de pertenencia sea más cercano a 1 tanto más estará el elemento en el conjunto y en tanto el grado de pertenencia sea más cercano a 0 tanto menos estará el elemento en el conjunto. En la teoría de conjuntos difusos se definen también las operaciones de unión, intersección, diferencia, negación o complemento, y otras operaciones sobre conjuntos en los que se basa esta lógica.

La teoría clásica de conjuntos solo contempla la pertenencia o no pertenencia de un elemento a un conjunto, sin embargo la teoría de conjuntos difusos contempla la pertenencia parcial de un elemento a un conjunto, es decir, cada elemento presenta un grado de pertenencia a un conjunto difuso que puede tomar cualquier valor entre 0 y 1. Este grado de pertenencia se define mediante la función característica asociada al conjunto difuso: para

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cada valor que pueda tomar un elemento o variable de entrada x la función característica $\mu_A(x)$ proporcional el grado de pertenencia de este valor de x al conjunto difuso A .

Formalmente, un conjunto clásico A , en un universo de discurso U , se puede definir enumerando los elementos que pertenecen al conjunto, especificando las propiedades que deben cumplir los elementos que pertenecen a ese conjunto o, en términos de la función de pertenencia $\mu_A(x)$:

$$\mu_A(x) = \begin{cases} 1; & x \in A \\ 0; & x \notin A \end{cases}$$

En cambio un conjunto difuso en el universo de discurso U se caracteriza por una función de pertenencia $\mu_A(x)$ que toma valores en el intervalo $[0,1]$ y puede representarse como un conjunto de pares ordenados de un elemento x y su valor de pertenencia al conjunto:

$$A = \{(x, \mu_A(x)) \mid x \in X\}$$

Los componentes básicos de la lógica difusa son los conjuntos borrosos (fuzzy sets). Un conjunto borroso es un conjunto sin límites definidos, significa que contiene elementos pertenecientes en grados parciales al conjunto, contrariamente a la teoría determinada clásica basada en la lógica rígida (crisp logic) donde cada elemento pertenece enteramente o no a un conjunto. El grado de la pertenencia de un elemento al conjunto representa la compatibilidad de ese elemento con la idea que el conjunto representa. Los conjuntos borrosos se representan en una gráfica donde el eje horizontal corresponde a los elementos en el conjunto, el eje vertical corresponden al grado pertenencia del elemento al conjunto y la curva define cómo cada elemento está presente en el espacio de pertenencia. Esta curva se llama la función de pertenencia (MF Membership function). Hay diversos tipos de funciones de pertenencia, los cuatro tipos estándares son: Z, lambda, pi y S (McNeill, 1994).

Otro concepto que es importante definir es una variable lingüística, la cual es una variable que combina las categorías subjetivas múltiples que describen el mismo contexto, los valores posibles de una variable lingüística son llamados términos lingüísticos y son definidos por los conjuntos borrosos. La función principal de una variable lingüística es traducir un valor numérico a un valor lingüístico por medio de los conjuntos borrosos. Estas

variables lingüísticas son el mecanismo para convertir los valores numéricos en valores categóricos. Los conceptos anteriores se pueden apreciar en el ejemplo siguiente (Jang, 2007).

Si $X = \text{“Edad”}$, los conjuntos difusos pueden ser “joven”, “maduro” y “anciano” representados por las funciones de pertenencia (MF): $\mu_{\text{joven}(x)}$, $\mu_{\text{maduro}(x)}$, y $\mu_{\text{anciano}(x)}$ respectivamente. De esta forma la variable lingüística “Edad” puede tomar varios valores lingüísticos, como joven, maduro y anciano. Las funciones de pertenencia para estas variables lingüísticas se aprecian en la figura 2.15.

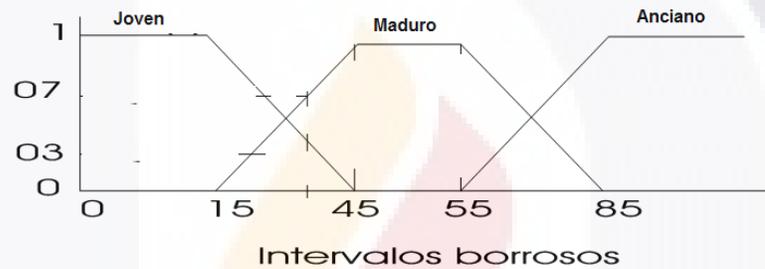


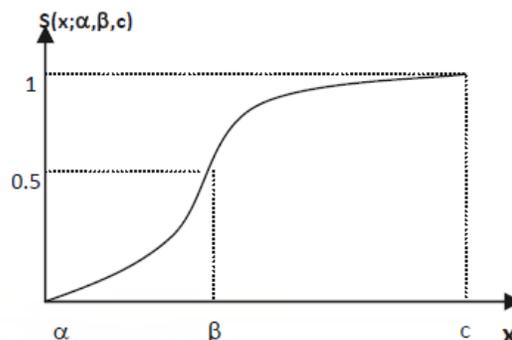
Figura 2.15 Funciones de pertenencia de variables lingüísticas Joven, Maduro y Anciano

Un conjunto difuso está caracterizado por sus funciones de pertenencia, las cuales son de una dimensión y de dos dimensiones.

Las funciones de pertenencia de una dimensión, es decir, con una sola entrada son muy variadas. La literatura refiere varios tipos (Jang, 2007), como Triangular, Trapezoidal, Gaussiana, Campana, Sigmoidal, etc. Algunos ejemplos de funciones de pertenencia μ donde X es el conjunto de los números reales. En este caso, normalmente se usan funciones estandarizadas, con parámetros ajustables.

- a) Función S, tres parámetros:

$$\begin{aligned}
 S(x; \alpha, \beta, c) &= 0 \quad \text{para } x \leq \alpha \\
 &= 2 \left(\frac{x - \alpha}{c - \alpha} \right)^2 \quad \text{para } \alpha \leq x \leq \beta \\
 &= 1 - 2 \left(\frac{x - c}{c - \alpha} \right)^2 \quad \text{para } \beta \leq x \leq c \\
 &= 1 \quad \text{para } x \geq c
 \end{aligned}$$

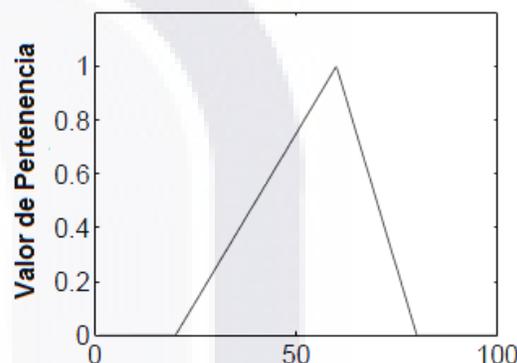


En $S(x; \alpha, \beta, c)$, el parámetro β es el valor de X en el cual $S=1/2$, o sea: $\beta=(\alpha+c)/2$

b) Función triangular, tres parámetros:

$$\text{tri}(x; a, b, c) = \max \left(\min \left(\frac{x - a}{b - a}, \frac{c - x}{c - b} \right), 0 \right)$$

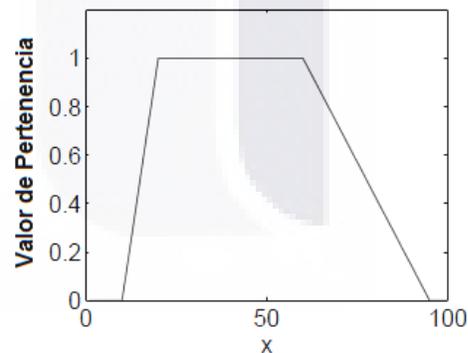
Funcion de Pertenencia Triangular



c) Función trapezoidal, cuatro parámetros:

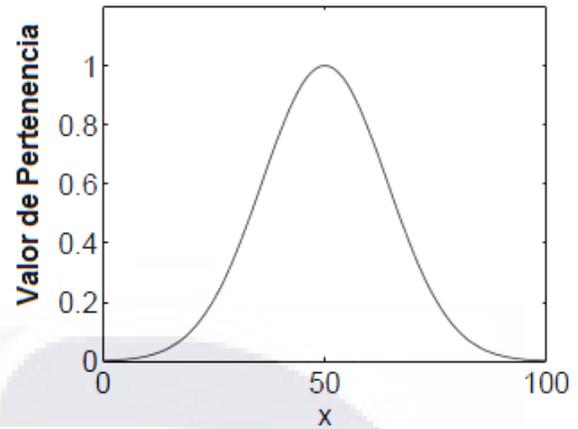
$$\text{trap}(x; a, b, c, d) = \max \left(\min \left(\frac{x - a}{b - a}, 1, \frac{d - x}{d - c} \right), 0 \right)$$

Función de Pertenencia Trapezoidal



d) Función Gaussiana, dos parámetros:

Función de Pertenencia Gaussiana



$$gauss(x; \sigma, c) = e^{-\left(\frac{x-c}{\sigma}\right)^2}$$

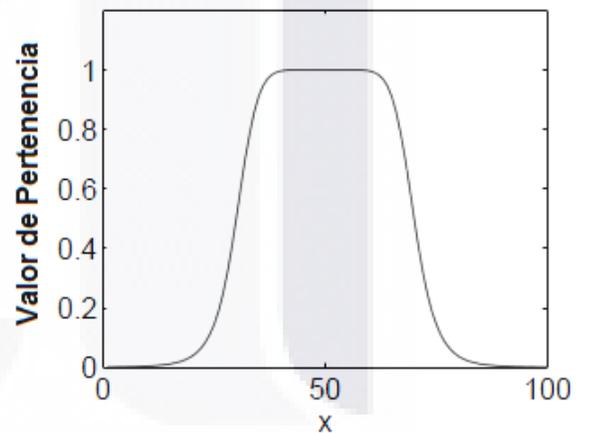
e) Función sigmoïdal, dos parámetros:

$$sigmoid(x; a, c) = \frac{1}{1 + \exp[-a(x - c)]}$$

f) Función campana, tres parámetros:

$$bell(x; a, b, c) = \frac{1}{1 + \left|\frac{x - c}{a}\right|^{2b}}$$

Función de Pertenencia Campana



En las funciones de membrecía de dos dimensiones se requieren dos entradas, y algunas veces esto es conveniente.

Las principales operaciones entre los conjuntos difusos son:

Conjunto complemento $\mu_A(x) = 1 - \mu_A(x)$

Unión de conjuntos: $\mu_{A \cup B}(x) = máx[\mu_A(x), \mu_B(x)]$

Intersección de conjuntos $\mu_{A \cap B}(x) = \min[\mu_A(x), \mu_B(x)]$

En la lógica difusa, las relaciones difusas que representan el grado de presencia o ausencia de asociación, interacción o interconexión entre los elementos de dos o más conjuntos difusos, son imprescindibles. Por ejemplo, la expresión:

$R(U, V) = \{(x, y), \mu_R(x, y) \mid (x, y) \in U \times V\}$ representa una relación difusa donde U y V son dos universos de discurso, y la relación difusa R (U, V) es un conjunto difuso en el espacio producto UxV que se caracteriza por la función de pertenencia $\mu_R(x, y)$ donde x pertenece a U e y pertenece a V.

La intersección o unión entre R y S, que son composiciones entre las dos relaciones, se definen como:

$$\begin{aligned} \mu_{R \cap S}(x, y) &= \mu_R(x, y) * \mu_S(x, y) \\ \mu_{R \cup S}(x, y) &= \mu_R(x, y) \oplus \mu_S(x, y) \end{aligned}$$

La interacción de dos conjuntos difusos A y B por ejemplo, se expresa en general por una función T. Los operadores T-norm y T-conorm son generalizaciones de los operadores lógicos OR (unión) y AND (intersección), (Jang, 2007).

En el caso de T-norm (AND):

Es una familia de operadores de mapeo $T: [0,1] \times [0,1] \rightarrow [0,1]$, cuya notación es: $a \text{ AND } b = [aTb] = T(a, b)$ y cumple las siguientes propiedades:

- $T(a,b)=T(b,a)$ Propiedad conmutativa
- $T(T(a,b),c)=T(a,T(b,c))$ Propiedad asociativa
- Si $a \geq c$ y $b \geq d$ entonces $T(a,b) \geq T(c,d)$ Monotonía
- $T(a,1) = a$ Condición de borde

En el caso de T-conorm (OR):

Es una familia de operadores de mapeo $S: [0,1] \times [0,1] \rightarrow [0,1]$, cuya notación es: $a \text{ OR } b \equiv [aSb] = S(a, b)$ y cumple las siguientes propiedades:

$S(a,b) = S(b,a)$ Propiedad conmutativa

$S(S(a,b),c) = S(a,S(b,c))$ Propiedad asociativa

Si $a \geq c$ y $b \geq d$ entonces $S(a,b) \geq S(c,d)$ Monotonía

$S(a,0) = a$ Condición de borde

Algunas T-norm y T conorm han sido propuestas por Yaguer (Yaguer, 1980) y Sugeno (Sugeno, 1977).

Proposiciones borrosas: Una proposición, regla o cláusula borrosa establece una relación entre valores de un dominio y el espacio borroso. Existen proposiciones condicionales e incondicionales.

En cuanto a la proposición borrosa incondicional, existen dos tipos:

- a) Sin calificadores: Es de la forma: A is B, donde A y B representan un conjunto de valores lingüísticos representados por conjuntos borrosos:

$$\mu_A(x) = \alpha \text{ then resultado} = \mu_B^{-1}(\alpha)$$

- b) Con calificadores: Es de la forma: Proposición(A is B) is C.,

$$\min\{\mu_A(x), \mu_B(x)\} = \alpha, \text{ then resultado}(x) = \mu^{-1}(\alpha)$$

En cuanto a la proposición borrosa condicional, que combina uno o más conjuntos borrosos de entrada (antecedentes o premisas) y asocian uno de salida (consecuente), son reglas del tipo: *if x is A then y is B*, o *if x is A then C*, donde: *x is A* es el antecedente y representa un conjunto de valores lingüísticos definido por un conjunto borroso en el universo de discurso X; *y is B* o *C* es el consecuente que puede o no seguir lógica borrosa. Si sigue lógica borrosa, representa un conjunto de valores lingüísticos definido por un conjunto borroso en el universo de discurso Y. Hay dos formas básicas de reglas borrosas condicionales, el sistema Mamdani donde el antecedente y consecuente son conjuntos

borrosos y el sistema Takagi-Sugeno donde solamente el antecedente es un conjunto borroso, el consecuente es una combinación lineal de las variables de entrada. Enseguida se explican con más profundidad estos sistemas.

Otro elemento importante en la lógica difusa es el Razonamiento Borroso, también conocido como razonamiento aproximado, es un procedimiento de inferencia utilizado para sacar conclusiones de un conjunto de condiciones y de reglas borrosas.

Reglas simples con un antecedente:

$$\mu_{B'}(y) = [\vee_x (\mu_{A'}(x) \wedge \mu_A(x))] \wedge \mu_B(y) = w \wedge \mu_B(y)$$

Donde: A, A' y B son conjuntos borrosos de X, X e Y respectivamente y se asume que $A \rightarrow B$ es una relación R en X, Y. El conjunto B' inducido por la proposición x es A y la regla borrosa if x es A then y es B, está definido por:

$$\mu_{B'}(y) = \max_x \min[\mu_{A'}(x), \mu_R(x,y)] \quad y \quad \mu_{B'}(y) = \vee_x (\mu_{A'}(x) \wedge \mu_R(x,y))$$

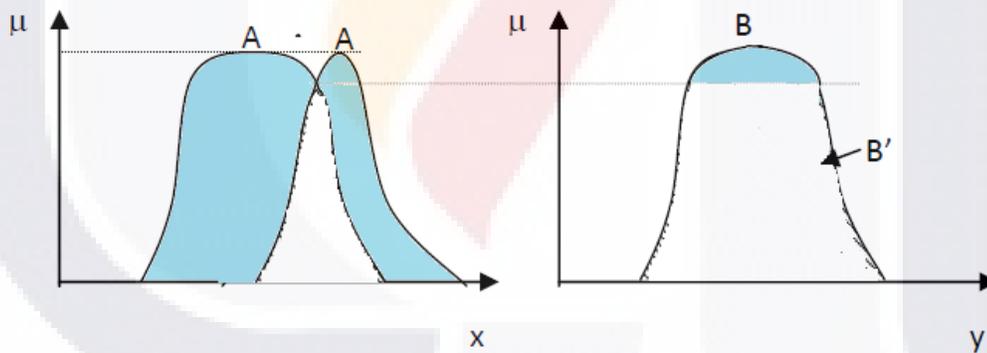


Figura 2.16. Reglas simples con un antecedente

Reglas simples con dos antecedentes:

$$\mu_{C'}(z) = \vee_{x,y} [\mu_{A'}(x) \wedge \mu_{B'}(y)] \wedge [\mu_A(x) \wedge \mu_B(y) \wedge \mu_C(z)]$$

Premisa 1: x es A' y y es B'

Premisa 2 if x es A AND y es B entonces z es C ($A \times B \rightarrow C$)

Consecuencia: z es C'

La premisa 2 puede ser puesta como una relación ternaria:

$$\mu_R(x, y, z) = \mu_{(A \times B) \times C}(x, y, z) = \mu_A(x) \wedge \mu_B(y) \wedge \mu_C(z)$$

De donde:

$$\mu_{C'}(z) = \bigvee_{x,y} \{ [\mu_{A'}(x) \wedge \mu_{B'}(y) \wedge \mu_A(x) \wedge \mu_B(y)] \wedge \mu_C(z) \}$$

$$\mu_{C'}(z) = \{ \bigvee_x [\mu_{A'}(x) \wedge \mu_A(x)] \} \wedge \{ \bigvee_y [\mu_{B'}(y) \wedge \mu_B(y)] \} \wedge \mu_C(z)$$

$$\mu_{C'}(z) = \underbrace{\bigvee_x [\mu_{A'}(x) \wedge \mu_A(x)]}_{w_1} \wedge \underbrace{\bigvee_y [\mu_{B'}(y) \wedge \mu_B(y)]}_{w_2} \wedge \mu_C(z)$$

con $w_1 =$ grado de coincidencia entre A y A', y w_2 entre B y B'.

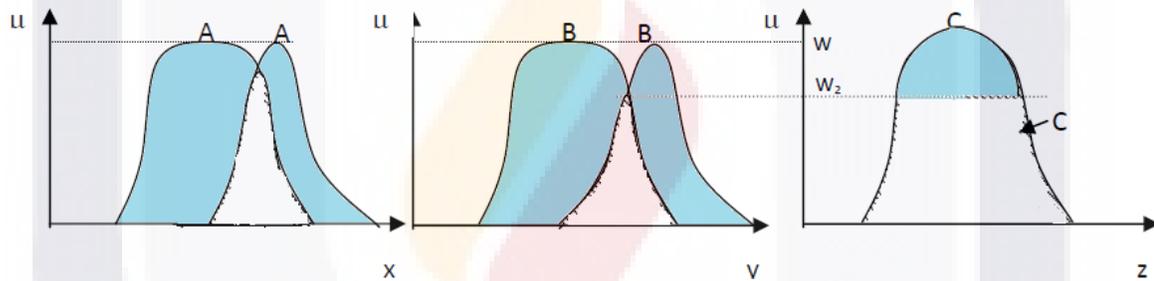


Figura 2.17 Reglas simples con dos antecedentes

En la década de los sesenta, varios investigadores crearon centros de investigación sobre lógica difusa en Japón y el Reino Unido; Assilian y Mamdani (Mamdani, 1974) entre ellos. En 1974, el Británico Ebrahim H. Mamdani, demuestra la aplicabilidad de la lógica difusa en el campo del control. Desarrolla el primer sistema de control difuso práctico, la regulación de un motor de vapor. Las aplicaciones de la lógica difusa en el control no pudieron ser implementadas con anterioridad a estos años debido a la poca capacidad de cómputo de los procesadores de esa época.

Paralelamente al desarrollo de estas aplicaciones de la lógica difusa, investigadores teóricos siguen el camino iniciado por Mamdani; Takagi y Sugeno (Takagi, 1983; Sugeno, 1988; takagi, 1985) algunos de ellos. Estos autores desarrollaron reglas borrosas a partir de

datos de entrenamiento, que mas tarde será el punto de partida para investigar la identificación de modelos “borrosos”.

La lógica difusa intenta imitar el razonamiento humano en la programación de computadoras; se utiliza cuando la complejidad del proceso en cuestión es muy alta y no existen modelos matemáticos precisos, para procesos altamente no lineales y cuando se envuelven definiciones y conocimiento no estrictamente definido (impreciso o subjetivo).

Los más populares sistemas de lógica difusa que se encuentran en la literatura se encuentran en uno de los siguientes tipos: sistemas difusos tipo Mamdani (con fuzzificador y defuzzificador) o sistemas difusos tipo Takagi-Sugeno.

2.5.2.1. Sistemas Tipo Mamdani

En un sistema difuso tipo Mamdani se distinguen los siguientes pasos:

- a) Fuzzificador: La entrada es un valor numérico que se convierte en valores "difusos" que pueden ser procesados por el mecanismo de inferencia. Estos valores difusos son los niveles de pertenencia de los valores de entrada a los diferentes conjuntos difusos en los cuales se ha dividido el universo de discurso de las diferentes variables de entrada al sistema.
- b) Mecanismo de inferencia difusa: Teniendo los diferentes niveles de pertenencia en el paso anterior, éstos deben ser procesados para generar una salida difusa. La tarea del sistema de inferencia es tomar los niveles de pertenencia y apoyado en la base de reglas generar la salida del sistema difuso.
- c) Base de Reglas Difusas: Estas reglas son del tipo IF-THEN que le permiten resolver el problema para el cual ha sido diseñado. Una regla de la base de reglas o base de conocimiento tiene dos partes, el antecedente y el consecuente, ambas están dadas por expresiones lingüísticas.
- d) Defuzzificador: Es la conversión de la salida difusa del mecanismo de inferencia a información numérica, la cual si puede ser interpretada por un sistema o mecanismo

externo. Para generar la salida numérica a partir del conjunto difuso existen varias opciones como el Centro de Gravedad y los Centros Promediados entre otros.

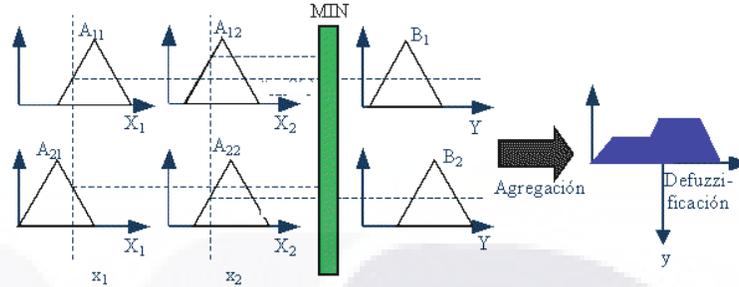


Figura 2.18. Sistema Difuso Mamdani

2.5.2.2 Sistemas Tipo Takagi-Sugeno

En 1985, dos autores, Takagi y Sugeno definieron la función de pertenencia de un conjunto difuso A como $\mu_A(x)$, para todo $x \in \mathcal{X}$. Una función de pertenencia está caracterizada por dos parámetros: 1 para un mayor grado de pertenencia, y 0 para un menor grado de pertenencia. Para dos conjuntos difusos dados A y B, el valor de verdad de la proposición “x es A and y es B” se expresa por: $\|x \text{ es A and y es B}\| = \mu_A(x) \wedge \mu_B(y)$

El modelo difuso Takagi-Sugeno (TS) consiste en un conjunto de reglas R con la siguiente estructura: $R: \text{if } x \text{ is } A_i \text{ then } y_i = a_i^T \cdot x + b_i$
 Donde $x \in \mathcal{X} \subset \mathbb{R}^n$ es el vector de entrada, A_i es un conjunto difuso (multidimensional) y $\mu_{A_i}: \mathcal{X} \rightarrow [0,1]$, $y_i \in \mathbb{R}$ es la salida de la i-ésima regla, $a_i \in \mathbb{R}^n$ es un parámetro vectorial, $b_i \in \mathbb{R}$ es un escalar, donde r es el número de reglas, y el índice $i \in [1,2,\dots,r]$

Se puede interpretar el modelo Takagi-Sugeno como un modelo cuasi-lineal con dependencia en el parámetro de entrada x.

$$y = \sum_{i=1}^r h_i(x) \cdot (a_i^T \cdot x + b_i)$$

En los sistemas difusos TS se distinguen los pasos: Fuzzificador y Mecanismo de inferencia difusa que realizan la misma función que en los sistemas Mamdani explicados anteriormente.

Base de Reglas Difusas: Las reglas de la base de conocimiento de un sistema Sugeno es diferente a las de los sistemas Mamdani pues el consecuente de estas reglas ya no es una etiqueta lingüística sino que es una función de la entrada que tenga el sistema en un momento dado. En los sistemas difusos tipo Sugeno, los valores que arrojan los consecuentes de las diferentes reglas que se han activado en un momento determinado ya son valores numéricos, por lo que no se necesita una etapa de defuzzificación. Para calcular la salida del sistema difuso se ponderan los diferentes consecuentes teniendo en cuenta el valor que se activó el antecedente de cada una de las reglas, como se puede apreciar en la Figura 2.19.

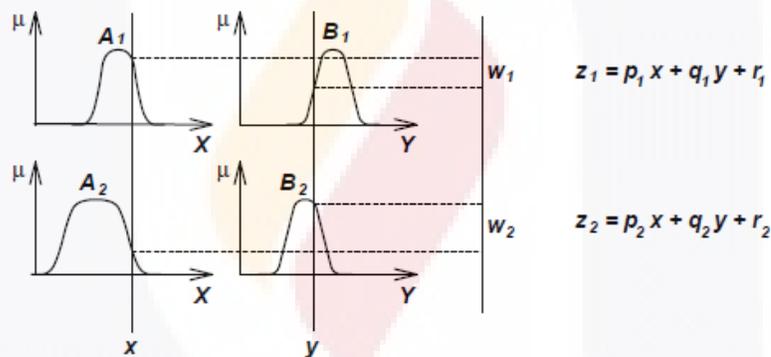


Figura 2.19 Modelo difuso de Sugeno (Roger, 1997)

El modelo difuso de Sugeno conocido como TKS fue propuesto por Takagi, Sugeno y Kang, con la finalidad de generar un sistema de reglas difusas a partir de un conjunto de datos de entrada y salida. (Takagi, 1985; Sugeno, 1988).

2.5.2.3 Métodos de defuzzificación

Para obtener, a partir del conjunto difuso de salida que resulta de la agregación de todas las reglas, un resultado escalar, se aplican métodos matemáticos, como por ejemplo: el método del máximo, del centroide y de la altura.

Método del máximo: Se elige como valor para la variable de salida aquel para el cual la función característica del conjunto difuso de salida es máxima.

Método del centroide: Utiliza como salida del sistema el centro de gravedad de la función característica de salida. Es el más utilizado en ingeniería.

Método de altura: Se calcula para cada regla el centro de gravedad del conjunto difuso de salida, y después se calcula la salida del sistema como la media ponderada:

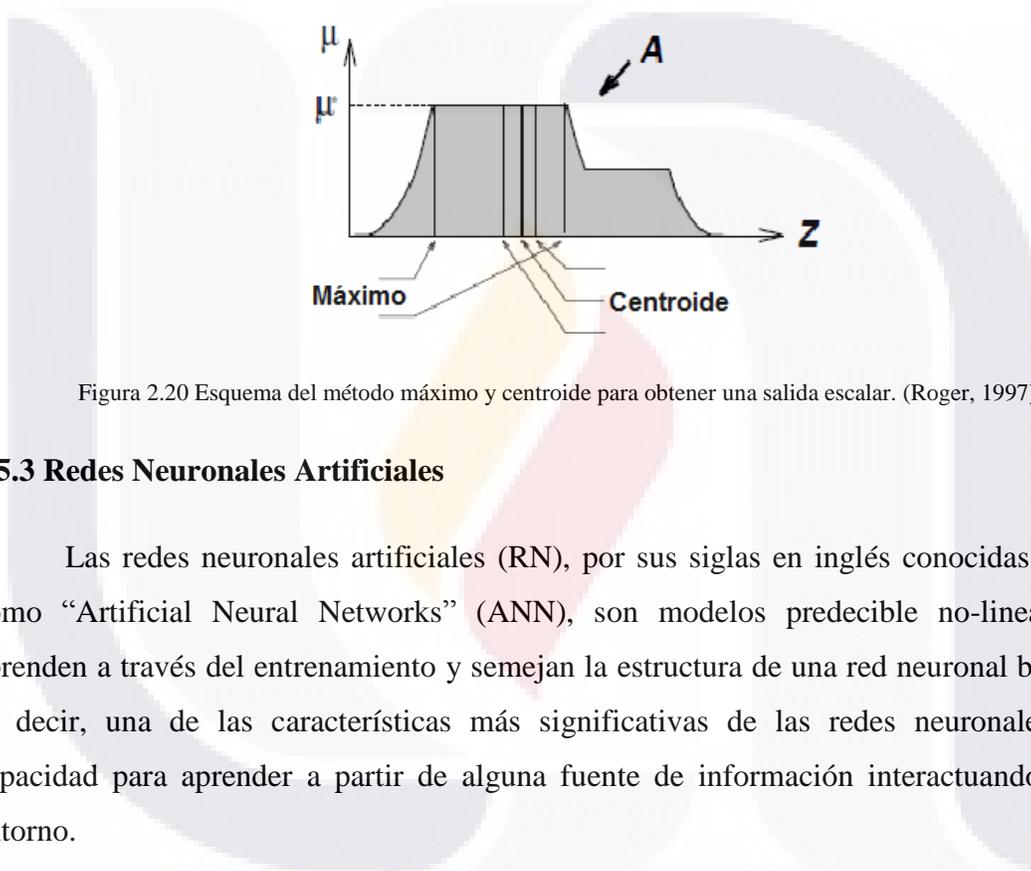


Figura 2.20 Esquema del método máximo y centroide para obtener una salida escalar. (Roger, 1997)

2.5.3 Redes Neuronales Artificiales

Las redes neuronales artificiales (RN), por sus siglas en inglés conocidas también como “Artificial Neural Networks” (ANN), son modelos predecible no-lineales que aprenden a través del entrenamiento y semejan la estructura de una red neuronal biológica, es decir, una de las características más significativas de las redes neuronales es su capacidad para aprender a partir de alguna fuente de información interactuando con su entorno.

Las Redes Neuronales permiten la solución de problemas complejos, utilizando procedimientos que no se sustentan en una secuencia de pasos, sino que inspirados en el cerebro humano, utilizan una combinación de elementos simples de proceso (neuronas) interconectados, que operan en forma paralela para resolver los problemas. El conocimiento de una red neuronal no se almacena en instrucciones, el poder de la red está en su topología y en los valores de las conexiones (pesos) entre neuronas. Las redes neuronales artificiales son una teoría que aún está en proceso de desarrollo, su verdadera potencialidad no se ha

alcanzado todavía; aunque los investigadores han desarrollado potentes algoritmos de aprendizaje de gran valor práctico (Boza, 1995). Una aplicación es en el área de química en la optimización de procesos químicos y analizar el efecto de las características topológicas en los mismos. Recientemente se ha utilizado esta meta heurística en el estudio de procesos biológicos, tal es el caso de estudios sobre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros. En este documento se aborda este tema de forma profunda en secciones posteriores.

Las redes neuronales artificiales (RN) son un paradigma de aprendizaje y procesamiento automático inspirado en la forma en que funciona el sistema nervioso biológico, formados por un conjunto de unidades llamadas "neuronas" o "nodos" conectadas unas con otras. Estas conexiones tienen una gran semejanza con las dendritas y los axones. Se trata de un sistema de interconexión de neuronas en una red que colabora para producir un estímulo de salida. El objetivo de la red neuronal artificial es conseguir que un computador, un circuito integrado, un ordenador o un conjunto de válvulas, den respuestas similares a las propiedades observadas en los sistemas neuronales biológicos a través de modelos matemáticos recreados mediante mecanismos artificiales. El Primer modelo de red neuronal artificial fue propuesto en 1943 por McCulloch y Pitts (McCulloch, 1943), el cual describe el tipo de operaciones que realizan las neuronas biológicas, al menos según los conocimientos que se tenían de las neuronas en aquellos días. El modelo de McCulloch-Pitts es un modelo binario, y cada neurona tiene un escalón o umbral prefijado y sirvió de ejemplo para los modelos posteriores de Jhon Von Neumann, Marvin Minsky, Frank Rosenblatt, y muchos otros.

En 1949, Donald Hebb (Hebb, 1949) publicó sus descubrimientos acerca de las leyes de aprendizaje, donde maneja el término de excitación neuronal que se refiere al aumento en los pesos entre las neuronas interconectadas. Esto permitió que las computadoras "aprehendieran". En 1958 Rosenblatt (Rosenblatt, 1962) al basarse en la regla de aprendizaje de Hebb y de los modelos de neuronas biológicas de McCulloch y Pitts al utilizar la probabilidad en lugar de la lógica simbólica, introdujo el término perceptrón.

En 1985, Bernard Widrow (Widrow, 1985) produjo la primera red neuronal comercial llamado ADELIN (ADaptive LINear Element) al presentar un procesador de señales adaptativo sustentado en procesos matemáticos.

2.5.3.1 El Perceptrón simple

Si se tiene una función f de R^n en $\{-1,1\}$, que aplica un patrón de entrada $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)^T \in R^n$ en la salida deseada $z \in \{-1,1\}$, es decir, $f(\mathbf{x}) = z$. La información sobre dicha función viene dada por p pares de patrones de entrenamiento $\{\mathbf{x}_1, z_1\}$, $\{\mathbf{x}_2, z_2\}, \dots, \{\mathbf{x}_p, z_p\}$, donde $\mathbf{x}_i \in R^n$ y $f(\mathbf{x}_i) = z_i \in \{-1,1\}$, $i=1,2, \dots, p$.

Dicha función realiza una partición en el espacio R^n de patrones de entrada; por una parte estarían los patrones con salida +1 y por otra parte los patrones con salida -1. Por lo tanto, diremos que la función f clasifica a los patrones de entrada en dos clases. Ejemplos de funciones f de este tipo son la función lógica OR o la función par. Considerando lo anterior se utiliza una unidad de proceso bipolar que es una función matemática con dominio el conjunto n -dimensional $\{-1,1\}_n$ y rango el conjunto $\{-1,1\}$, definida por la siguiente expresión:

$$f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \begin{cases} 1 & \text{si } w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n \geq \theta \\ -1 & \text{si } w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n < \theta \end{cases}$$

donde los parámetros w_1, w_2, \dots, w_n , se llaman pesos sinápticos y son los pesos con los que se ponderan los valores de entrada x_1, x_2, \dots, x_n , o argumentos de la función; la suma ponderada $u = w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n$, se llama potencial sináptico y el parámetro θ se llama umbral o sesgo. También se puede expresar la función f mediante la función signo, es decir, $f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \text{sgn}(u - \theta)$, siendo la función signo,

$$\text{sgn}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ -1 & x < 0 \end{cases}$$

en este caso la función de transferencia es la función signo.

En la siguiente figura se representa una neurona "artificial", que intenta modelar el comportamiento de la neurona biológica. Aquí el cuerpo de la neurona se representa como

un sumador lineal de los estímulos externos z_j , seguida de una función no lineal $y_j = f(z_j)$. La función $f(z_j)$ es llamada la función de activación, y es la función que utiliza la suma de estímulos para determinar la actividad de salida de la neurona.

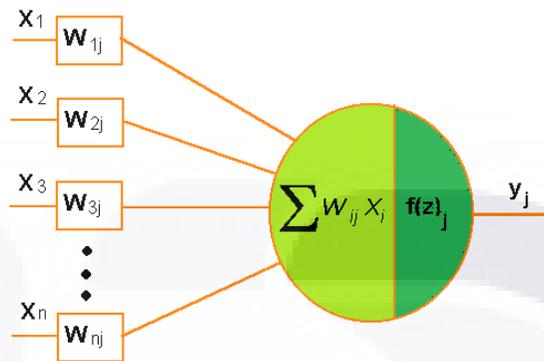


Figura 2.21 Modelo de perceptrón de McCulloch-Pitts.

Puede observarse que “n” señales de entrada son representadas por las variables x_1, x_2, \dots, x_n las cuales están asociadas a pesos que son representados por las variables w_{ji} los cuales determinan el nivel de influencia de la neurona j para la neurona i .

Análogamente, se define una unidad de proceso binaria como una función matemática con dominio el conjunto n -dimensional $\{0,1\}^n$ y rango el conjunto $\{0,1\}$, definida por

la siguiente expresión:

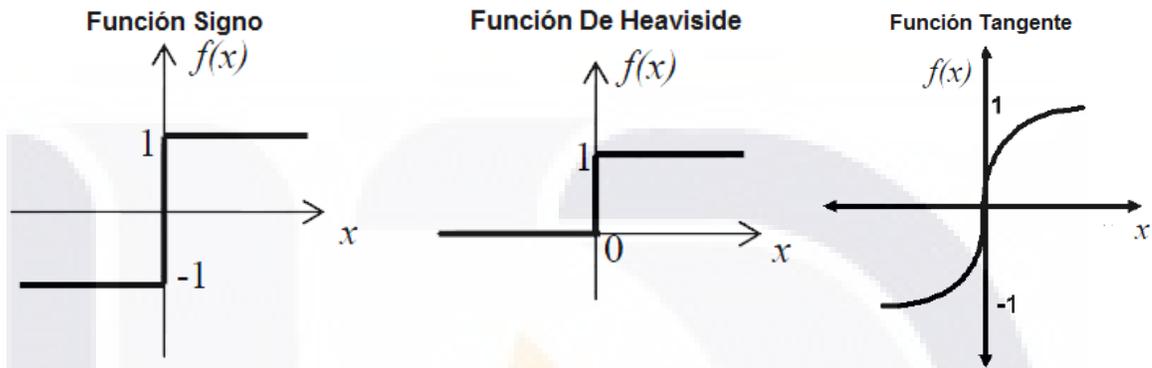
$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \begin{cases} 1 & \text{si } w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n \geq \theta \\ 0 & \text{si } w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n < \theta \end{cases}$$

Cuando la salida de la unidad de proceso es igual a 1 se dice que dicha unidad de proceso está activada o encendida y presenta el estado 1, mientras que si su salida es igual a cero se dice que está desactivada o apagada, presentando el estado 0. Entonces, existen dos esta de procesamiento para cada neurona: suma y activación.

En la primera etapa, las señales de entrada x_j y los pesos w_{ij} son combinadas por la

expresión: $y_i = \sum_{j=1}^N w_{ij}x_j$ donde y_i es llamado de estado interno de la neurona i . En la segunda etapa, la salida de la neurona es generada a través de la aplicación de una función

llamada función de activación. $x_i = f(y_i)$ donde la salida de la neurona es representado por x_i y f corresponde a la función de activación aplicada al estado interno de la neurona, que tiene como objetivo limitar el nivel de activación de entre $[-1, 1]$ o $[0, 1]$, en el caso de x_i sea un valor continuo y si x_i es discreto entonces puede ser: $\{-1, 1\}$ o $\{0, 1\}$.



Función 2.22 Funciones de transferencia o activación más frecuentes.

Existen varios tipos de función de activación. La figura 2.22 muestra tres funciones de activación más frecuentemente usadas: la función de grado o signo, la función De Heaviside y la tangente hiperbólica.

Este modelo se conoce como perceptrón de McCulloch-Pitts, y es la base de la mayor parte de las arquitecturas de las redes neuronales artificiales que se interconectan entre sí. Las neuronas emplean funciones de activación diferentes según la aplicación, algunas veces son funciones lineales, otras funciones sigmoideas, y otras funciones de umbral de disparo. La eficiencia sináptica se representa por factores de peso de interconexión w_{ij} , desde la neurona i , hasta la neurona j .

La determinación de los pesos sinápticos y del umbral se sigue en la red, que es un proceso adaptativo que consiste en comenzar con unos valores iniciales aleatorios e ir modificándolos iterativamente cuando la salida de la unidad no coincide con la salida deseada. La regla que se sigue para modificar los pesos sinápticos se conoce con el nombre de regla de aprendizaje del Perceptrón simple y viene dada por la expresión:

$$w_j(k+1) = w_j(k) + \Delta w_j(k), \quad k = 1, 2, \dots \quad \text{siendo:} \quad \Delta w_j(k) = \eta(k)[z(k) - y(k)]x_j(k)$$

Lo anterior indica que la variación del peso w_j es proporcional al producto del error $z(k) - y(k)$ por la componente j -ésima del patrón de entrada que se ha introducido en la iteración k , es decir, $x(k)_j$. La constante de proporcionalidad $\eta(k)$ es un parámetro positivo llamado tasa de aprendizaje puesto que cuanto mayor es más se modifica el peso sináptico y viceversa. Es decir, es el parámetro que controla el proceso de aprendizaje. Cuando es muy pequeño la red aprende poco a poco. Cuando se toma constante en todas las iteraciones, $\eta(k) = \eta > 0$ tendremos la regla de adaptación con incremento fijo.

Los pesos pueden ser positivos, proceso llamado de excitación, o negativos proceso llamado de inhibición. Los pesos junto con las funciones $f(z)$ dictan la operación de la red neuronal. Normalmente las funciones no se modifican de tal forma que el estado de la red neuronal depende del valor de los factores de peso (sinapsis) que se aplica a los estímulos de la neurona. En un perceptrón cada entrada es multiplicada por el peso W correspondiente, y los resultados son sumados, siendo evaluados contra el valor de umbral, si el resultado es mayor al mismo, el perceptrón se activa.

El algoritmo de aprendizaje del Perceptrón con entrenamiento individualizado contiene los siguientes pasos:

1.- Inicializar los pesos sinápticos con números aleatorios del intervalo $[-1,1]$. Ir al paso siguiente con $k = 1$.

$$y(k) = \text{sgn} \left(\sum_{j=1}^{n+1} w_j x_j(k) \right)$$

2.- Iteración k -ésima: Calcular

3.- Corrección de los pesos sinápticos: Si $z(k) \neq y(k)$ modificar los pesos sinápticos según la expresión: $w_j(k+1) = w_j(k) + [z(k) - y(k)]x_j(k), j = 1, 2, \dots, n+1$

4.- Paro: Si no se han modificado los pesos en las últimas p iteraciones, es decir,

$w_j(r) = w_j(k), j = 1, 2, \dots, n+1, r = k+1, \dots, k+p$, detener el proceso. La red se ha estabilizado, en caso contrario, ir al paso 2 con $k=k+1$.

Se dice que dos conjuntos de puntos A y B son linealmente separables en un espacio n -dimensional si existen $n+1$ números reales $w_1, w_2, \dots, w_n, \theta$ de manera que cada punto

$(x_1, x_2, \dots, x_n) \in A$ satisface $\sum_{i=1}^n w_i x_i \geq \theta$ y cada punto $(x_1, x_2, \dots, x_n) \in B$ satisface $\sum_{i=1}^n w_i x_i < \theta$

Si el conjunto de patrones de entrenamiento, $\{\mathbf{x}_1, z_1\}, \{\mathbf{x}_2, z_2\}, \dots, \{\mathbf{x}_p, z_p\}$, es linealmente separable entonces el perceptrón simple encuentra una solución en un número finito de iteraciones, es decir, consigue que la salida de la red coincida con la salida deseada para cada uno de los patrones de entrenamiento.

Si los patrones son linealmente separables existirán unos valores w_1, w_2, \dots, w_{n+1} tales que

$$\sum_{j=1}^n w_j^* x_j > w_{n+1}^* \quad \text{para los patrones de la clase 1 y}$$

$$\sum_{j=1}^n w_j^* x_j < w_{n+1}^* \quad \text{para los patrones de la clase 2. Obsérvese que } w_{n+1} \text{ es el umbral } \theta .$$

Las redes neuronales artificiales son modelos estadísticos de sistemas ya sea de un mundo simulado o ficticio, los cuales son construidos ajustando un conjunto de parámetros; Estos parámetros, conocidos como pesos, describen formas de trazar un conjunto de valores dados conocidos como entradas hacia su conjunto de valores, que generalmente son llamados “salidas”. Las redes neuronales son capaces de aprender dependencias temporales en un sistema.

En los apartados siguientes se describirán los aspectos más característicos de las estructuras de las redes neuronales artificiales que son la estructura de conexión, el tamaño de la red y la elección entre ACON (All Class in One Network. Todas las Clases en Una Red) y OCON (One Class in One Network. Una Clase en Una Red).

2.5.3.2 El Perceptrón multicapas

El perceptrón multicapas es una ampliación y generalización del perceptrón de dos capas. Conserva la estructura del perceptrón, pero posee la ventaja de tener múltiples capas ocultas, que permiten establecer regiones de decisión mucho más complejas, aprender mayor número de clases y solucionar problemas que el perceptrón no puede resolver (Lippman, 1987). Las capacidades del Perceptrón Multicapa con una única neurona de

salida se pueden observar en la tabla siguiente (Lippman, 1987), donde se ve en general, que no se requieren más de cuatro capas para resolver un problema dado, ya que es suficiente para generar regiones de decisión arbitrariamente complejas. En ciertos problemas, puede mejorarse el aprendizaje mediante la variación de la cantidad de neuronas ocultas por capas y/o con la extensión de la función de activación. Además, un número excesivo de neuronas en alguna capa oculta, puede generar ruido en el aprendizaje y un número adecuado, aunque sea redundante, permite que la red posea mayor tolerancia a fallos.

Tabla 5 : Posibles regiones de decisión con diferentes números de capas y de neuronas con una red neuronal tipo perceptrón multicapa (Lippman, 1987).

ESTRUCTURA	REGIONES DE DECISION	PROBLEMA DEL XOR	CLASES CON REGIONES MEZCLADAS	FORMAS DE REGIONES MAS GENERALES
2 CAPAS	MEDIO PLANO LIMITADO POR UN HIPERPLANO			
3 CAPAS	REGIONES CERRADAS O CONVEXAS			
4 CAPAS	ARBITRARIA COMPLEJIDAD LIMITADA POR EL NUMERO DE NEURONAS			

Rumelhart, Hinton y Williams en 1986 (Rumelhart et al., 1986), basándose en los trabajos de investigadores como Werbos y Parker (Werbos, 1974; Parker, 1982), desarrollaron un tipo de red neuronal basada en la arquitectura de un Perceptron Multicapa pero con una nueva regla de aprendizaje denominada retropropagación o propagación del error hacia atrás, basado en una generalización de la “regla delta” (Cáceres, 2002) ampliando el rango de aplicaciones que las redes neuronales de este tipo poseían hasta entonces.

Aprendizaje (Regla delta generalizada)

La regla delta propuesta por Widrow (Widrow et al., 1960), fue generalizada a redes con conexiones hacia adelante, con múltiples capas, cuyas neuronas poseen funciones de

transferencia continuas, no decrecientes y derivables, dando forma a lo que se conoce como “regla delta generalizada” o algoritmo de retro propagación del error. Esta red posee un mecanismo de aprendizaje “offline” de tipo supervisado y por corrección de error. Relaciona los patrones de entrada con la de salida, en forma hetero-asociativa y es considerada como una red análoga, ya que puede operar con patrones con valores continuos tanto en la entrada, como en la salida.

La regla de aprendizaje del Perceptrón de Rosenblatt y el algoritmo LMS de Widrow y Hoff, mencionados anteriormente fueron diseñados para entrenar redes de una sola capa.

Estas redes solo pueden resolver problemas linealmente separables. Una red multicapa, en cambio, puede solucionar este problema. El algoritmo de retro propagación (Backpropagation) es un algoritmo de aprendizaje supervisado para redes multicapa que utiliza un ciclo de propagación adaptativo de dos fases (Cáceres, 2002):

1.- Propagación hacia delante: Se aplica un patrón a la entrada de la red como estímulo y se propaga desde la primera capa a través de las capas superiores de la red, hasta generar una salida. Obtenido el vector de salida, este es comparado con el deseado, mediante los errores cuadráticos cometidos.

2.- Propagación hacia atrás: También llamada fase de retro propagación del error, y debido a que se desconoce la salida deseada para las neuronas pertenecientes a capas ocultas, el error es propagado desde la capa de salida hacia las capas ocultas modificando los pesos asociados a dichas conexiones hasta llegar a la capa de entrada. Así, se habrán modificado todos los pesos de la red, ajustándose al patrón que recientemente le fue presentado. Si se realiza nuevamente una propagación hacia adelante con el mismo patrón, la red habrá disminuido su error en la salida, en comparación con el error cometido en la propagación anterior. Sin embargo las neuronas de la capa oculta solo reciben una fracción de la señal total del error, basándose aproximadamente en la contribución relativa que haya aportado cada neurona a la salida original.

La importancia de este proceso consiste en que, a medida que se entrena la red, las neuronas de las capas intermedias se organizan a sí mismas de tal modo que las distintas

neuronas aprenden a reconocer distintas características del espacio total de entrada. Después del entrenamiento, cuando se les presente un patrón arbitrario de entrada que contenga ruido o que esté incompleto, las neuronas de la capa oculta de la red responderán con una salida activa si la nueva entrada contiene un patrón que se asemeje a aquella característica que las neuronas individuales hayan aprendido a reconocer durante su entrenamiento. Y a la inversa, las unidades de las capas ocultas tienen una tendencia a inhibir su salida si el patrón de entrada no contiene la característica para reconocer, para la cual han sido entrenadas.

En general, en una red de retro-propagación, existe una capa de entrada con (n)-neuronas, al menos una capa oculta con (l)-neuronas y una capa de salida con (m)-neuronas. No posee conexiones hacia atrás entre neuronas de diferentes capas, ni laterales en neuronas de una misma capa. Las neuronas i-ésimas de entrada se denominan I_i , las neuronas j-ésimas ocultas y las neuronas k-ésimas de salida O_k . Las componentes de entrada a las neuronas I_i

Se denominan x_i y las componentes de salida a las neuronas O_k se denominan y_k los pesos asociados entre las neuronas I_i y H_j se denominan w_{ij} y los asociados entre las neuronas H_j y las O_k se denominan v_{jk} .

Una característica importante del algoritmo de retro-propagación, es la representación interna del conocimiento que pueden realizar, gracias a las capas ocultas que lo permiten, consiguiendo cualquier correspondencia entre los patrones de entrada y la de salida (Ver Tabla anterior). El funcionamiento de la red de retro-propagación se basa en el método de propagación hacia adelante extendido para múltiples neuronas, donde cada neurona de capas inferiores irá procesando los patrones de entrada, generando nueva información de salida que servirá nuevamente de entrada a neuronas que estén en capas superiores. Así, la información se irá propagando en forma sucesiva desde la entrada hacia la salida de la red. Una diferencia con respecto al Perceptrón o Perceptrón Multicapa es la función de transferencia que aplican las neuronas, siendo ésta de tipo sigmoïdal, tangencial o gaussiana, según el problema en cuestión que se quiera resolver.

Los pesos asociados a las conexiones entre neuronas de diferentes capas, pueden

representarse vectorialmente mediante matrices. En una red que posee n-capas, se requerirán (n-1)- matrices para representar sus pesos. En el caso particular que se analizará, por ser el más aplicado y utilizado, se requerirán tres capas: entrada (I), oculta (H) y salida (O). Por lo que se necesitarán dos matrices para representar todos los pesos de la red.

Enseguida se presentan dos matrices, la primera representará los pesos asociados a las conexiones entre la capa de entrada y la capa oculta, en cualquier instante t y la segunda matriz, representa los pesos de las conexiones entre la capa oculta y la de salida, en cualquier instante t (Cáceres, 2002).

$$W^{HI}(t) = (w_{ji}^{HI}(t)) = \begin{pmatrix} w_{11}^{HI}(t) \cdots w_{1i}^{HI}(t) \cdots w_{1n}^{HI}(t) \\ \vdots \\ w_{j1}^{HI}(t) \cdots w_{ji}^{HI}(t) \cdots w_{jn}^{HI}(t) \\ \vdots \\ w_{m1}^{HI}(t) \cdots w_{mi}^{HI}(t) \cdots w_{mn}^{HI}(t) \end{pmatrix} \quad W^{OH}(t) = (w_{kj}^{OH}(t)) = \begin{pmatrix} w_{11}^{OH}(t) \cdots w_{1j}^{OH}(t) \cdots w_{1l}^{OH}(t) \\ \vdots \\ w_{k1}^{OH}(t) \cdots w_{kj}^{OH}(t) \cdots w_{kl}^{OH}(t) \\ \vdots \\ w_{m1}^{OH}(t) \cdots w_{mj}^{OH}(t) \cdots w_{ml}^{OH}(t) \end{pmatrix}$$

Matriz 1 Matriz 2

Donde $w_{kj}^{OH}(t)$: peso asociado a la conexión entre una neurona N_y de la capa Q con otra neurona N_x de la capa R en un instante t y donde R es una capa inferior a Q.

Matemáticamente, el algoritmo de aprendizaje para una red neuronal de Retro-propagación puede expresarse de la siguiente manera (Freeman et al, 1993).

Iniciar todos los pesos de la red en el instante (t=0) con valores pequeños aleatorios comprendidos en el intervalo continuo [-0.5; 0.5]. Presentar un nuevo p-esimo patrón

vectorial de entrada en el instante t.

$$X_p(t) = \begin{pmatrix} x_{p_1}(t) \\ \vdots \\ x_{p_n}(t) \end{pmatrix}$$

- a) Especificar la salida vectorial deseada para el nuevo p-esimo patrón, en el instante t.

$$D_p^o(t) = \begin{pmatrix} d_{p_1}^o(t) \\ \vdots \\ d_{p_m}^o(t) \end{pmatrix}$$

- b) Obtener la salida vectorial de la red para el p-esimo patrón en el instante t

$$Y_p^o(t) = \begin{pmatrix} y_{p_1}^o(t) \\ \vdots \\ y_{p_m}^o(t) \end{pmatrix}$$

Para obtener la salida es necesario conocer las salidas de cada una de las neuronas pertenecientes a cada capa de la red, lo que se logra realizando la propagación hacia adelante. Para ello, se deberá hacer lo siguiente:

Se calcula la función de activación para cada neurona N_j perteneciente a la capa oculta (H), con la información procedente de las neuronas N_i pertenecientes a la capa de entrada (I) y con los pesos asociados entre dichas capas. Además, se debe utilizar el umbral de activación para todas las neuronas pertenecientes a todas las capas de la red, salvo la de entrada.

El umbral de activación vectorial de la capa oculta, para un p-esimo patrón de entrenamiento en el instante t, se puede ver en la siguiente ecuación (Cáceres, 2002):

$$\theta_p^H(t) = \begin{pmatrix} \theta_{p_1}^H(t) \\ \vdots \\ \theta_{p_l}^H(t) \end{pmatrix}$$

La función de activación de la capa oculta, para un p-esimo patrón de entrenamiento en el instante t, se puede calcular vectorialmente y en forma escalar, como se puede ver en las siguientes ecuaciones siguientes respectivamente:

$$NET_p^H(t) = W^{HI}(t) X_p(t) - \theta_p^H(t) = \begin{pmatrix} net_{p_1}^H(t) \\ \vdots \\ net_{p_l}^H(t) \end{pmatrix}$$

$$net_{p_j}^H(t) = \sum_{i=1}^n w_{ji}^{HI}(t) x_{p_i}(t) - \theta_{p_j}^H(t)$$

Aplicando la idea de la neurona ficticia, la expresión escalar de la ecuación anterior puede ser reducida a la ecuación siguiente:

$$net_{p_j}^H(t) = \sum_{i=0}^n w_{ji}^{HI}(t) x_{p_i}(t)$$

donde: y

Enseguida se calculan vectorialmente las salidas de cada una de las neuronas de la capa oculta para el p-esimo patrón en el instante t. Y se pueden representar vectorialmente y en forma escalar como lo muestran las siguientes ecuaciones (Cáceres, 2002):

$$Y_p^H(t) = f^H(NEt_p^H(t))$$

$$y_{p_j}^H(t) = f_j^H(net_{p_j}^H(t)); \forall j \in [1, L] \subset N$$

: Función de transferencia escalar de la neurona N_j perteneciente a la capa oculta.

: Función de transferencia vectorial de todas las neuronas pertenecientes a la capa oculta.

Calcular la función de activación para cada neurona N_k perteneciente a la capa de salida (O), con información procedente de las neuronas N_j pertenecientes a la capa culta (H) y con los pesos asociados entre dichas capas.

El umbral de activación vectorial de la capa de salida, para un p-esimo patrón de entrenamiento en el instante t, se representa por la ecuación siguiente:

$$\theta_p^O(t) = \begin{pmatrix} \theta_{p_1}^O(t) \\ \vdots \\ \theta_{p_m}^O(t) \end{pmatrix}$$

La función de activación de la capa de salida, para un p-esimo patrón de entrenamiento en el instante t, se puede calcular vectorialmente y en forma escalar, también.

$$NEt_p^O(t) = W^{OH}(t)Y_p^H(t) - \theta_p^O(t) = \begin{pmatrix} net_{p_1}^O(t) \\ \vdots \\ net_{p_m}^O(t) \end{pmatrix}$$

$$net_{p_k}^O(t) = \sum_{j=1}^l w_{kj}^{OH}(t)y_{p_j}^H(t) - \theta_{p_k}^O(t)$$

Aplicando la idea de la neurona ficticia, la expresión escalar de la ecuación anterior puede ser reducida a la ecuación siguiente:

$$net_{p_k}^O(t) = \sum_{j=0}^l w_{kj}^{OH}(t) y_{p_j}^H(t)$$

donde: y

Se procede a calcular vectorialmente las salidas de cada una de las neuronas de la capa de salida para el p-esimo patrón en el instante t. Lo que se puede escribir vectorialmente y en forma escalar en las ecuaciones siguientes (Cáceres, 2002):

$$Y_p^O(t) = f^O(NET_p^O(t))$$

$$y_{p_k}^O(t) = f_k^O(net_{p_k}^O(t)); \forall k \in [1, m] \subset N$$

: Función de transferencia de la neurona N_k perteneciente a la capa de salida.

: Función de transferencia vectorial de todas las neuronas pertenecientes a la capa de salida.

Procedimiento para a calcular los términos de error () para todas las neuronas pertenecientes a todas las capas de la red, salvo la de entrada, propagando el error hacia atrás (Cáceres, 2002).

Cálculo escalar del error en neuronas de salida:

$$\delta_{p_k}^O(t) = [d_{p_k}^O(t) - y_{p_k}^O(t)] \frac{\partial}{\partial net_{p_k}^O(t)} [f_k^O(net_{p_k}^O(t))]; \forall k \in [1, m] \subset N$$

Cálculo escalar del error en neuronas ocultas:

$$\delta_{p_j}^H(t) = \left(\sum_{k=1}^m \delta_{p_k}^O(t) w_{kj}^{OH}(t) \right) \frac{\partial}{\partial net_{p_j}^H} [f_j^H(net_{p_j}^H)]; \forall j \in [1, l] \subset N$$

Actualización de los pesos de la red, corrigiendo hacia atrás desde la salida hacia la entrada. Corregir los pesos asociados a las conexiones entre la capa de salida y la oculta

$$w_{kj}^{OH}(t+1) = w_{kj}^{OH}(t) + \Delta w_{kj}^{OH}(t+1)$$

$$\Delta w_{kj}^{OH}(t+1) = \eta \delta_{p_k}^O(t) y_{p_j}^H(t) + \beta [w_{kj}^{OH}(t) - w_{kj}^{OH}(t-1)]$$

donde: Tasa de aprendizaje (Learning Rate) (η)

β : Momento (Momentum)

Por lo tanto:
$$w_{kj}^{OH}(t+1) = w_{kj}^{OH}(t) + \eta \delta_{p_k}^O(t) y_{p_j}^H(t) + \beta [w_{kj}^{OH}(t) - w_{kj}^{OH}(t-1)]$$

Corregir los pesos asociados a las conexiones entre la capa oculta y la de entrada

$$w_{ji}^{HI}(t+1) = w_{ji}^{HI}(t) + \Delta w_{ji}^{HI}(t+1)$$

$$\Delta w_{ji}^{HI}(t+1) = \eta \delta_{p_j}^H(t) x_{p_i}(t) + \beta [w_{ji}^{HI}(t) - w_{ji}^{HI}(t-1)]$$

Por lo tanto:

$$w_{ji}^{HI}(t+1) = w_{ji}^{HI}(t) + \eta \delta_{p_j}^H(t) x_{p_i}(t) + \beta [w_{ji}^{HI}(t) - w_{ji}^{HI}(t-1)]$$

El proceso de aprendizaje se repite para todos los patrones hasta que el término de error total sea considerado aceptablemente pequeño, según las formulas siguientes:

Sea:
$$\varepsilon_{p_k}^O(t) = d_{p_k}^O(t) - y_{p_k}^O(t)$$

Entonces:
$$e_p(t) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^m [\varepsilon_{p_k}^O(t)]^2 \text{ y } e_T(t) = \frac{1}{p} \sum_{s=1}^p e_s(t)$$

Por lo tanto:
$$e_T(t) = \frac{1}{2p} \sum_{s=1}^p \sum_{k=1}^m [d_{sk}^O(t) - y_{sk}^O(t)]^2$$

2.5.3.3 Estructuras de las Redes Neuronales Artificiales

Al igual que los sistemas biológicos, una red neuronal artificial se compone de nodos, que generalmente son llamadas neuronas, y cada nodo recibe una serie de entradas a través de interconexiones y salidas.

La definición de arquitectura es un punto importante en el modelaje de una red neuronal, porque ésta restringe el tipo de problema que puede ser abordado. Una red puede estar formada por una capa o múltiples capas, las que pueden ser clasificadas en tres grupos: capa de entrada, capas intermediarias u ocultas y capas de salida. En otras palabras, el diseño de una red neuronal consiste generalmente en colocar las neuronas en varias capas; decidir el tipo de conexiones entre las neuronas para las diferentes capas, así como entre las neuronas dentro de una capa; decidir la manera en que una neurona recibe entradas y produce salidas (resultados) y; determinar la fuerza de conexión dentro de la red permitiendo a la red aprender los valores apropiados de pesos de conexión usando un juego de datos de entrenamiento. Una red neuronal se determina por la neurona y la matriz de pesos. El comportamiento de la red depende en gran medida del comportamiento de la matriz de pesos. De acuerdo a la emisión de la salida, ésta viene dada por tres funciones:

- a) Una función de propagación (excitación), consiste en la suma de cada entrada multiplicada por el peso de su interconexión (valor total). El peso puede ser positivo (conexión excitatoria) o negativo (conexión inhibitoria).
- b) Una función de activación, siendo en este caso la salida la misma función de propagación.
- c) Una función de transferencia, que se aplica al valor devuelto que acota la salida del nodo o neurona por la función de activación. Las funciones comunes son sigmoidea (valores en el intervalo $[0,1]$) y la tangente hiperbólica (valores en el intervalo $[-1,1]$).

Las redes neuronales son útiles para resolver problemas para los cuales no hay reglas conocidas, pero que existen un conjunto de ejemplos de los cuales hay soluciones disponibles las cuales pueden ser aprehendidas, por lo que se requiere de datos de entrenamiento. Las características principales de las RN son, entre otras, las siguientes:

- 1.- Auto Organización y Adaptatividad: utilizan algoritmos de aprendizaje adaptativo y auto organización, por lo que ofrecen posibilidades de procesado robusto y adaptativo.
- 2.- Procesado No Lineal: aumenta la capacidad de la red de aproximar, clasificar y su inmunidad frente al ruido.

3.- Procesado paralelo: normalmente se usa un gran número de células de procesado por el alto nivel de inter conectividad.

2.5.3.4 Clasificación de Redes Neuronales Artificiales

Se conocen tres formas de clasificación de redes neuronales, de acuerdo al tipo de aprendizaje, al tipo de aplicación y la arquitectura de la conexión.

Tipos de aprendizaje

- Redes neuronales con aprendizaje supervisado
- Redes neuronales con aprendizaje no supervisado
- Redes neuronales con aprendizaje híbrido
- Redes neuronales con aprendizaje reforzado y competitivo

Tipos de aplicación

- Redes neuronales aproximadoras de funciones
- Redes neuronales asociativas
- Redes neuronales clasificadoras

Tipos de arquitectura

- Redes neuronales monocapa
- Redes neuronales multicapa
- Redes neuronales realimentadas

Enfocando este trabajo en la existencia de las fases en el uso de las redes neuronales que se conocen de acuerdo al tipo de aprendizaje, y que se describirán a continuación, se describe con más detalle el tipo de clasificación considerada más útil.

1.- Fase de aprendizaje o entrenamiento: En esta fase se usa un conjunto de datos o patrones de entrenamiento para determinar los pesos, que son los parámetros de diseño que definen el modelo neuronal. Estos parámetros de diseño de la red neuronal se obtienen a partir de unos patrones representativos de las entradas que se denominan patrones de entrenamiento. Los resultados pueden ser tanto calculados de una vez como adaptados

iterativamente, según el tipo de red neuronal, y en función de las ecuaciones dinámicas de prueba. Una vez calculados los pesos de la red, los valores de las neuronas de la última capa, se comparan con la salida deseada para determinar la validez del diseño.

2.- Fase de prueba: llamada también funcionamiento directo, en la que se procesan los patrones de prueba que constituyen la entrada habitual de la red, analizándose de esta manera las prestaciones definitivas de la red. Una característica de las redes neuronales es su capacidad de aprender. Aprenden por la actualización o cambio de los pesos sinápticos que caracterizan a las conexiones. Los pesos son adaptados de acuerdo a la información extraída de los patrones de entrenamiento nuevos que se van presentando. Normalmente, los pesos óptimos se obtienen optimizando (minimizando o maximizando) alguna "función de objetivo". Por ejemplo, un criterio popular en el entrenamiento supervisado es minimizar el "error cuadrático medio" entre el valor conocido y el valor de salida actual. Considerando los algoritmos de entrenamiento las redes neuronales artificiales se describen dos subtipos:

A.- Las redes de entrenamiento no supervisado: El conjunto de datos de entrenamiento consiste sólo en los patrones de entrada. Por lo tanto, la red es entrenada sin el beneficio de un maestro. La red aprende a adaptarse basada en las experiencias recogidas de los patrones de entrenamiento anteriores. Existe una sub clasificación llamada redes de pesos fijos.

B.- Las redes de entrenamiento supervisado: Los datos para el entrenamiento están constituidos por varios pares de patrones de entrenamiento de entrada y salida. El hecho de conocer la salida implica que el entrenamiento se beneficia de la supervisión de un maestro o tutor. En la tabla 6 se presentan algunos ejemplos de redes neuronales clasificadas de acuerdo a la forma de aprendizaje.

Tabla No. 6. Redes Neuronales

Aprendizaje no supervisado	Aprendizaje supervisado
Red de Hamming	Basadas en decisión
Red de Hopfield	Perceptrón
Mapa de características	ADALINE
Aprendizaje competitivo	Perceptrón Multicapa

	Modelos Temporales Dinámicos Modelos Ocultos de Markov
--	---

Considerando que las redes neuronales artificiales son agrupamientos simples de neuronas artificiales primitivas, estos agrupamientos ocurren creando varias capas se conectan entre sí, y esto es lo que determina el tamaño de las Redes Neuronales Artificiales. Existen tres tipos de capas de neuronas: las de entrada, las ocultas y las de salida. Entre dos capas de neuronas existe una red de pesos de conexión que pueden estar total o parcialmente interconectadas y que puede ser de los siguientes tipos:

- 1.- Conexiones hacia adelante, que son redes de propagación hacia adelante o acíclicas para todos los modelos neuronales; Los datos de las neuronas de una capa inferior son propagados hacia las neuronas de la capa superior por medio de las redes de conexiones hacia adelante.
- 2.- Conexiones hacia atrás, estas conexiones llevan los datos de las neuronas de una capa superior a otras de la capa inferior.
- 3.- Conexiones laterales.
- 4.- Conexiones con retardo, los elementos de retardo se incorporan en las conexiones para implementar modelos dinámicos y temporales, es decir, modelos que precisan de memoria.

En una red multicapa de propagación hacia adelante, puede haber una o más capas ocultas entre las capas de entrada y salida. El tamaño de las redes depende del número de capas y del número de neuronas ocultas por capa.

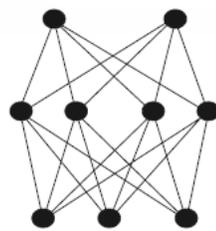
- Número de capas: en una red multicapa, hay una o más capas de neuronas ocultas entre la entrada y la salida. El número de capas se cuenta a menudo a partir del número de capas de pesos (en vez de las capas de neuronas).
- Número de unidades ocultas: El número de unidades ocultas está directamente relacionado con las capacidades de la red. Para que el comportamiento de la red sea

correcto, se tiene que determinar apropiadamente el número de neuronas de la capa oculta.

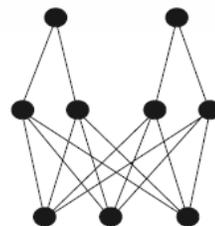
El modelo matemático de una red neuronal es construido a partir de un conjunto de funciones simples enlazadas por sus pesos. Los pesos describen el efecto que cada función simple (conocida como unidad) tendrá sobre todo el modelo.

El tipo de red neuronal más usado es conocido como “Perceptrón multi capa” (MLP: multi layer perceptron), donde la red es arreglada en capas de unidades, es decir, una capa de entradas, una o más capas ocultas, y una capa de salidas. El valor mostrado por cada unidad es conocido como su activación y mide el grado el cual afecta unidades más altas. La activación de las unidades de entrada es el conjunto de los valores de entrada dados a la red y la activación de las unidades de salida es descodificada para proveer la respuesta final. MLP aprende mediante un proceso llamado “Retro-propagación del error” (back propagation of error), el cual involucra calcular el “error” en cada unidad de salida y cambiar los valores de los pesos que conducen al error. La contribución que cada peso hace al error es calculado del valor del peso y el error en la unidad anterior.

Arquitectura ACON y OCON: Se presentan dos tipos de arquitectura en las redes neuronales artificiales, éstas son ACON: Todas las clases en una red (por sus siglas en inglés: All-Class-in-One-Network), y OCON: Una red para cada clase (por sus siglas en ingles: One-Class-in-One-Network). En la aproximación ACON, todas las clases son reconocidas dentro de una única súper red. En algunos casos es ventajoso descomponer esta macro red en varias subredes más pequeñas.



Red Entera
ACON



2 Subredes
OCON

Figura 2.23 Estructura de ACON: Todas las clases en una red.y OCON: Una red para cada clase

La aplicación de las redes neuronales artificiales las hacen bastante apropiadas en donde no se dispone de un modelo identificable que pueda ser programado, pero se dispone de un conjunto básico de ejemplos de entrada. Problemas de clasificación y reconocimiento de patrones de voz, imágenes, señales, y recientemente se ha aplicado para encontrar patrones de fraude económico, hacer predicciones en el mercado financiero, hacer predicciones de tiempo atmosférico, etc. RN se utilizan cuando no existen modelos matemáticos precisos o algoritmos con complejidad razonable; por ejemplo la red de Kohonen (Kohonen, 1982) ha sido aplicada con éxito en el clásico problema del viajante. RN también se ha aplicado en conjunción con los algoritmos genéticos (AG) para crear controladores para robots, disciplina nueva llamada Robótica Evolutiva.

Se dice que las redes neuronales aprenden, este concepto se refiere a cualquier proceso que requiere el uso de los datos para ajustar un sistema de los parámetros que describen un modelo estadístico de esos datos.

Es importante señalar que no implica ninguna de las cualidades humanas como entendimiento, consciencia o inteligencia asociado con las habilidades humanas de aprender.

2.5.4 Sistemas Neuro-Difusos

El creciente interés en las redes neuronales y la similitud con los sistemas fuzzy y la tendencia a buscar vías de relación entre éstas dos técnicas ha llevado a la creación de los llamados sistemas neuro-difusos (Neuro-fuzzy systems). Los sistemas neuro-difusos forman parte de una nueva tecnología de computación flexible, con origen en la inteligencia artificial. En esta nueva tecnología se engloba un conjunto de técnicas que tienen en común la robustez en el manejo de la información imprecisa e incierta que existe en los problemas relacionados con el mundo real (reconocimiento de patrones, clasificación, toma de decisiones, etc.) Algunas de estas técnicas son Lógica difusa, Redes neuronales, Algoritmos genéticos, Teoría del caos y del aprendizaje, razonamiento aproximado, etc.

Estos sistemas difusos utilizan métodos de aprendizaje basados en redes neuronales para identificar y optimizar sus parámetros. Kosko (Kosko, 1992) es conocido por su contribución a los sistemas neuro difusos y con sus publicaciones introdujo en la lógica difusa a muchos investigadores interesados en redes neuronales.

Según Pal y Wang (Pal, 1999; Wang, 2005) existen diversas formas de integrar redes neuronales y sistemas de inferencia difusos, dos de los tipos más importantes se mencionan a continuación:

Redes neuronales provistas con razonamiento difuso: la estructura primaria es la red neuronal y el sistema difuso es una estructura secundaria utilizada para acelerar el proceso de aprendizaje. En este caso, las señales de entrada y/o los pesos de las interconexiones y/o las señales de salida son subconjuntos difusos o valores de las funciones de pertenencia a los conjuntos difusos.

Sistemas de inferencia difusa mejorados con redes neuronales. Las redes neuronales se utilizan para proveer la interfaz de entrada o la salida del sistema difuso. En estos modelos los pesos de las conexiones neuronales en la capas corresponden a los parámetros del modelo difuso y los algoritmos de aprendizaje de las redes neuronales permiten identificar las reglas difusas y aprender las funciones de pertenencia.

Las metodologías actualmente utilizadas de integración de sistemas neuro-difusos se agrupan en cinco tipos, según Wang (Wang, 2005):

- a) Incorporación de información difusa en una red neuronal.
- b) Uso de redes neuronales para implementar modelos de lógica difusa.
- c) Cambio de las características básicas de las neuronas que realizan operaciones usadas en la teoría de conjuntos difusos (unión, intersección, etc.) en lugar de las operaciones normales de suma y multiplicación.
- d) Uso de medidas de fuzzificación, difusión o inexactitud, como el error o inestabilidad de una red.
- e) Construcción de neuronas individuales difusas.

2.5.4.1 Arquitecturas de Sistemas Neuro-Difusos.

Abraham (Abraham, 2001) clasifica los Sistemas Neuro-Difusos (SND) en tres categorías: Cooperativos, Concurrentes y completamente fusionados.

Un SND Cooperativo puede ser considerado como un pre-procesador en donde el mecanismo de aprendizaje de la red neuronal determina las funciones de pertenencia difusa o reglas difusas a partir de los datos de entrenamiento. Una vez determinados los parámetros difusos, la red neuronal ANN acude a la base de conocimiento. Las reglas de conocimiento son generalmente determinadas por un método de agrupación (clustering) o algoritmos de agrupación difusos. Funciones de membresía son ajustadas por la red neuronal a partir de los datos de entrenamiento.

En el SND Concurrente, la red neuronal ayuda al sistema difuso continuamente para determinar los parámetros necesarios sobre todo si los parámetros de las variables de entrada del controlador no se pueden medir directamente. En algunos casos las salidas del sistema difuso no puede ser directamente aplicable al proceso, en este caso la red neuronal puede actuar como un post-procesador de las salidas difusas (fuzzy).

En la arquitectura del SND Fusionado, el algoritmo de aprendizaje de la red neuronal se utiliza para determinar los parámetros del sistema difuso. SND comparten representaciones estructurales y de conocimiento. Una forma común de aplicar un algoritmo de aprendizaje a un sistema difuso es representándolo en la propia arquitectura de la red neuronal. Sin embargo los algoritmos convencionales de aprendizaje (gradiente descendente) no son aplicables directamente como lo son las funciones usadas en los procesos de inferencia. Este problema es atacado utilizando funciones diferenciables en el sistema de inferencia, o simplemente no utilizando el algoritmo de aprendizaje estándar neuronal.

Las arquitecturas de SND fusionadas más conocidas y utilizadas en la actualidad según Abraham (Abraham, 2001) son: FALCON (Lin, 1991), ANFIS (Jang, 1992), GARIC (Bherenji, 1992), NEFCON (Nauck, 1997), FINEST (Tano, 1994), FUN (Sulzberger,

1993), SONFIN (Juang, 1998), EFuNN, con una versión modificada dmEFuNN (Kasabov, 1999), muchos otros (Abraham, 2000).

- Fuzzy Adaptive Learning Control Network (FALCON): Arquitectura compuestas de 5 capas (entrada, salida y tres ocultas). Tiene dos nodos lingüísticos para cada variable de salida, uno es para el dato de entrenamiento (salida deseada) y el otro para la salida.

La primera capa oculta se ocupa de la fuzzificación de cada variable de entrada, cada nodo puede ser unitario, representando una función de pertenencia simple o puede ser compuesto por varias capas de nodos que calculen una función de pertenencia compleja.

La segunda capa oculta define las precondiciones de las reglas y la tercera los consecuentes.

FALCON usa un algoritmo híbrido de aprendizaje no supervisado para calcular las funciones de pertenencia iniciales y un algoritmo de aprendizaje de gradiente descendente para el ajuste óptimo de los parámetros (funciones de pertenencia) de forma de producir la salida óptima.

- Generalized Approximate Reasoning based Intelligent Control (GARIC): Implementa un controlador neuro-difuso utilizando dos módulos de redes neuronales: ASN (Action Selection Network) y AEN (Action State Evaluation Network). La ASN es una red de 5 capas alimentadas hacia adelante. Las conexiones entre capas no tienen pesos asignados. La primer capa oculta guarda los valores lingüísticos de las variables de entrada, cada unidad de entrada está conectada a los nodos de la primera capa oculta que representan su valor lingüístico. La segunda capa oculta representa las reglas difusas que utilizan determinados operadores. La tercera capa representa los valores lingüísticos de las variables de salida. GARIC usa una variante del algoritmo de gradiente descendente para el aprendizaje.

- Neuro-Fuzzy Control (NEFCON): Implementa el modelo difuso de Mamdani. Es un modelo en tres capas: uno de fuzzyficación, otra de reglas y la última de defuzzyficación; utiliza una variante del algoritmo de aprendizaje de propagación hacia atrás.

- **Adaptative Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS):** Es un modelo con una red en 5 capas; permite crear la base de reglas de un sistema difuso, utilizando el algoritmo de entrenamiento de retro propagación a partir de la recopilación de datos de un proceso. Su arquitectura es funcionalmente equivalente a la base de reglas tipo Sugeno (Sugeno, 1988). Este modelo será explicado detalladamente en la siguiente sección, puesto que este trabajo está basado en ANFIS.

Fuzzy Net (FUN): Las neuronas de la primera capa oculta contiene las funciones de pertenencia y este realiza la fuzzificación de los valores de entrada. En la segunda capa oculta, las conjunciones (fuzzy-Y) se calculan. En la tercera capa oculta se almacenan las funciones de pertenencia de las variables de salida. Por último, en la neurona de salida se realiza la defuzzificación. La red es inicializada con las reglas fuzzy base y las funciones de pertenencia correspondientes utilizando previamente un técnica de aprendizaje estocástico que de forma aleatoria cambia los parámetros de las funciones de pertenencia y conexiones dentro de la estructura de la red. El proceso de aprendizaje es impulsado por una función de costos, que es evaluada después de la modificación al azar. Si la modificación dio lugar a un rendimiento mejorado, la modificación se mantiene, de lo contrario se desecha.

Self Constructing Neural Fuzzy Inference Network (SONFIN): Implementa reglas difusas modificadas de Takagi-Sugeno. Sus características se pueden apreciar en el cuadro siguiente.

2.5.5 Comparativo de Sistemas Neuro difusos.

Sistema	Arquitectura	Algoritmo de aprendizaje
Neuro Difuso		
FALCON	5 capas y 2 nodos lingüísticos para cada salida. Capa 1: Fuzificación Capa 2: Define la reglas de antecedente. Capa 3: Define reglas de consecuente. Capa 4 y 5 Defuzificación	Algoritmo híbrido. Aprendizaje no supervisado para localizar la funciones de membresía iniciales y las reglas difusas. Algoritmo gradiente descendiente para ajustar los parámetros de las funciones de membresía para predecir la salida deseada.
ANFIS	5 capas Capa 1: Fuzificación de variables de entrada	Algoritmo de retro propagación para determinar los parámetros premisa.

	<p>Capa 2: Despliega operadores norma-triangu-lares. Define parámetros antecedentes de reglas difusas.</p> <p>Capa 3: Normaliza la fuerza de las reglas.</p> <p>Capa 4: Los parámetros consecuentes de las reglas son determinados.</p> <p>Capa 5: Calcula la entrada total como la suma de todas las señales entrantes.</p>	<p>Algoritmo de estimación de mínimos cuadrados para determinar los parámetros consecuentes.</p>
<p>GARIC</p> <p>Contiene 2 módulos de redes Neuronales: Modulo ASN (Action selection net) Modulo AEN (Action state Evaluation)</p>	<p>Modulo ASN: 5 capas sin asignación de pesos entre las neuronas.</p> <p>Capa 1: Almacena valores lingüísticos de las variables de entrada</p> <p>Capa 2: Contiene reglas difusas y utiliza una operación “softmin”</p> <p>Capa 3: Representa los valores lingüísticos de variables control de salida.</p> <p>Modulo AEN: Evalúa las acciones de la ASN.</p>	<p>Método del medio-máximo para computar la reglas de salida.</p> <p>Mezcla del algoritmo de gradiente descendiente y aprendizaje refuerzo para afinar los parámetros.</p>
<p>NEFCON</p> <p>Los pesos en las conexiones son cargados con conjuntos difusos.</p> <p>Tiene dos clases: NEFPROX (aproximación de función) y NEFCLASS (para clasificación)</p>	<p>3 capas</p> <p>Capa 1: Fuzificación</p> <p>Capa 2: Contiene reglas base para inferencia. Funciones de propagación</p> <p>Capa 3: Defuzificación.</p>	<p>Utiliza mezcla de los algoritmos: refuerzo y propagación.</p> <p>Se utiliza para aprender una regla inicial-base, si el sistema no cuenta con conocimiento previo, o para optimizar reglas manuales.</p>
<p>FINEST</p>	<p>4 capas</p> <p>Capa 1: Contiene los operadores de agregación de naturaleza sinérgica y cancelación.</p> <p>Capa 2: Contiene la función parametrizada.</p> <p>Capa 3: Función que reduce la difuzividad.</p> <p>Capa 4: Encadenamiento hacia atrás.</p>	<p>Algoritmo de Retro-propagación</p>
<p>FUN</p>	<p>5 capas</p> <p>Capa 1: Contiene funciones de pertenencia y perfecciona la fuzificación de los valores de entrada.</p> <p>Capa 2: Las conjunciones son calculadas.</p>	<p>La red inicia con reglas difusas base con sus respectivas funciones de membresía, después utiliza un algoritmo estocástico que de forma aleatoria cambia los parámetros.</p>

	<p>Capa 3: Funciones de membresía de las variables de salida son almacenadas (AND)</p> <p>Capa 4: Funciones de membresía de las variables de salida son almacenadas (OR)</p> <p>Capa 5: Defuzificación</p>	<p>El proceso de aprendizaje es condicionado por una función de costo, que es evaluada después del proceso aleatorio.</p>
<p>EFuNN</p> <p>Los Nodos son creados durante el aprendizaje</p> <p>dmEFuNN (Dynamic Evolving Fuzzy Neural Network) es una version modificada.</p>	<p>5 capas</p> <p>Capa 1: Recibe los datos y los traslada a la capa 2</p> <p>Capa 2: Calcula el grado de membresía de acuerdo a funciones de membresía predefinidas.</p> <p>Capa 3: Contiene los nodos con reglas difusas. Utiliza 2 vectores de pesos entre las conexiones.</p> <p>Capa 4: Calcula el grado en que las funciones de pertenencia de salida son estandarizados a los datos de entrada.</p> <p>Capa 5: Defuzificación y calcula el valor exacto de las variables de salida.</p>	<p>EFuNN utiliza un algoritmo híbrido. Utiliza reglas difusas de Mamdani.</p> <p>dmEFuNN utiliza reglas difusas de Takagi-Sugeno basadas en el algoritmo de mínimos cuadrados.</p>
<p>SONFIN</p>	<p>Precondición: El universo de daos es fraccionado de forma flexible de acuerdo a un algoritmo clasificador.</p> <p>Consecuente: Solo un valor seleccionado es asignado a cada regla, inicialmente. Después variables de entrada son adicionados a la parte consecuente como incremento del proceso de aprendizaje. Parámetros del consecuente son optimizados por algoritmos de mínimos cuadrados inclusive recursivos. Y los parámetros de precondición son mejorados por el algoritmo de retro propagación.</p>	<p>Algoritmo de mínimos cuadrados</p> <p>Algoritmo de mínimos cuadrados recursivo.</p> <p>Algoritmo de retro propagación.</p>

Después del análisis expuesto en la tabla anterior, se llegó a la conclusión de utilizar ANFIS debido a las ventajas que tiene sobre los demás sistemas neuro difusos. La principal ventaja es que es un sistema adaptativo, característica que no contienen los otros sistemas. Esta adaptabilidad se debe a que en el sistema inicia con la determinación de los parámetros antecedentes (premisas) y se optimizan con el uso del algoritmo de retro propagación, enseguida los parámetros consecuentes se optimizan con el uso de la estimación de mínimos cuadrados. El proceso de aprendizaje del sistema ANFIS es el

mejor para el trabajo que se desarrolla en este documento debido a que existen dos pasos importantes en este proceso: Primeramente los patrones de entrada son propagados y los parámetros consecuentes óptimos son estimados por el método de mínimos cuadrados, mientras que los parámetros iniciales (premisa) son adecuados por el conjunto de datos de entrenamiento. El segundo paso importante es el uso del algoritmo de retro propagación para modificar los parámetros premisa, mientras que los parámetros consecuentes se adecuan (reparan). Este proceso es iterativo, y generalmente el proceso converge en pocas épocas.

Es evidente que los usuarios deberán proveer los detalles de arquitectura como el tipo y la cantidad de funciones de membresía para las variables de entrada y salida, tipos de operadores difusos, etc.

Algunos sistemas mencionados no son adecuados para llevar a cabo este trabajo debido a características propias inadecuadas, por ejemplo; FUN utiliza un procedimiento de aprendizaje estocástico, donde está implícita la aleatoriedad, lo que sería una desventaja en el trabajo expuesto. Los sistemas EFuNN por su naturaleza utilizan una sola época de entrenamiento, pero no son adaptativos; su fortaleza consiste en que son óptimos para ser utilizados en aprendizaje en línea.

La siguiente tabla muestra el número de épocas así como el error cuadrático medio (ECM) de varios sistemas neuro difusos (Abraham, 2000), para predecir series de tiempo de Mackey- Glass, donde utilizó una batería de 500 datos para el entrenamiento y otra batería de 500 datos para probar cada una de los sistemas mencionados.

Predicción de series de tiempo de Mackey- Glass

Sistema	Epocas	ECM
ANFIS	75	0.0017
NEFPROX	216	0.0332
EFuNN	1	0.0140
dmEFuNN	1	0.0042
SONFIN	-	0.0180

2.5.6 Sistema Inferencial Adaptativo Neuro difuso

El Sistema Inferencial Adaptativo Neuro difuso, por sus siglas en Inglés ANFIS (Adaptative Neuro Fuzzy Inference System) es una arquitectura que es funcionalmente equivalente a los sistemas inferenciales difusos (fuzzy), es decir es equivalente al tipo de reglas difusas base de Takagi y Sugeno. (Takagi, 1983; Sugeno, 1988; Takagi, 1985)

La figura 2.24 ilustra el mecanismo de razonamiento para el modelo de Sugeno, y en la figura 19 se representa la arquitectura ANFIS equivalente.

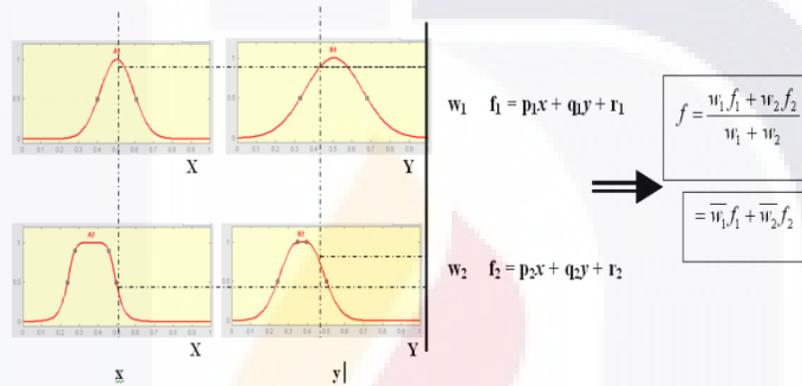


Figura 2.24 Modelo difuso de primer orden con dos entradas y con dos reglas, según Sugeno (Roger, 1997)

Los sistemas inferenciales neuro-difusos generalmente tienen dos entradas y una salida. En lo sucesivo, y para fines explicativos, a un vector que contenga una señal, se le conocerá como “y”, o salida, y al respectivo vector de valores del eje x, se le conocerá como “x”, o entrada. Estas definiciones permiten establecer el conjunto de entrenamiento del sistema ANFIS.

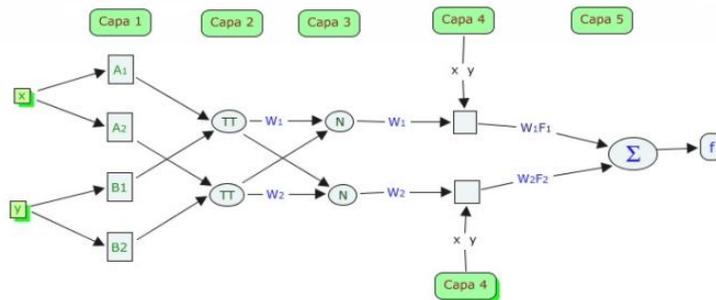


Figura 2.25. Arquitectura ANFIS equivalente

La figura 2.25 muestra la topología ANFIS, y representa el sistema difuso equivalente. Las reglas comunes presentadas por el modelo difuso de primer orden de Sugeno son las siguientes:

Regla 1: Si x es A_1 y y es B_1 , entonces $f_1 = p_1x + q_1y + r_1$

Regla 2: Si x es A_2 y y es B_2 , entonces $f_2 = p_2x + q_2y + r_2$

donde: “ x ” e “ y ” son las entradas a la red neuronal; A_1, B_1, A_2, B_2 son los conjuntos difusos; f_1, f_2 son las funciones lineales; $p_1, p_2, q_1, q_2, r_1, r_2$ son los coeficientes de las funciones lineales o parámetros.

Es importante considerar que la estructura de ANFIS es la de una red con parámetros entrenables, por lo que los algoritmos regla delta y retro-propagación del error (Roger, 1997) le son aplicables. Los bloques especificados con recuadros contienen parámetros entrenables, por lo que las capas 1 y 4 son las que se encargan del aprendizaje.

Los parámetros a entrenar en la capa 4 son los de los modelos lineales (p, q, r) que se ponderan por las entradas, y representan el conjunto difuso de salida inferido (consecuente). Los bloques especificados con círculos implican procesos que no requieren entrenamiento. La descripción de cada uno de ellos se presenta más adelante.

Enseguida se explica cada una de las capas de la red neuronal de ANFIS (Jang, 1997)

Capa 1: Los parámetros a entrenar en la capa 1 son los correspondientes de las funciones matemáticas (sigmoideal, tansig, lineal, etc.) que describen los conjuntos difusos de las funciones de membresía de cada regla (antecedente).

Cada nodo i en esta capa es un nodo adaptativo con una función nodo:

$$\begin{aligned}
 O_{1,i} &= \mu_{A_i}(x) && \text{para } i = 1, 2, \text{ o también} \\
 O_{1,i} &= \mu_{B_{i-2}}(y) && \text{para } i = 3, 4
 \end{aligned}
 \tag{Ec 1}$$

donde x (o y) es la entrada al nodo i y A_i (o B_{i-2}) es la variable lingüística (pequeña, mediana, grande, etc.)

$O_{1,i}$ es el grado de pertenencia del conjunto difuso A (A_1, A_2, B_1, B_2) y especifica el grado en el cual la entrada dada x (o y) satisface el contador A.

La función de pertenencia para A puede ser cualquier tipo de función parametrizada como trapezoidal, gaussiana, etc. Aquí se presenta una función campana característica general representada por la expresión:

$$\mu(x) = \frac{1}{1 + \left| \frac{x - c_i}{a_i} \right|^{2b_i}} \tag{Ec. 2}$$

donde (a_i, b_i, c_i) son el conjunto de parámetros. La forma de la función campana depende de los valores que tomen los parámetros mencionados.

Capa 2: La salida de los nodos en esta capa (etiquetados como Π) es el producto de todas las señales de entrada:

$$O_{2,i} = w_i = \mu A_i(x) \mu B_i(y), \quad i = 1, 2 \tag{Ec 3}$$

Cada salida del nodo le llamaremos fuerza de disparo (The firing strenght) y representa una regla. El bloque Π en esta capa 2, realiza la operación difusa “*prod*” mediante el producto algebraico de las entradas.

En general, otros operadores triangulares norm (T- norm) que mejore el conector AND difuso puede ser usado como la función nodo en esta capa.

Capa 3: Cada nodo en esta capa esta etiquetado como **N**. Estos nodos calculan la razón entre las reglas de fuerza de disparo iteradas i entre la suma todas las reglas de salida, es decir, en esta capa 3 se normaliza las salidas de los bloques Π .

$$O_{3,i} = \bar{w}_i = \frac{w_i}{w_1 + w_2}, \quad i = 1, 2 \tag{Ec 4}$$

La salida de esta capa se le llama fuerza de disparo normalizada.

Capa 4: Los parámetros a entrenar en esta capa 4 son los de los modelos lineales (p, q, r) que se ponderan por las entradas, y representan el conjunto difuso de salida inferido. Los parámetros en esta capa se les llaman parámetros consecuentes.

Cada nodo i en esta capa es un nodo adaptativo con una función nodo:

$$O_{4,i} = \bar{w}_i f_i = \bar{w}_i (p_i x + q_i y + r_i) \tag{Ec 5}$$

Donde \bar{w}_i es la fuerza de disparo normalizada proveniente de la capa 3 y p_i, q_i, r_i son los parámetros del nodo.

Capa 5: Finalmente en esta capa etiquetada como nodo Σ , se procesan todas las salidas y se integran como una suma de todas las señales de entrada. Es decir, en esta capa 5, se realiza la defuzzificación del conjunto difuso inferido por el consecuente.

$$O_{5,i} = \sum_i \bar{w}_i f_i = \frac{\sum_i w_i f_i}{\sum_i w_i} \tag{Ec 6}$$

Como se observa, la arquitectura ANFIS no es sino la representación, en forma de red interconectada, de un sistema difuso modelo Takagi-Sugeno de primer orden, con todos sus componentes, esto es, fuzzificación, inferencia y defuzzificación.

2.6 Espectroscopia RAMAN

La Espectroscopia Raman es una técnica de alta resolución que proporciona información química y estructural de forma rápida de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, permitiendo así su identificación. El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman, descubrimiento que le permitió recibir el Premio Nobel en 1930 (Raman, 1921). Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de dispersión de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares. En 1921, Raman hizo las primeras observaciones que dieron lugar a su descubrimiento histórico. En oposición al postulado propuesto por Rayleigh (Rayleigh, 1900) sobre el color azul intenso del mar, que afirmaba que el color es simplemente el azul del cielo visto en reflexión; Raman realizó un experimento sencillo donde pudo demostrar que el color azul del agua procedía de un fenómeno propio, más tarde explicado como la dispersión de la luz por las moléculas del agua (Raman, 1921).

Dos años más tarde, demostró un efecto que describió como "fluorescencia débil" (Ramanathan, 1923) mientras estudiaba la dispersión de luz en agua y alcoholes purificados, observó que un rayo de luz solar, filtrado y pasado por el líquido, cambiaba de color, este indicio fundamental permitió saber que el fenómeno era una propiedad característica de la sustancia, y se concluyó lo anterior debido al hecho de no poder eliminar dicha fluorescencia mediante purificación de los líquidos. Como consecuencia de las observaciones, Raman y Krishnan proclamaron, en su famoso artículo de Nature en 1928 (Raman, 1928), el descubrimiento experimental de "un nuevo tipo de radiación secundaria", una radiación que fue predicho teóricamente por Smekal en 1923 (Smekal, 1923), simultáneamente por Landsberg y Mandelstam en Rusia (Landsberg, 1928). El lector puede ampliar sus conocimientos sobre el efecto Raman en la referencia (Krishnan, 1981).

2.6.1 Fenómeno de la Absorción y dispersión.

La luz es una onda electromagnética descrita mediante dos vectores oscilantes mutuamente perpendiculares, un campo eléctrico $E(r, t)$ y un campo magnético $B(r, t)$. Las

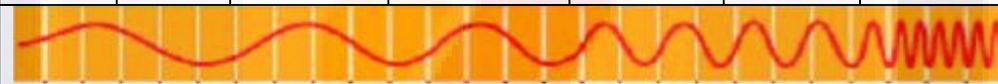
longitudes de onda del espectro electromagnético van desde kilómetros hasta nanómetros. Las diferentes ondas electromagnéticas con contienen frecuencia medida en hertz, número de onda medido en el recíproco de centímetros y longitud de onda medida en centímetros.

En espectroscopia se utilizan varios términos para representar las características de las ondas electromagnéticas: El número de onda” ($\bar{\nu}$), el cual se define como el número de ondas contenido en una longitud de un centímetro y se expresa como $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$.

El número de onda $\bar{\nu}$, la longitud de onda λ y la frecuencia ν están relacionados por:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad \text{en donde } c \text{ es la velocidad de la luz en el vacío.}$$

Tabla No 7. Escala que relaciona las diferentes ondas electromagnéticas con su frecuencia (Hz), longitud de onda (cm) y número de onda (cm^{-1})

NMR	ESR	Micro- Ondas	Raman, Infrarojo	UV, Visible	Rayos X	Rayos Gamma
						
Frecuencia Hertz (Hz)						
10^4	10^2	1	10^{-2}	10^{-4}	10^6	10^8
Longitud de Onda (λ) medida en centímetros (cm)						
10^{-4}	10^{-2}	1	10^2	10^4	10^6	10^8
Numero de Onda ($\bar{\nu}$) medida en 1/centímetros (cm^{-1})						

La diferencia entre las distintas espectroscopias conocidas radica en el tipo de procesos que origina; es decir, cuando un sistema recibe energía de la luz incidente, por ejemplo de UV a visible, se excita hasta alcanzar un nivel electrónico de mayor energía. Así, la luz infrarroja (IR) tiene asociado estado menor de energía comparada con la UV, la espectroscopia de absorción IR generalmente está asociada a la excitación vibracional y

rotacional en moléculas, sin que se produzcan transiciones electrónicas, como en otros casos. El espectro de absorción IR se debe a que la molécula alcanza una energía vibracional más alta. No hay transición electrónica. La absorción IR se puede expresar por la absorción o por transmisión.

En cuanto a la dispersión es el fenómeno de separación de las ondas de distinta frecuencia al atravesar un material. Todos los medios materiales son más o menos dispersivos, y la dispersión afecta a todas las ondas. Es decir es la desviación de la luz de su dirección original de incidencia. La interacción del vector de campo eléctrico de una onda electromagnética con los electrones del sistema con el que interactúa da lugar a la dispersión de la luz incidente. Cuando la luz blanca, compuesta por ondas de todas las frecuencias dentro de la gama visible, pasa a través de un bloque de vidrio, los diferentes colores son refractados o desviados en distinta medida. Si los lados del bloque no son paralelos, los diferentes colores de la luz se propagan con ángulos distintos, produciendo un espectro. La dispersión se debe a que la velocidad de una onda depende de su frecuencia.

El resultado de la dispersión es un espectro, y su estudio es la base de la espectroscopia, una de las disciplinas que más ha contribuido al conocimiento actual del universo.

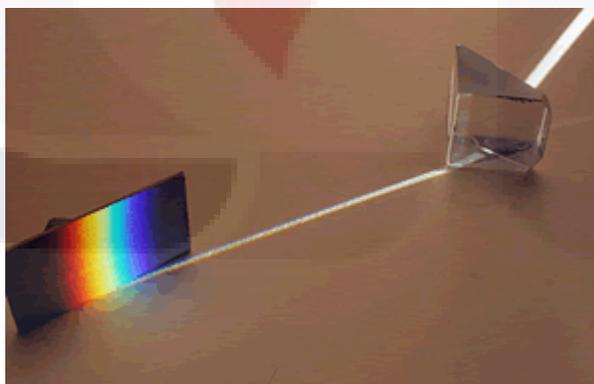


Figura 2.26. Dispersión de la luz blanca a través de vidrio

Los lados del bloque no son paralelos, por lo que los diferentes colores de la luz se propagan con ángulos distintos, produciendo un espectro.

Considerando la transmisión de energía entre los elementos de la luz de incidencia (fotones), con las moléculas del material donde se incide la luz, se conocen actualmente dos tipos básicos de dispersión:

- a) Elástica, llamada dispersión Rayleigh: Si el resultado de la interacción fotón – molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, entonces ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético. Misma frecuencia (longitud de onda) que la luz incidente.
- b) Inelástica. Si el resultado de la interacción fotón – molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta a la incidente es porque hubo transferencia de energía entre el fotón y la molécula.

Es a la luz dispersada inelásticamente a la que se le llama dispersión Raman (Raman, 1921). Por lo anterior dentro de la dispersión inelástica existen dos tipos, una que tiene frecuencia más baja (longitud de onda mayor) y, la que tiene frecuencia más alta (longitud de onda más corta) que la luz incidente.

2.6.2 Dispersión Raman

El efecto de dispersión Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con los electrones de una molécula iluminada. En la dispersión Raman la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía. Así el resultado de la dispersión Raman es cambiar el estado vibracional de la molécula. La dispersión inelástica se clasifica en dos dispersiones Raman, Stokes y anti-Stokes.

1.- Dispersión Raman Stokes: Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor que el incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente. La frecuencia es menor a la emitida inicialmente. El fotón es dispersado con frecuencia $h(\nu_0 - \nu_{int})$

2.- Dispersión Raman anti-Stokes: Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor que el incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón, esto significa

que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado. La frecuencia es mayor a la emitida inicialmente. El fotón es dispersado con frecuencia $h(\nu_0 + \nu_{int})$.

La dispersión de Raman comprende a una fracción muy pequeña de los fotones incididos (aproximadamente una millonésima parte). Podemos esquematizar las tres formas de dispersión en un diagrama de energía (figura 2.27).

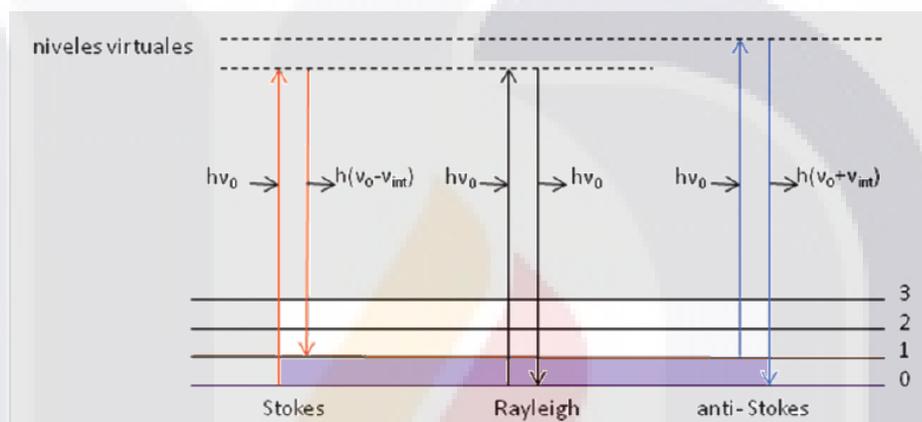


Figura 2.27 Diagrama de niveles de energía. Formas de dispersión de la radiación electromagnética. a) D. Rayleigh: Radiación incidente ($h\nu_0$) igual a radiación emitida. b) D. Stokes: menor ($h(\nu_0 - \nu_{int})$). c) D. anti-Stokes: mayor ($h(\nu_0 + \nu_{int})$).

En resumen, el análisis mediante espectroscopia Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Es decir se hace incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh (Rayleigh, 1900). Es en los estudios de Rayleigh que Raman fundamentó sus descubrimientos (Raman, 1921; Raman, 1928).

La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias $h(\nu_0 - \nu_{int})$ y $h(\nu_0 + \nu_{int})$ son las

frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente.

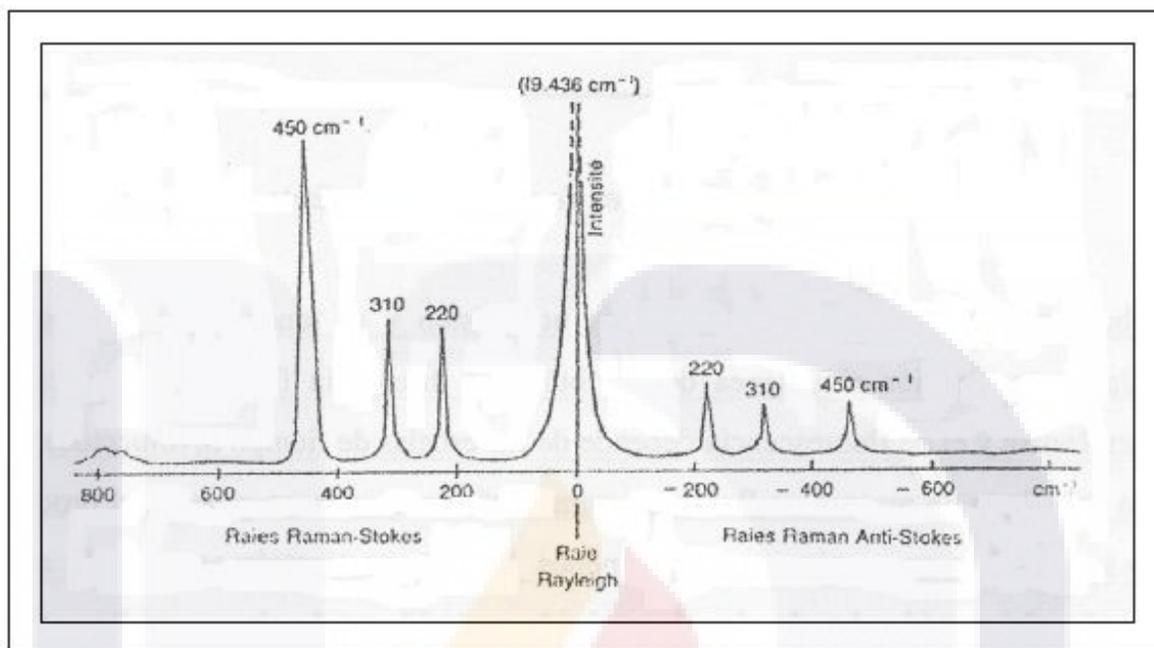


Figura 2.28 Bandas Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes (Contreras, 1987)

El espectro Raman (Contreras, 1987) está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh, como se muestra en la figura 2.28

La dispersión Raman Stokes se produce cuando al incidir un haz de luz, el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente; así se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente, el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$.

Por lo anterior, en el fenómeno Raman intervienen dos fotones de diferentes energías, esta diferencia de energía es debida a un cambio de estado, rotacional o vibracional de la molécula en estudio, causado por la interacción con los fotones. A partir de lo anterior, se crean los espectros, y en consecuencia, el análisis de los espectros Raman

proporciona información acerca de propiedades moleculares tales como los modos y tipos de vibraciones.

La intensidad de la luz dispersada depende de los siguientes factores:

- 1.- El tamaño de la partícula o molécula iluminada.
- 2.- La posición de observación. La intensidad dispersada es una función del ángulo con respecto al haz incidente.
- 3.- La frecuencia de la luz incidente.
- 4.- La intensidad de la luz incidente.

La espectroscopia Raman presenta varias ventajas y desventajas en su aplicación también. Una de las ventajas de la espectroscopia Raman es que casi nunca requiere la preparación de muestras; estas muestras pueden ser soluciones de distintos tipos como acuosas, cristales, polvos, filamentos de polímeros, muestras líquidas, etc. Específicamente la espectroscopia Raman es de gran utilidad en el análisis de soluciones acuosas debido a la débil respuesta del agua. Es por esto que también ha resultado un método muy útil en el análisis de sistemas biológicos. La técnica es no destructiva y el análisis se realiza en tiempos cortos.

Una de las limitantes en el análisis por espectroscopia de Raman es la fluorescencia. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. La intensidad de la fluorescencia es varios órdenes de magnitud más grande que la de la dispersión Raman. Es frecuente que al querer obtener un espectro de Raman observemos solamente fluorescencia y, aunque esto no ocurre en todos los casos, muchas veces esta nos impide analizar moléculas por este método, por lo que se han desarrollado técnicas que permiten eliminar o reducir la emisión por fluorescencia.

Como ya se ha mencionado, sólo una pequeña fracción de la luz que llega a la muestra en análisis se manifiesta como dispersión Raman; la mayor parte es dispersión

Rayleigh. Si una muestra es fluorescente, generalmente debida a impurezas presentes en la muestra, el espectro Raman se oculta en uno de fluorescencia.

Para realizar análisis verídicos es necesario eliminar la señal de fluorescencia. Existen diversas formas de eliminarla o suprimirla, aquí se mencionan solo algunas de las más comunes:

1. Purificación de la muestra. Mantener la muestra que será analizada bioquímica y ópticamente pura, lo cual garantiza que no presente fluorescencia.
2. Exposición prolongada de la muestra al rayo láser. Bajo una exposición prolongada del láser se suprime la fluorescencia, se cree que sucede esto porque se “blanquean” las impurezas.
3. Elección de la longitud de onda adecuada. Se sabe que la intensidad Raman es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz incidente (Nakamoto, 1978; Barriol, 1970). Como la fluorescencia depende de la longitud de onda de la radiación usada para excitar la muestra, se puede cambiar dicha longitud de onda a una en la que no se presente fluorescencia. Considerando lo anterior, es importante comentar que existen básicamente dos procesos que pueden ocurrir cuando se ilumina un compuesto con radiación visible o ultravioleta: primero, la muestra (o impureza en este caso) absorbe la radiación y la emite como fluorescencia, y segundo, la muestra dispersa la luz. Debido a esto se puede elegir, una longitud de onda de la luz incidente que dé un máximo en la razón, señal-ruido. Así, disminuyendo la longitud de onda de la radiación incidente, se incrementa la intensidad de la luz dispersada.
4. Promedio de la señal. Si el grado de fluorescencia es pequeño se puede promediar la señal para mejorar la razón señal-ruido y disminuir la fluorescencia.
5. Uso de láser pulsado. Usando un láser pulsado se mejora la calidad del espectro, debido a que el tiempo necesario para producir el efecto Raman es del orden de 10^{-13} - 10^{-11} y el de la fluorescencia de 10^{-9} - 10^{-7} , de tal manera se puede grabar el espectro Raman antes de que se presente la fluorescencia.

2.6.2.1 Exaltación superficial de dispersión Raman (SERS)

La Técnica de exaltación superficial en dispersión Raman, conocida por sus siglas en inglés como SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) ha sido desarrollada recientemente; Entre sus precursores se encuentra Martin Fleischmann, químico conocido por su trabajo en la electroquímica (Fleischmann, 1974) en 1974 junto con sus colaboradores utilizó la electroquímica y partículas de plata para analizar piridina.

Jeanmaire y Van Duyne (Jeanmaire et al., 1977) en sus trabajos verificaron la sensibilidad de la espectroscopia Raman para el estudio de piridina adsorbida sobre una superficie de plata, y extendieron esta aplicación a otros heterociclos nitrógenados y aminas. Albrecht y Creighton (Albrecht et al., 1977) reportaron una intensidad anormal en los espectros Raman de piridina cuando era adsorbida en un electrodo de plata.

SERS es un fenómeno que se manifiesta cuando al colocar una molécula depositada en un metal acanalado (corrugado) produce una señal Raman de 6 a 12 veces más intensa que la señal que ésta emitiría si estuviera depositada en un sustrato normal. Una amplia variedad de superficies metálicas han sido usadas, incluso el paladio, el níquel y el litio, sin embargo el más común son la plata, el oro y cobre debido a que éstos tienen máximos de absorción en la región visible y de ahí que la exaltación es mayor en la señal Raman que se obtiene. Los primeros experimentos, inclusive algunos experimentos actuales se ha llevado a cabo en superficies rugosas de plata utilizando electroquímica. Ahora, las superficies se preparan con una distribución de nano-partículas metálicas en la superficie (Mock et al., 2002). Las causas o mecanismos que provocan la exaltación actualmente no se conocen con certeza, pero dos mecanismos han sido propuestos, uno de ellos es la exaltación electromagnética (Moskovits, 1985) y el otro es una transferencia de cargas o exaltación química (Campion et al., 1998). Se presentan evidencias la combinación de ambos mecanismos tiene influencia directa en el fenómeno SERS.

Existe el Mecanismo Electromagnético, donde una nube de electrones excitada de un conductor es conocida como un plasmón, y al conjunto de electrones que se encuentran en la superficie del conductor es conocido como plasmón superficial. Si el plasmón superficial está en superficies lisas, se presentan como ondas de electrones y permanecen

ahí. Sin embargo, si una superficie es áspera o corrugada, el plasmón superficial no se mantiene en el mismo lugar y por lo tanto ellos pueden irradiar en dirección paralela y perpendicular. Cuando la luz incidente es dirigida en la superficie áspera esto conduce a la excitación superficial resonante del plasmón. Esto provoca un incremento del campo electromagnético de la luz incidente por lo que se hace que la dispersión Raman se amplíe más.

Por otra parte, en la Transferencia de carga o exaltación Química, la exaltación química puede ser explicada por un efecto de resonancia Raman. Cuando una molécula se une a la superficie, se cree que los niveles de energía cambian y aumentan, o que crea un nuevo nivel de energía intermedio resonante que implica a la superficie metálica.

2.6.3 Resonancia exaltada Superficial en dispersión Raman (SERRS)

El fenómeno de SERRS (por sus siglas en ingles SERRS: Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy) fue reportado por Stacy and Van Duyne (Stacy and Van Dyne, 1983). SERRS es el resultado de la combinación de dos procesos, resonancia Raman y SERS.

Si la frecuencia del rayo láser usado en SERS (expuesto anteriormente) se adecua en los máximos de absorción del la muestra a analizar (se requiere de un cromóforo), la exaltación de los espectros Raman observados puede ser tanto como 10^{10} veces más comparada con la dispersión Raman normal y de 10^3 a 10^4 veces más comparada con SERS (Moskovits, 1985, Graham, 1997).

2.6.4 Aplicaciones

Los principios del fenómeno de dispersión Raman en todas sus modalidades, actualmente se están aplicado en múltiples áreas científicas, como la Física y la Química (Young et al., 2004; Brolo et al., 2004), pero ha tomado gran importancia la aplicación en bioquímica, específicamente en la detección de virus (Shanmukh et al, 2006; Kinkade, 2007).

Con la tecnología Raman mejorada con el uso de nanorods de plata, Yiping Zhao y colaboradores de la Universidad de Georgia en USA, reportaron que encontraron los espectros de diferentes tipos de virus (Shanmukh et al, 2008). Este es un adelanto importante en el campo de la medicina puesto que el diagnóstico rápido y efectivo de la presencia de estos microorganismos en el ser humano favorecerá la pronta prescripción médica y por lo tanto la disminución de morbilidad y mortalidad de la población.

Una aplicación actual es el uso de Oligonucleótidos y SERS que son usados para detectar secuencias de ADN y ARN específicas usando una combinación de nano partículas de oro (Au) y plata (Ag).

En el campo de la genética, polimorfismos específicos de un solo nucleótido (SNP) pueden ser identificados usando esta técnica. SNP es una secuencia de ADN que ocurren cuando una variación de un solo nucleótido - A, T, C, o G - en el genoma, (o de otra secuencia compartida) difiere entre los miembros de una especie (o entre pares en los cromosomas de un individuo). Cao reportó (Cao et al., 2002) que secuencias genéticas de HIV, Ebola, Hepatitis y Bacillus Anthracis pueden ser identificadas usando esta técnica.

2.7 La Inteligencia Artificial en el campo del VIH/SIDA

En la actualidad se están utilizando herramientas que ofrecen la inteligencia artificial en las distintas áreas científicas, lo cual permite que los avances científicos tengan mayor alcance. Específicamente en las áreas de la medicina y bioquímica el uso de estas herramientas está incrementándose recientemente y su uso se ha hecho indispensable para la comunidad científica.

El área de la medicina abarca varios campos fundamentales, como son diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades, así como la creación de medicamentos y vacunas.

Este documento se enfoca en el estudio del área de VIH/SIDA, por lo que se menciona enseguida la aplicación de varias herramientas en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, así como su prevención y el tratamiento de datos estadísticos para intentar predecir o adelantarse a epidemias e inclusive pandemias.

2.7.1 Diagnóstico de VIH/SIDA

Recientemente se han realizado estudios para detectar la presencia de virus en secreciones humanas (incluyendo sangre) con la técnica de espectroscopia de realce Raman, por sus siglas en inglés SERS. La técnica SERS fue usada para obtener un espectro Raman de las cadenas A1/long, B1 y A2 del virus respiratorio syncytial (RSV), causante de un tipo de gripe (Shanmukh, 2008), donde este estudio presenta un índice de reproductividad alto, y el tiempo que se requiere para obtener resultados es muy corto comparado con otros análisis bioquímicas tradicionales como el PCR, mencionado anteriormente. La diferencia es de horas a segundos. Considerando el alto índice de mutación que presentan los virus en la actualidad, la eficiente detección de éstos en el organismo es fundamental, para prevenir enfermedades con los consecuentes contagios posteriores así como adelantarse al tratamiento de la enfermedad que producen (Shanmukh, 2006). Con la tecnología RAMAN mejorada con el uso de nanorods de plata, Yiping Zhao y colaboradores de la Universidad de Georgia en USA, han reportado que encontraron los espectros de diferentes tipos de virus (Shanmukh, 2008). Los espectros reportados son Adenovirus, Rhinovirus, y VIH.

Otra forma de diagnóstico fue propuesto por Claudio et al. (Pichardo, 2006) a través de la comparación visual de espectros Raman obtenidos de muestras con tejidos de seno con cáncer en distintos estadios. Se realizaron comparaciones visuales en los cambios de intensidad de los picos Raman en las muestras. Aunque éstos descubrimientos no fueron hechos propiamente con herramientas de la inteligencia artificial, si proponen una etapa en el diagnóstico del VIH puesto que estos espectros Raman pueden ser mejorados utilizando una combinación de herramientas de Inteligencia Artificial, una herramienta formada con la combinación de redes neuronales (RN) y lógica difusa (LD), llamada Sistema Inferencial Adaptativo Neuro difuso o ANFIS, que es en esencia el contenido de este estudio. Se propone obtener espectros característicos con picos Raman detectados, eliminando el ruido de alta frecuencia (HF) y de fluorescencia de la señal obtenida con SERS. Con el espectro limpio de este ruido (HF y fluorescencia) con la aplicación de ANFIS se definen los espectros Raman característicos de cada microorganismo o retrovirus (HIV) en este caso.

Recientemente, en abril de 2009 el centro londinense de nanotecnología anunció la creación y desarrollo de nano-sensores para diagnosticar y monitorear VIH/SIDA (PHYSorg, 2009). Este accesorio permitirá a las personas que tiene SIDA monitorear su salud y la efectividad del tratamiento. El desarrollo se llevara a cabo gracias a la aportación de 2 millones de libras esterlinas por parte del Consejo de Investigación en Física e Ingeniería (por sus siglas en ingles EPSRC: Engineering and Physical Sciences Research Council). El objetivo principal de este accesorio es, además de permitir a las personas monitorear el desarrollo de su enfermedad y la efectividad de los retro-virales, reducir los costosos análisis sanguíneos convencionales. Permitirá a los pacientes buscar asistencia médica cuando el dispositivo les indique que hay resistencia del virus al tratamiento antiviral. Para los médicos de países en vías de desarrollo será de gran provecho puesto que podrán diagnosticar de forma rápida y económica, los pacientes con SIDA y mantener un monitoreo constante. Este aparato usará pequeños sensores mecánicos llamados arreglos nano-voladizos (nano-cantilever arrays) que medirá virus y otras proteínas que indiquen un aumento en el nivel de virus y la forma de respuesta del organismo.

Los arreglos nano-voladizos son nano-vigas de proyección o nano-estructuras apoyadas sólo en una terminal. La Dra. Rachel McKendry, integrante del equipo de investigación explica que estos arreglos serán cubiertos con sustancias que adherirán los virus de VIH y otras proteínas asociadas al progreso de la enfermedad, y que servirán como marcadores.

El acomodo de estos marcadores causa la alta sensibilidad de sensores a arquearse como un trampolín y esta curvatura indica el nivel de virus en el cuerpo. El proyecto será desarrollado en los próximos tres años, afirma el reportaje.

Es indudable que en este proyecto se utilizara tanto nanotecnología como inteligencia artificial para identificar y clasificar datos, pero solo se usará en personas con síntomas de SIDA, y habría que ver si funcionará en persas asintomáticas, que pueden estar sanas o con el virus presente en su sangre en la fase de latencia, difícil de detectar por los métodos tradicionales.

2.7.2 Prevención del VIH/SIDA

Sin duda esta parte es la más abordada por los estudios hechos por la comunidad científica en el mundo y existe una gran cantidad de investigadores al respecto. Redes neuronales evolutivas se han estado utilizando últimamente en determinar co-receptores en inmunología, específicamente en VIH-1 y sus mutaciones recientes, que son R5, X4, y R5X4.

Los co-receptores son proteínas en la membrana de las células inmunológicas en el ser humano (linfocitos), la CCR5 y CXCR4, que desempeñan un papel clave en la penetración (infección) del VIH a las células inmunológicas, linfocitos y fagocitos específicamente.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, una de las maneras en que el VIH incapacita al sistema inmunológico es destruyendo las células T CD4+. Estas células son de gran importancia para el manejo de la respuesta inmunológica y cuando escasean, se debilitan las defensas en un organismo determinado. Cuando el VIH y otros patógenos entran al organismo, las células CD4+, actuando a través de una red de interacciones químicas, instruyen a las otras células para que incapaciten al invasor. El VIH de hecho se adhiere una proteína de las células CD4+ en la superficie de éstas y otras células para poder entrar. Estas proteínas son llamadas co-receptores y pueden compararse a una puerta de entrada que utiliza el VIH para ingresar al interior de las células. Se han identificado dos co-receptores de entrada que requiere el virus para ingresar e infectar a una célula, uno es llamado CC-CCR5 (abreviado como CCR5), y otro denominado CXCR4 o fusina. El CCR5 se encuentra presente en una amplia gama de células que pueden ser infectadas por el VIH, incluyendo las células T y los macrófagos. Por otro lado la fusina se encuentra principalmente en las células CD4+ y solo parece servir como puerta de entrada para ciertos tipos de VIH.

Recientemente, específicamente en Junio de 2008, Lamers et al. (Lamers, 2008) reportó estudios preliminares realizados, donde predijo que tipo de co-receptor utilizará el virus VIH-1 (R5, X4, y R5X4) con redes neuronales evolutivas. Demostró que con el uso

de redes neuronales evolutivas se pueden determinar co-receptores del virus R5X4, una mutación del VIH-1; además de distinguir el propio virus R5X4, el cual puede usar co-receptores CCR5 o CXCR4, de secuencias virales puras de R5 o X4. El grado de confiabilidad que reporta es menor de 75 %.

Las Redes Neuronales han sido aplicadas también por Resch et al. (Resch, 2001) para predecir el uso de co-receptores VIH-1, al igual que Loannidis et al. (Loannidis, 2003) y Wang et al. (Wang, 2003) entre otros (Brumme, 2004; Milich, 1993). Las redes neuronales también han sido usadas para clasificar y predecir el estado que guarda el VIH/SIDA en pacientes sintomáticos (Laumann, 1999).

2.7.3 Tratamiento del VIH/SIDA

Los algoritmos genéticos han sido aplicados para encontrar el horario óptimo de suministro y control de medicamentos retro-virales en el tratamiento de personas con SIDA (Castiglione, 2007). El tratamiento que se utiliza es llamado terapia antirretroviral de gran actividad o TARGA (por sus siglas en inglés HAART: highly active antiretroviral therapy). El tratamiento consiste en el suministro de medicamentos antirretrovirales para el tratamiento de la infección por retrovirus, principalmente el VIH, y que por lo general son tres o cuatro diferentes que se toman en conjunto. Debido a la complejidad de la selección y después de un régimen, la gravedad de los efectos secundarios, encontrar los horarios de suministro más óptimos así como las suspensiones periódicas necesarias sin permitir la resistencia viral y por lo tanto que la enfermedad no avance es esencial.

2.7.4 Análisis de datos estadísticos

Leke Betechuoh (Leke Betechuoh, 2007) implemento un mecanismo de control, para entender como propiedades demográficas en un individuo afectan el riesgo de contraer el VIH, utilizando redes neuronales. Lo anterior con la finalidad de entender si la susceptibilidad de VIH puede ser controlada al modificar algunas de las propiedades demográficas como la educación.

Por otra parte, Crossingham y Marwala (Crossingham, 2007) utilizaron algoritmos genéticos para optimizar tamaños de partición de conjuntos ásperos para análisis de datos de VIH. La teoría de conjuntos ásperos apoya otras áreas de la inteligencia artificial que están trabajando en el análisis de datos sobre VIH/SIDA.

La Teoría de conjuntos ásperos (Rough Set Theory, RST) fue propuesta por Pawlak (Pawlak, 1991) en los años 1980's como una nueva herramienta matemática para hacer frente a los conceptos vagos y de incertidumbre. El RST es de importancia fundamental en la inteligencia artificial (IA) y a las ciencias cognitivas. RST es útil en el análisis de decisiones en donde se encuentran inconsistencias.

Para enfrentar estas inconsistencias, se definen dos clases de decisiones, aproximaciones inferiores y superiores. La teoría de conjuntos ásperos es a menudo contrapuesta con teoría de conjuntos difusos (Fuzzy Sets Theory, FST), pero en realidad es un complemento de éste. Una de las ventajas de RST es que no requiere de conocimiento apriori sobre el conjunto de datos.

Estos autores presentaron un método para optimizar tamaños de partición de conjuntos ásperos, en el cual las reglas de extracción fueron mejoradas en datos de VIH. La técnica de optimización usada (algoritmos genéticos) fue usada para determinar los tamaños de partición de un conjunto áspero a fin de maximizar la exactitud de predicción de conjuntos ásperos. Los autores utilizaron datos obtenidos de mujeres sudafricanas embarazadas en el año 2001. Las seis variables demográficas consideradas fueron: raza, edad de la madre, educación, gravidez, paridad y edad del padre. La finalidad es tener en la salida o resultado saber si la persona es VIH positivo o negativo.

2.7.5 Aplicaciones de nanotecnología y espectroscopia Raman

En la semana nacional de ciencia y tecnología 2009, llevada a cabo en la ciudad de México, D. F. en el mes de octubre; Señaló Miguel José Yacamán, investigador de la Universidad de Texas que científicos analizan el uso de nano-partículas de plata para el tratamiento de VIH-Sida, las cuales pueden “apagar” el virus (Elechiguerra et al., 2005). De acuerdo con el científico, el efecto de la plata como bactericida es bien conocido debido a

que ésta emite iones que eliminan los microorganismos. Pero una partícula, añadió, de cinco nanómetros —un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro— (el virus del VIH mide cerca de 100, un orden de magnitud por debajo de las bacterias) aumenta la efectividad de las partículas cargadas.

Explicó que encontraron que estas partículas atacan al virus en sitios específicos, y se pegan en partes de éste donde se halla la proteína gp120, que es esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células previo a su invasión. El investigador refirió además que actualmente su equipo de investigación realiza estudios para desarrollar una técnica rápida de diagnóstico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida). Esto es mediante la utilización de la técnica de espectroscopia Raman, con la que se identificaría la proteína gp120, que aumentaría al momento de ponerla en contacto con partículas nanométricas de plata.

Recientemente un equipo de investigadores chinos encabezados por Hu (Hu, 2010), están trabajando en desarrollar un método de análisis para detectar partículas subatómicas del ADN del VIH-1, utilizando SERS, basado en nano-partículas de metal llamadas en inglés “multilayer metal-molecule-metal nanojunctions (NJs)” Se basa en formar emparedados con la partícula y metal, afin de potencializar la detección de la señal raman e identificar las partículas subatómicas.

3 MARCO METODOLOGICO

Este capítulo llamado marco metodológico es equivalente al llamado diseño experimental en la literatura, y que se compone entre otros aspectos de: Observación, Planteamiento del problema, Hipótesis, Método, Resultados y Conclusiones. Se expresan los objetivos y metas a alcanzar vinculadas con soluciones al problema a atacar, de acuerdo a la muestra diseñada de la población en estudio. Además de la metodología diseñada y utilizada para alcanzar dichas metas, que son específicamente el obtener características de los espectros Raman obtenida con SERS de muestras de células humanas dañadas (cáncer, infectadas, etc.) detectando picos específicos, eliminando el ruido de alta frecuencia (HF) y fluorescencia. Además de inferir estos picos Raman de la señal limpia de ruido al utilizar un sistema inferencial neuro difuso (ANFIS). En otras palabras, con esta nueva metodología después de eliminar el ruido de alta frecuencia y fluorescencia de la señal original de forma rápida, encontrar los picos Raman característicos de la muestra (célula dañada).

Otra meta es buscar la reducción de la Dimensionalidad, es decir la obtención de los picos Raman en forma individual, puesto que los métodos existentes procesan el espectro completo, por lo que se complica la identificación de los picos. Con esto, y al no existir extractores automáticos de picos Raman puesto que este proceso se lleva a cabo en forma visual por los expertos en el área presentándose errores humanos. Y finalmente diseñar un patrón espectrográfico de la muestra en análisis al buscar una clasificación más clara de los picos Raman inferidos por ANFIS con las características básicas que marca la literatura.

3.1 Objetivos

Objetivo principal: Diseñar un modelo para encontrar un patrón espectrográfico que contenga los picos Raman de forma automática de una muestra de células dañadas ya sea con cáncer o en linfocitos T CD-4 infectadas con el genoma del Retrovirus llamado Virus de Inmunodeficiencia VIH (relaciones estructurales del ADN ocultas, antes ARN), mediante la técnica de exaltación espectrofotométrica Raman y una herramienta Híbrida de la inteligencia artificial llamada Sistema Adaptativo Inferencial Neuro Difuso (ANFIS por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sus siglas en inglés), así como reducir la Dimensionalidad del análisis al obtener picos Raman individuales.

Objetivos específicos:

- Obtener los espectros Raman característicos que revelaran la presencia de relaciones estructurales ocultas en el genoma celular, mediante espectrofotométrica Raman aplicada directamente a las células ya sea sanguíneas como los linfocitos T CD-4 tanto sanos como infectados con VIH en muestras sanguíneas o en células con cáncer.
- Procesar de manera adecuada los espectros Raman proporcionados para eliminar el ruido de alta frecuencia y de fluorescencia.
- Reducir la Dimensionalidad al obtener los picos Raman en forma individual, y disminuir la necesidad de procesar el espectro completo, tal y como se hace actualmente.
- Diseñar la metodología para encontrar los picos Raman del espectro Raman de forma automática con el apoyo de ANFIS.
- Establecer los espectros Raman patrón de la muestra con células ya sea de linfocitos T CD4 tanto sanos como infectados con VIH o de muestras de células dañadas con cáncer y células sanas.
- Establecer los inicios de una clasificación más clara de patrones a través del diseño de un proceso (trabajo futuro)

3.2 Metas

1.- Revisión bibliográfica exhaustiva, así como el análisis, crítica y discusión de dicha bibliografía. Investigar las técnicas de inteligencia Artificial que se han involucrado para el estudio de secuencias y patrones genómicos, así como para el procesamiento de espectros.

Investigar los avances existentes en México y otros países en Bioinformática aplicando técnicas de inteligencia Artificial.

- 2.- Selección y análisis de los sistemas Neuro-difusos. Técnicas de observación y medición, como son el uso de la teoría de Lógica difusa (Fuzzy logic) para convertir datos numéricos en datos categóricos; y el uso de herramientas clasificadoras, tal es el caso de Redes Neuronales artificiales (Neural Network).
- 3.- Demarcación del universo de estudio y selección de la muestra a través de datos Raman obtenidos del Centro de Investigaciones en Óptica.
- 4.-. Observaciones, experimentos, mediciones. Uso de la herramienta de inteligencia artificial seleccionada (ANFIS) y su aplicación en los datos Raman (espectros) en la muestra, para obtener los picos Raman individuales.
- 5.- Análisis y discusión de resultados obtenidos.
- 6.- Elaboración y envío de artículos a congresos internacionales, reportando avances.
- 7.- Participación con ponencias en foros académicos.

3.3 Planteamiento del problema

La creciente expansión del SIDA en todo el planeta ha traído como consecuencia que la comunidad científica esté intentado frenar el avance de esta enfermedad en tres ámbitos: prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento de la enfermedad.

En cuanto al diagnóstico oportuno, el planteamiento del problema es cómo realizar un diagnóstico oportuno; en otras palabras, como diagnosticar la presencia del VIH en la sangre humana en su fase de latencia, que es cuando no hay síntomas que reflejen la presencia del VIH en el organismo humano. El diagnóstico oportuno permitirá iniciar un tratamiento antes que la enfermedad (SIDA) avance y se refleje a través de los síntomas característicos.

Este diagnóstico oportuno se puede lograr utilizando herramientas de inteligencia artificial (sistema inferencial adaptativo inteligente) y tecnología espectrográfica que aprovecha el fenómeno Raman para encontrar espectros característicos, aplicadas en muestras de sangre de pacientes sospechosos de estar infectados con el VIH.

3.4 Hipótesis

La correcta aplicación de Espectroscopia Raman en muestras de sangre humana, y con el uso de un sistema inferencial adaptativo inteligente como lo es ANFIS, permitirá identificar patrones espectrográficos Raman que revelen la presencia (o en su defecto la no presencia) de características genómicas ocultas en células humanas tal es el caso de linfocitos T-CD4 infectados o células cancerosas. La definición de patrones espectrográficos con picos Raman identificados y procesados en forma individual permitirá realizar un diagnóstico eficiente del padecimiento, Síndrome de Inmuno-Deficiencia Humana (SIDA: presencia del virus del VIH en el organismo humano) en la etapa de incubación o latencia, difícil de detectar por las técnicas bioquímicas tradicionales usadas actualmente, en el primer caso y en el diagnóstico de cáncer con discriminante en etapas tempranas y avanzadas. Los espectros pueden ser mejorados al ser limpiados del ruido de alta frecuencia y fluorescencia utilizando una combinación de herramientas de Inteligencia Artificial; Se refiere a una herramienta formada con la combinación de redes neuronales artificiales (RNA) y lógica difusa (LD), llamada Sistema Inferencial Adaptativo Neuro difuso o ANFIS. Conectada esta información con otros niveles de conocimiento en este mismo campo, proporcionará nuevas herramientas científicas que permitirán avanzar en la prevención, diagnóstico y tratamiento del SIDA y del cancer.

3.5 Descripción de la población y diseño de la muestra

Es importante aclarar que no se realiza experimentos para adquirir señales con SERS por la carencia de tecnología apropiada, este enfoque se centra en el uso de técnicas de inteligencia artificial.

Es importante aclarar que el estudio físico que se describe a continuación, no fue realizado por un servidor, sino que el trabajo partió de datos que fueron publicados en el artículo: Pichardo-Molina y colaboradores en el artículo “Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients,” publicado en la revista “Lasers Med Sci” en 2006 en Springer-Verlag; donde se presentaron los espectros de donde se extrajeron los datos Raman que se utilizaron en este trabajo.

La sección de muestreo y protocolo menciona como fue realizado el estudio por Pichardo-Molina y colaboradores en pacientes sanos y con cáncer de mama en distintos estadios; donde obtuvieron espectros Raman utilizando tecnología de punta existente en el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), y cuyas características se mencionan más adelante. El comportamiento de los datos Raman, independientemente de donde se obtengan, tiene el mismo comportamiento. Estos datos Raman se interpolan a las muestras de sangre, donde al estar infectada con VIH, sus características físico-químicas se modifican y por lo tanto los picos de los espectros Raman sufren modificaciones.

También es importante hacer notar que el trabajo consiste en obtener características del espectro Raman detectando picos específicos, eliminando el ruido (alta frecuencia y fluorescencia) de la señal obtenida con espectrofotometría Raman. Con el espectro limpio las características del espectro Raman de cada microorganismo o célula son definidas.

El enfoque de este proyecto se centra en el uso de técnicas de inteligencia artificial existentes para a) limpiar la señal Raman es decir remover el ruido de alta frecuencia y fluorescencia, b) reconocer picos Raman con el uso de un sistema neuro difuso y c) clasificar el espectro construido en células sana o dañadas ya sea por infección o por cáncer. Los resultados son validos ya que la tecnología Raman produce espectros con características semejantes, desde la perspectiva del análisis de señal.

3.5.1 Muestreo y Protocolo

Como se mencionó, se utilizaron datos proporcionados por el Centro de Investigaciones en Óptica, los cuales fueron obtenidos de un estudio hecho en dos grupos: 11 pacientes con cáncer de seno confirmado mediante diagnostico clínico e histopatológico (con 4 pacientes con metástasis) y 12 pacientes sanos como muestra control. Todos los pacientes son originarios del la región central de México con características étnicas y socio económicas semejantes (Pichardo, 2006). La edad promedio del grupo canceroso está entre 48.0 ± 10.0 años y la edad promedio del grupo control es de 34.0 ± 9.0 años. Los pacientes (objetos de estudio) fueron reclutados por “Human Ethical Committee” de la Fundación Rodolfo Padilla-Padilla (León, Guanajuato, México). Consentimientos por escrito de las

personas objetos de estudio fueron obtenidas y el estudio fue hecho de acuerdo al Tratado (Declaración) de Helsinki.

Preparación del suero y análisis de espectroscopia Raman (RS)

Después de 10–12 h de ayuno (nocturno), muestras individuales de 10 ml de sangre fueron obtenidas entre las 8:00 and 9:00 A.M. y fueron centrifugadas para obtener la muestras de suero. Alícuotas de las muestras fueron congeladas a -70°C antes del realizar el análisis de espectroscopia Raman (RS).

El RS de los residuos sólidos de las muestras de suero fueron medidas colocando una gota del suero de las alícuotas en un sustrato de aluminio, el cual fue examinado enseguida con el uso de un microscopio Leica (DMLM) integrado al sistema Raman (Renishaw 1000B). Múltiples escaneos fueron realizados en la muestra sólida con un movimiento del sustrato en un estado X-Y. El sistema Raman fue calibrado con un semiconductor de Silicon usando un pico Raman de 520 cm^{-1} . La longitud de onda de excitación fue de 830 nm, y el rayo láser fue enfocado sobre la superficie de la muestra con el objetivo de 50 \times . El radio del rayo fue de 2.0 μm y el poder de irradiación del rayo láser sobre la muestra fue de 65 mW. Cada espectro fue tomado con una exposición de 10 s y recolectado en la región desde 450 a 1,780 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} , y finalmente todos los espectros fueron obtenidos el mismo día (Pichardo, 2006).

3.6 Selección de técnicas e instrumentos de investigación.

A partir de este apartado, se presenta y se refleja el trabajo hecho con los datos Raman proporcionados por Pichardo-Molina y colaboradores, mencionados anteriormente.

3.6.1 Descripción del algoritmo de Remoción de ruido.

Los pasos para llevar a cabo el algoritmo propuesto se aprecia en el diagrama de bloques de la Figura 3.1; la secuencia que se sigue para llevar a cabo la remoción del ruido del espectro implica 7 etapas.

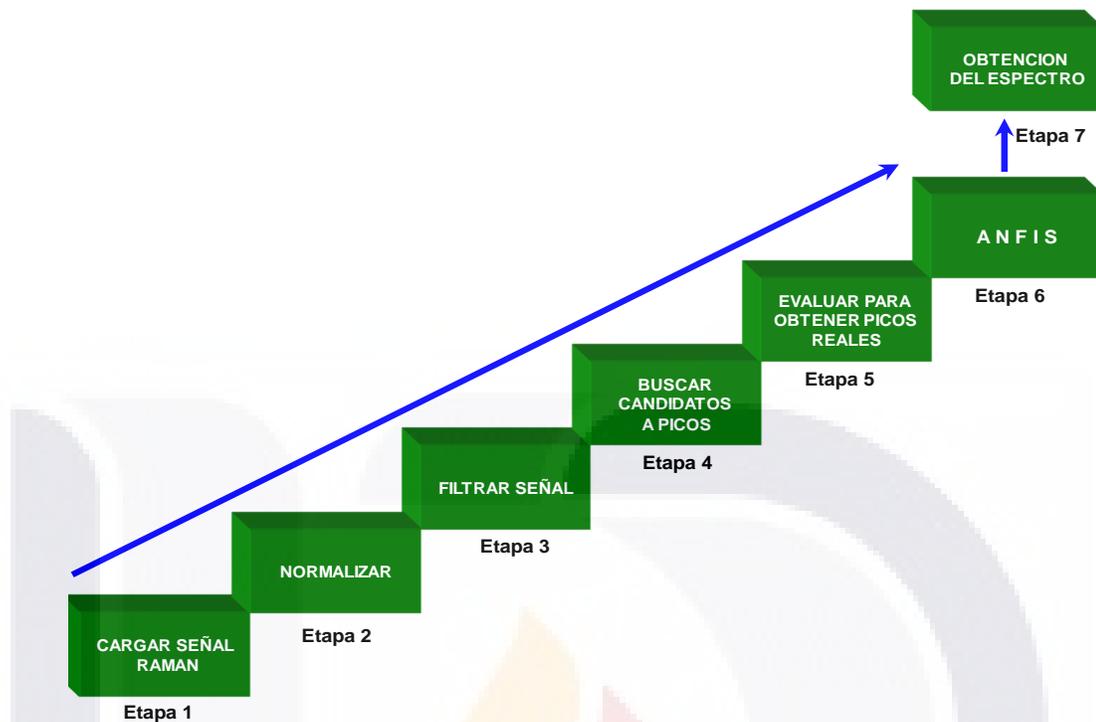


Figura 3.1 Diagrama de bloques de la secuencia del algoritmo propuesto

Etapa 1: Cargar señal Raman. En este bloque se introduce el vector de datos que contiene la señal Raman; para realizar el análisis de cada uno de los espectros se genera un archivo el cual contiene la cantidad de espectros a los que se les desea eliminar el *ruido de HF* y de *fluorescencia*.

Etapa 2. Normalización de gráfica. La idea de realizar ésta normalización es que por medio de ello se tengan la señal bajo una misma escala, esto debido a que los espectros originales se encuentran en escalas diferentes, para llegar a este objetivo se implementa el método de interpolación lineal, en el eje x (abscisas) se toman 1000 muestras (siendo este un valor arbitrario). Para el eje y (ordenadas) de igual forma se requiere normalizar, sólo que en este caso la escala es de 0 a 1. Con esto podemos trabajar de una mejor manera sobre los espectros, porque se tienen dentro del mismo rango todas las señales y se podrá localizar apropiadamente y de igual forma la pendiente en cada señal Raman.

Etapa 3. Filtrar señal. El filtro es uno de los objetivos principales, el tipo de filtro que se utiliza es usando la *mediana*, con este método se logrará la eliminación del ruido de alta

frecuencia. Cuando se aplica el filtro de *mediana*, la señal resultante se presenta *suavizada* en el espectro.

Etapa 4. Buscando candidatos a picos. Para continuar con el análisis del espectro, lo que se sigue es implementar algún método que sea capaz de ir evaluando la señal resultante del filtrado. La manera en que se aborda esta parte del problema, es de la siguiente forma: para iniciar el análisis se implantará un muestreo por ventaneo, con la longitud de ventana igual a 15 muestras. Al muestrear la señal de esta manera, lo que se va encontrando son los máximos dentro de la ventana, pero para poder irlos delimitando se va a realizar una evaluación que consiste en ir considerándolo pico si es que está centrado ese valor máximo, y si se carga hacia algún costado se descarta. De esta forma se encuentran las porciones del espectro que pueden tener forma de pico, que a la postre podría ser un pico Raman legítimo característico.

Etapa 5. Evaluando para obtener picos reales. Esta etapa se divide en dos fases:

a) Ensanchamiento de la ventana. La metodología usada para determinar si es pico o no es mediante el análisis de valores máximos adquiridos de ángulos que se forman en la señal.

b) Determinación de pico Raman. Mediante la *razón de aspecto* (R.A.) $R.A = \frac{\text{alto}}{\text{ancho}} \geq 0.6$, de los picos a evaluar. Se considera un resultado de 0.6, y es importante la normalización de la señal(es), para llevar a cabo la R.A.

Etapa 6. ANFIS. Configuración de ANFIS desarrollada.

ANFIS es el pre-editor usado para la unión de los puntos en donde se considera que inicia y termina algún pico del espectro. Se construyo una red adaptativa que es funcionalmente equivalente al modelo difuso de Sugeno.

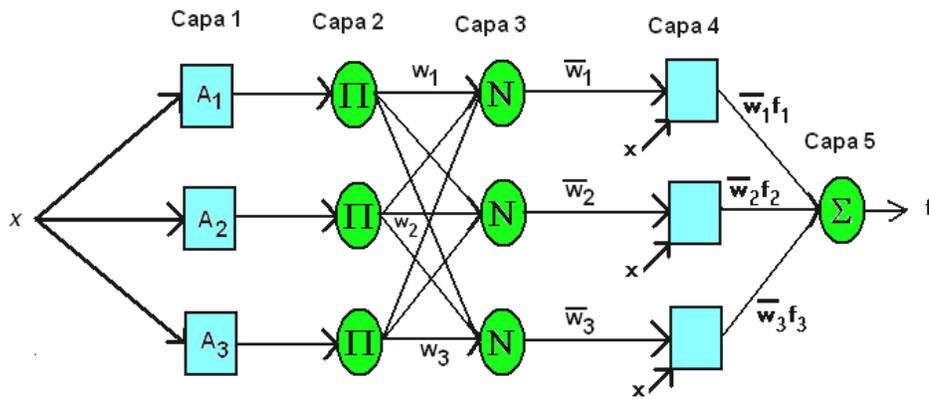


Figura 3.2. Estructura de la red ANFIS: una entrada, tres reglas, una salida.

La arquitectura ANFIS para este modelo difuso de Sugeno de primer orden es transparente y eficaz. (Takagi et al., 1985)

La estructura de la red se inicializa de la forma indicada en la tabla 8; La representación de dicha red se encuentra en la figura 3.2, mientras que el conjunto de reglas del sistema difuso respectivo se encuentra enseguida:

Regla 1: Si x es A_1 entonces $f_1 = p_1x + q_1$

Regla 2: Si x es A_2 entonces $f_2 = p_2x + q_2$

Regla 3: Si x es A_3 entonces $f_3 = p_3x + q_3$

Tabla 8. Estructura de la red ANFIS

Elemento	Especificación	Observaciones
Número de entradas	1	X
Número de salidas	1	Y
Número de reglas	3	-
Número de conjuntos difusos de entrada	3	2 parámetros entrenables por conjunto
Número de parámetros lineales	6	$P = [p_1, p_2, p_3]$; $Q = [q_1, q_2, q_3]$
Tipo de funciones de membresía	Gaussiana	
Número de parámetros entrenables en las funciones de membresía	6	$S = [s_1, s_2, s_3]$; $C = [c_1, c_2, c_3]$ S , Sigma (σ); C , Centro.
Parámetros entrenables	12	Lineales y no lineales.
Estrategia de Aprendizaje	Híbrido	MSE (P,Q) + Backpropagation + regla delta (S,C)

Para aplicar ANFIS se procedió de la siguiente manera:

- a) Preparación de datos.
- b) Entrenamiento de ANFIS

c) Predicción del ruido de f en las regiones con pico Raman.

Etap 7. Obtención del espectro. Esta es la parte culminante del algoritmo, en la cual se tiene que realizar un empalme entre la gráfica del espectro con ruido y la obtenida de ANFIS.

3.6.2 Pseudocódigos del algoritmo Backpropagation de la red Neuronal

1.- Inicio: Iniciar con pesos de la red con valores pequeños aleatoriamente.

2.- Presentar un patrón de entrada x_p : $x_{p1}, x_{p2}, x_{p3}, \dots, x_{pn}$ y especificar la salida deseada que debe generar la red; $d_1, d_2, d_3, \dots, d_n$.

3.- Calcular la salida actual de la red:

Se calculan las entradas netas para las neuronas ocultas procedentes de las neuronas de entrada:

Se calculan las salidas de las neuronas ocultas:

Se realizan los mismos cálculos para obtener las salidas de las neuronas de salida.

4.- Calcular los términos de error para todas las neuronas:

5.- Actualización de los pesos:

Formula neurona capa de salida

Formula neurona capa oculta

6.- Repetir el proceso hasta el término del error: - pk

3.6.3 Complejidad computacional de ANFIS

Una de las características de ANFIS es que crea un árbol de decisiones difusas para clasificar datos en uno de 2^n (p^n) modelos de regresiones lineales para minimizar la suma del error cuadrático.

En el siguiente cuadro se presenta el análisis de complejidad computacional para cada capa de la red neuronal del sistema neuro difuso llamado ANFIS.

No. Capas	Tipo de capa	No. de nodos	No. Parámetros
L_0	Entradas	n	0
L_1	Valores	$(p*n)$	$3*(p*n)=S_1$
L_2	Reglas	p^n	0
L_3	Normalización	p^n	0
L_4	Funciones lineales	p^n	$(n+1)*p^n=S_2$
L_5	Suma	1	0

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este capítulo se expresan los resultados encontrados a través del desarrollo de la metodología instaurada en el proyecto. Se expresan los resultados en cada una de las etapas desarrolladas y expresadas en el capítulo 3. Además de la explicación de cada una de las contribuciones aportadas al conocimiento universal, tal es el caso de la aplicación de ANFIS en señales (datos) Raman, que es un sistema neuro difuso adaptativo e inferencial, característica importante de la inteligencia artificial contemporánea. Pero no solo la contribución de la aplicación de inteligencia artificial por sí misma a datos Raman, sino también de la reducción de la Dimensionalidad del proceso al obtener los picos Raman individuales, la aportación implica que este proceso se realiza analizando el espectro completo, y no en forma fraccionada que en este caso es análisis de pico por pico Raman.

Una tercera aportación es que se propone realizar la extracción de forma automática de los picos Raman (y diseñar los espectros patrón), puesto que no existen extractores automáticos de Picos. Al obtener los espectros patrón conteniendo los picos Raman característicos de la muestra, se tienen elementos para realizar una clasificación más clara, por lo que se proponen los inicios para desarrollar un método clasificador, que tendrá en un futuro un objetivo de diagnóstico.

Por otra parte y como se ha mencionado, una señal Raman se encuentra compuesta por el espectro Raman más dos señales de ruido inherentes a la adquisición del mismo, a saber, el ruido de fondo o fluorescencia, así como el ruido de alta frecuencia. La estrategia adoptada esta basada en determinar la presencia de posibles picos (máximos con ciertas características morfológicas) en la Señal Raman, aislar las regiones (de número de onda) en que ocurren dichos picos, y retener el ruido de fluorescencia fuera de dichas regiones, de modo que se obtiene una señal continua a trazos, como la que se muestra en la figura 4.1. Dicha señal está compuesta por secciones continuas separadas por segmentos vacíos; el objetivo del sistema ANFIS consiste en determinar una posible forma (por interpolación) de la señal de

fluorescencia en los segmentos vacíos precisamente; una muestra de este concepto se observa en la figura 4.2.

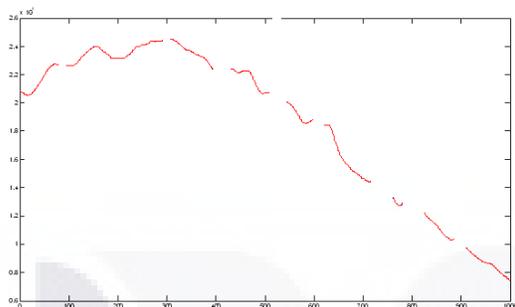


Figura 4.1. Señal Raman discontinua, con las regiones de picos removidas

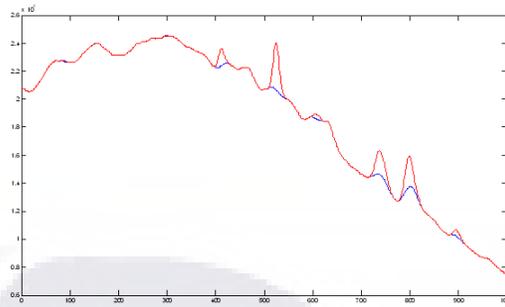


Figura 4.2. Señal Raman discontinua más interpolación de fluorescencia en las regiones removidas.

El algoritmo propuesto presentado en diagrama de bloques de la Figura 3.1, muestra la secuencia de 7 etapas que se sigue para llevar a cabo la remoción del ruido del espectro, la identificación de los picos Raman y la inferencia de dichos picos. Los resultados de las 7 etapas se presentan a continuación:

4.1 Descripción de resultados obtenidos durante el desarrollo de las etapas

4.1.1 Cargar señal Raman (Etapa 1).- En este bloque se introdujo el vector de datos que contiene la señal Raman; para realizar el análisis de cada uno de los espectros se generó un archivo el cual contiene la cantidad de espectros a los que se les desea eliminar el *ruido de HF* y de *fluorescencia*. La Figura 4.3 muestra un ejemplo de una señal Raman a ser procesada. Para manipular esta señal se carga en un vector.

4.1.2 Normalización de datos (Etapa 2).- El objetivo de realizar esta normalización es que por medio de ello se tengan la señal bajo una misma escala, esto debido a que los espectros originales se encuentran en escalas diferentes, para llegar a este objetivo se implementó el método de *interpolación lineal*, en el eje x (abscisas) se toman 1000 muestras (siendo este un valor arbitrario). Para el eje y (ordenadas) de igual forma se requiere normalizar, sólo que en este caso la escala fué de 0 a 1. Con esto se pudo trabajar de una mejor manera sobre los espectros, porque se tienen dentro del mismo rango todas las señales y se pudieron localizar apropiadamente y de igual forma la pendiente en cada señal Raman.

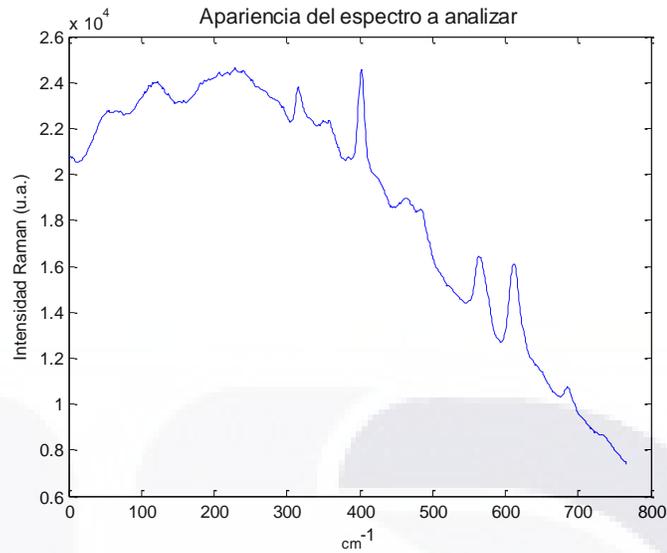


Figura 4.3 Gráfica original que arroja el análisis espectroscópico.

4.1.3 Filtrar señal (Etapa 3).- El filtro es uno de los objetivos, el tipo de filtro que se utilizó es usando la *mediana*; con este método se logró la eliminación del ruido de alta frecuencia, que en la representación del espectro no es más que esos pequeños picos que se tienen, siendo estos causa de una mala interpretación del espectro y por ende generan confusión. Cuando se aplicó el filtro de *mediana*, la señal resultante se presenta *suavizada* en el espectro.

El principio en que se basó este filtro de *mediana*, fue ir obteniendo el promedio de los valores que presenta el espectro. Este filtrado se ejecuta aun y cuando el espectro presente el *ruido de alta frecuencia* o no, y no causa desplazamiento de la señal.

Otra forma de filtrar la señal es implementando un suavizador, pero la desventaja es que se incrementa en mucho el tiempo de cómputo. No se puede implementar un filtro tipo FIR o IIR, debido a que no se tiene una frecuencia de corte generalizada para todas las señales, es decir, para cada señal se debe tener un valor de frecuencia de corte para que el filtrado de la señal sea correcto.

De los resultados obtenidos anteriormente se puede obtener el ruido que se eliminó, esto con la finalidad de saber si es que realmente la señal presentaba ruido de HF. La etapa

por la cual debe pasar para determinar si contiene ruido HF, en la Figura 4.5 se tiene una gráfica con el ruido HF eliminado en todo el espectro.

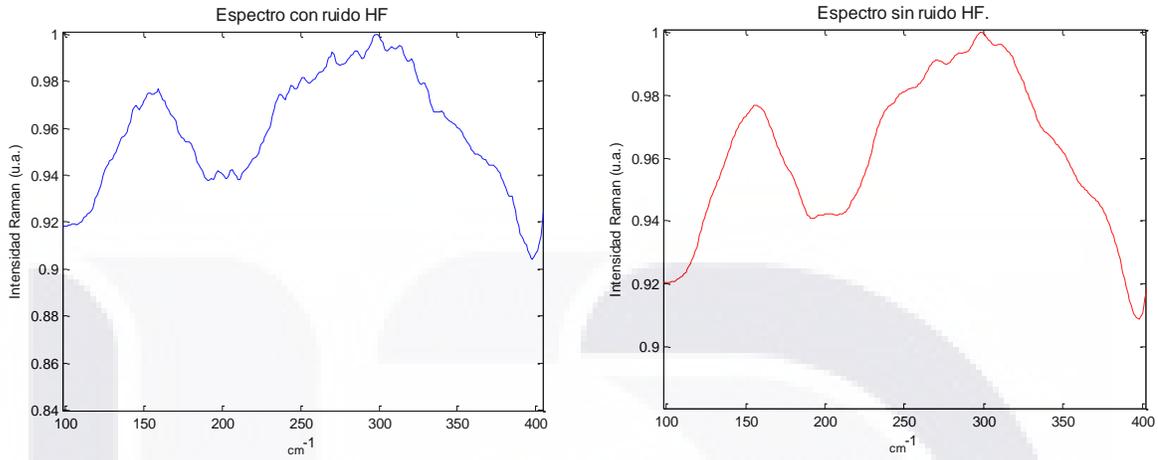


Figura 4.4 Espectro en color azul con ruido HF y el de color rojo aplicando filtro de mediana.

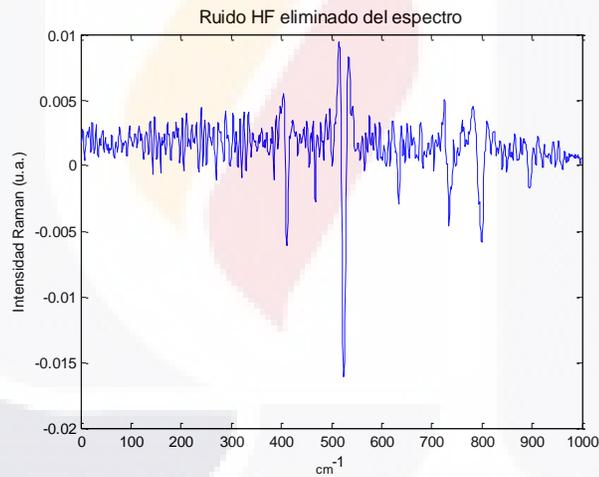


Figura 4.5 Gráfica del ruido eliminado de la señal de entrada.

4.1.4 Buscando candidatos a picos (Etapa 4).- Para continuar con el análisis del espectro, lo que se siguió fue implementar algún método que sea capaz de ir evaluando la señal resultante del filtrado. La manera en que se aborda esta parte del problema, es de la siguiente forma: para iniciar el análisis se implantará un muestreo por ventaneo, con la longitud de ventana igual a 15 muestras. Al muestrear la señal de esta manera, lo que se fue encontrando son los máximos dentro de la ventana, pero para poder irlos delimitando se

realizó una evaluación que consistió en ir considerándolo pico si es que está centrado ese valor máximo, y si se carga hacia algún costado se descartó. De esta forma se encontraron las porciones del espectro que pueden tener forma de pico, que a la postre podrían ser un pico Raman legítimo característico.

4.1.5 Evaluando para obtener picos reales (Etapa 5).- Esta etapa se dividió en dos fases:

a) Ensanchamiento de la ventana. La metodología usada para determinar si es pico o no, fue la siguiente; Inicialmente, una vez que se obtuvieron todos los posibles picos de la señal, se partió de los valores máximos adquiridos para evaluar. Se evaluó punto a punto en forma descendente el ángulo que se forma (hacia el lado derecho se va incrementando una unidad y al izquierdo se va decrementando una unidad, esto es con respecto al eje x), y si el ángulo que se tuvo está dentro del rango de 60° a -60° , se continuó evaluando y se detuvo cuando este ángulo resultante no estuvo dentro del rango establecido para el ángulo. En los puntos en que no se cumplió con la condición se almacenó, y se consideró a éstos como el inicio y término de un pico. La consideración que se tiene sobre el ángulo, es debido a que si se eligiera un ángulo menor se perdería el aspecto del pico y con ello se tendrían errores. En la figura 4.6 se puede observar lo antes explicado. Para este caso tenemos que P1 y P2 son los límites del pico, es decir, a partir de ahí no se cumple con la condición del ángulo, el recuadro rojo trata de ilustrar el ángulo que se va formando entre los puntos.

Como se puede apreciar en la gráfica de la figura 4.6, el inicio y final de un pico no tienen la misma altura, se implementó un criterio de igualación en estos puntos tomando como referencia el valor más pequeño (el resultado fue un pico con la misma altura por ambos lados), o tomar los valores que se tienen originalmente.

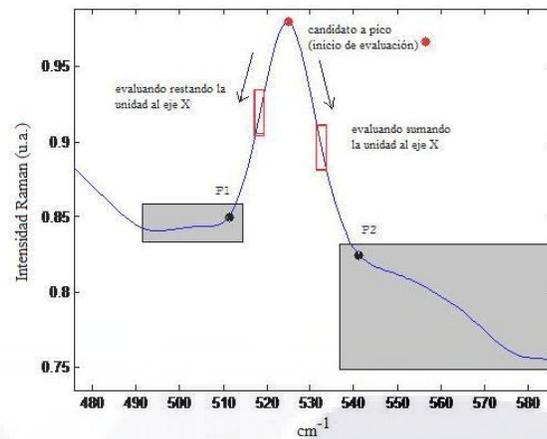


Figura 4.6. Ejemplificando la evaluación de los picos

b) Determinación del pico Raman. La forma en que se determinó cuál de los posibles picos que encontramos en la primera fase es un pico Raman, es mediante la *razón de aspecto* (R.A.). Es decir, se obtuvieron la anchura y altura del posible pico, estos valores se

obtuvieron de la fase 1, se le aplicó la relación siguiente: si $R.A = \frac{\text{alto}}{\text{ancho}} \geq 0.6$, se le consideró como pico Raman, en caso de valor diferente a esa consideración no fue pico Raman. Para llevar a cabo esta consideración de 0.6, es importante la normalización de la señal, si no hubiésemos realizado ese paso no se podría llevar a cabo la R.A.

Una vez que se concluye con las dos fases, se tuvieron los picos Raman de la señal, pero que aún presentan el problema de la fluorescencia (f), que mediante ANFIS se eliminó.

4.1.6 Configuración de ANFIS desarrollada (Etapa 6).

ANFIS es el pre editor usado para la unión de los puntos en donde se considera que inicia y termina algún pico del espectro. Se construyó una red adaptativa que es funcionalmente equivalente al modelo difuso de Sugeno. La arquitectura ANFIS para este modelo difuso de Sugeno de primer orden es transparente y eficaz.

La estructura de la red se inicializa de la forma indicada en la tabla 8; La representación de dicha red se encuentra en la figura 3.2, mientras que el conjunto de reglas del sistema difuso respectivo se describieron en la sección correspondiente.

El procedimiento para aplicar ANFIS fue el siguiente:

- a) Preparación de datos.
- b) Entrenamiento de ANFIS
- c) Predicción del ruido de f en las regiones v con pico Raman.

Se explicará a continuación cada uno de estos pasos.

a) Preparación de datos. En lo sucesivo a un vector que contenga una señal se le conocerá como y , o salida, y al respectivo vector de valores del eje x , se le conocerá como x , o entrada. Estas definiciones permiten establecer el conjunto de entrenamiento del sistema ANFIS; la figura 4.7 muestra un bloque ANFIS con las respectivas entradas y salidas, así como los vectores columna que conforman los pares de datos de entrenamiento de ANFIS.

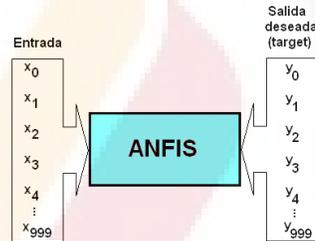


Figura 4.7 Conjunto de entrenamiento para ANFIS

Al iniciar la red ANFIS, los parámetros de las funciones de membresía se establecen de modo que éstas ocupen todo su universo de discurso; la figura 4.8 muestra los conjuntos difusos iniciales de A_1 , A_2 y A_3 , en el universo de discurso propuesto, así como los parámetros iniciales de los mismos.

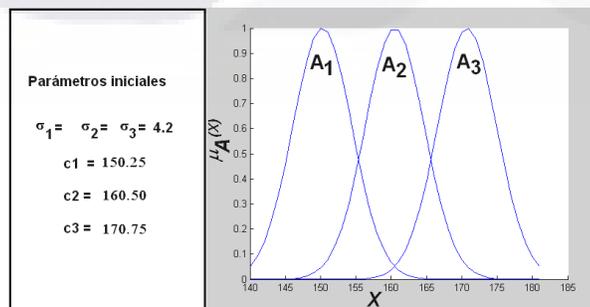


Figura 4.8 Conjuntos difusos de la red ANFIS

La expresión del k-ésimo conjunto difuso A_k , es: $A_k = e^{-\left(\frac{x-c}{\sigma}\right)^2}$ (Ec. 7)

en donde: σ , parámetro que controla la anchura del conjunto difuso; c , parámetro que controla la posición relativa del conjunto difuso respecto al eje x .

Entonces, posterior a la determinación de los picos, se almacenan en un vector las amplitudes correspondientes de la señal Raman, removiendo los segmentos donde se detectaron los picos, siendo éstos la base para el funcionamiento de ANFIS; la gráfica que se tiene para el entrenamiento es como la que se muestra en la figura 4.9.

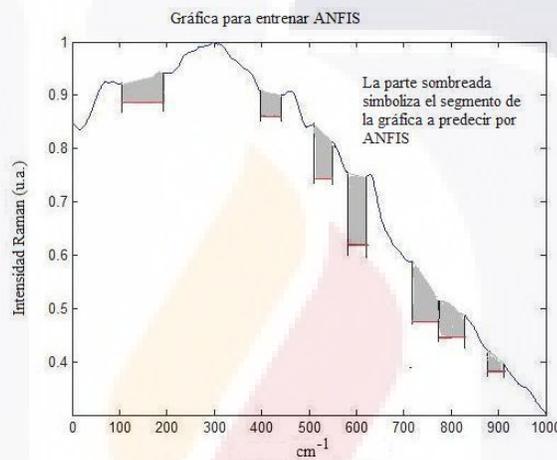


Figura 4.9 Gráfica continua con los valores del inicio y final de cada pico.

b) Entrenamiento de ANFIS. Para el conjunto de entrenamiento se ha optado por seleccionar una porción de un espectro Raman.

Los valores requeridos para el entrenamiento son dos: el rango en el cual no se presenta pico Raman en el eje de las abscisas (x) que va de 140 a 181 como variable de entrada y la amplitud (y) como variable de salida o target que presenta el pico Raman. En el intervalo mencionado existe un pico Raman en el rango de abscisas de 151 a 161. Los vectores respectivos son:

$$x = [140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181]^T$$

$$y = [0.9636 0.9650 0.9663 0.9675 0.9686 0.9697 0.9707 0.9715 0.9723 0.9729 0.9735 0.9742 0.9732 0.9719 0.9706 0.9695 0.9683 0.9668 0.9653 0.9639 0.9626 0.9614 0.9602 0.9591 0.9581 0.9572 0.9565 0.9557 0.9548 0.9537]^T$$

Enseguida se presentan resultados significativos del proceso de inicialización y entrenamiento de la red ANFIS.

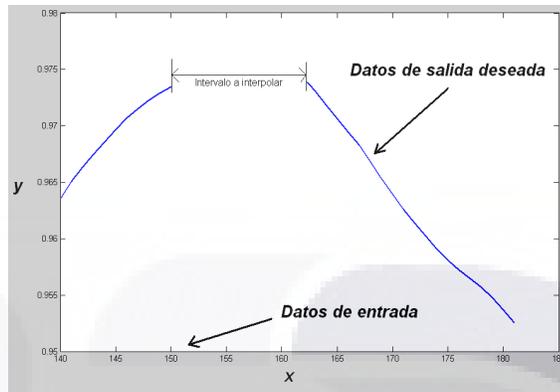


Figura 4.10 Conjunto de entrenamiento para ANFIS

Fase de propagación hacia adelante: La capa 1, (ver figura 3.2), recibe el vector x en lote, y calcula la pertenencia $\mu_{A_k}(x)$ de cada x_i a cada función de membrecía A_k ; la capa 2 (capa Π) realiza el producto difuso de sus entradas, pero al haber sólo una entrada, el antecedente está formado por una única condición (si x es...), por lo tanto la salida de esta capa es igual a la salida de la capa 1, esto es, $w = \mu_{A_k}(x)$. En la capa 3 se normaliza cada elemento $w_{i,j}$ de w a la suma $w_{i,1}+w_{i,2}+w_{i,3}$; la tabla 9 resume los resultados del proceso de las capas descritas para los primeros 10 valores de la señal de entrada x .

Tabla 9. Corrida de propagación hacia delante de ANFIS para x_1 a x_{10} .

i	x_i	Pertenencia*, Π^*			\bar{w}		
		$\mu_{A1}(x)$	$\mu_{A2}(x)$	$\mu_{A3}(x)$ **	\bar{w}_1	\bar{w}_2	\bar{w}_3 **
1	140	0.0509	0.0000	0.0000	0.9999	0.0001	0.0000
2	141	0.0885	0.0000	0.0000	0.9998	0.0002	0.0000
3	142	0.1453	0.0001	0.0000	0.9996	0.0004	0.0000
4	143	0.2254	0.0002	0.0000	0.9992	0.0008	0.0001
5	144	0.3305	0.0004	0.0002	0.9987	0.0013	0.0005
6	145	0.4578	0.0011	0.0007	0.9976	0.0024	0.0015
7	146	0.5993	0.0026	0.0029	0.9957	0.0043	0.0048
8	147	0.7413	0.0057	0.0114	0.9924	0.0076	0.0152

9	148	0.8663	0.0119	0.0425	0.9864	0.0136	0.0484
10	149	0.9567	0.0236	0.1502	0.9760	0.0240	0.1532

En la tabla 9, la columna x_i es el valor individual de la entrada; la columna de pertenencia (μ) y producto difuso (Π) muestran la pertenencia de los valores x_i a cada conjunto de entrada; la fuerza o peso de disparo de cada regla w_i para este caso particular es igual a $\mu_{A_i}(x)$, por lo que no se exponen en la tabla. Por último, en la columna \bar{w} se encuentran las fuerzas de disparo normalizadas.

La siguiente etapa de la fase de propagación hacia adelante involucra a las capas 4 y 5, e implica resolver el sistema de ecuaciones lineales:

$$\bar{w}_1 f_1 + \bar{w}_2 f_2 + \bar{w}_3 f_3 = f \tag{Ec. 8}$$

En la cual f_1, f_2 y f_3 , son las descritas en las reglas del sistema difuso mencionadas al inicio de la explicación de esta etapa 6, por lo que la ecuación puede reescribirse matricialmente como:

$$\begin{aligned} \bar{w}_1(p_1x + q_1) + \bar{w}_2(p_2x + q_2) + \bar{w}_3(p_3x + q_3) &= T \\ \bar{w}_1p_1x + \bar{w}_1q_1 + \bar{w}_2p_2x + \bar{w}_2q_2 + \bar{w}_3p_3x + \bar{w}_3q_3 &= T \end{aligned} \tag{Ec 9}$$

$$\begin{bmatrix} \bar{w}_1x + \bar{w}_1 + \bar{w}_2x + \bar{w}_2 + \bar{w}_3x + \bar{w}_3 \\ p_1 \\ q_1 \\ p_2 \\ q_2 \\ p_3 \\ q_3 \end{bmatrix} = T, \text{ que tiene la forma : } A\theta = T.$$

En la cual f se sustituyó por la salida deseada T . Para encontrar P y Q , obsérvese que $\theta = [P ; Q]^T$, y entonces (9) puede resolverse mediante el estimador MSE, como sigue:

$$\hat{\theta} = (A^T A)^{-1} A^T y \tag{Ec. 10}$$

Continuando con la ejemplificación, se aplica la ecuación (10) y se obtienen los valores de P y Q de la tabla 10.

La suma del error al cuadrado entre la salida deseada T , y la salida del sistema ANFIS, es de $2.979766593176202e^{-006}$ ($3e^{-6}$); este error es utilizado por el algoritmo de retro-propagación como señal de error de la capa de salida a la previa, y con ello se inicializa el

proceso de retro propagación del error para ajustar cada elemento entrenable de la capa 1 de la red ANFIS; ése es el tema de la siguiente sub sección.

Tabla 10. Primera estimación de los parámetros lineales P y Q.

Parámetro	Valor
p_1	0.00098208717961
q_1	0.82678394851996
p_2	-0.00027753790845
q_2	1.01888140570804
p_3	-0.00095894910259
q_3	1.12616038701525

En la fase de retro propagación, el error es de aproximadamente $3e^{-6}$, de la fase de propagación hacia delante, es el error inicial y se retro-propaga a las capas precedentes de la red ANFIS; de la capa m se retro-propaga una porción del error hacia la capa m-1; así, de la capa 5 a la 4 hay una señal de error ε_{5-4} , de la 4 a la 3 la señal es ε_{4-3} , y así sucesivamente, hasta llegar a la señal de error ε_{2-1} . Ésta última es la que se usa para ajustar los elementos entrenables no lineales de la capa 1, que son los parámetros σ y c de los conjuntos difusos A_k , y la regla delta indica la cantidad de ajuste que hay que hacer a dichos parámetros. En general, la ecuación de actualización (regla delta) es:

$$\alpha^k = \alpha^{k-1} + \Delta\alpha, \quad \Delta\alpha = -\eta \frac{\partial^+ E}{\partial \alpha}$$

(α es el parámetro a actualizar). En general:

$$\frac{\partial^+ E}{\partial \alpha} = \varepsilon_{m,m-1} \frac{\partial f_{m,m-1}}{\partial \alpha} \quad \text{y} \quad \varepsilon_{m,m-1} = \frac{f_{n+1}}{dx_i} + \sum_{i < j \leq n} \varepsilon_j \frac{\partial f_j}{\partial x_i} \quad (\text{Ec. 11})$$

En donde η es el coeficiente de aprendizaje (en este caso, fijado a 0.5), α es el parámetro genérico a ajustar, E, es el gradiente del error o vector gradiente del error, que indica en qué sentido debe hacerse el ajuste al parámetro α (+ ó -). Las señales de error y los ajustes para las funciones de membrecía A1, A2 y A3, se muestran en la tabla 12. Cada parámetro no lineal es ajustado con el respectivo incremento.

Tabla 11. Señal de error e incrementos de los parámetros no lineales.

Elemento	Valor
$\varepsilon_{2-1,1}$	0.70130495843930
$\varepsilon_{2-1,2}$	-0.00009246332232
$\varepsilon_{2-1,3}$	0.00000000003158
$\Delta\sigma_1$	5.061675475029995e-006
$\Delta\sigma_2$	-3.519487749369613e-013
$\Delta\sigma_3$	9.237134301371558e-026
Δc_1	-2.074052389768388e-006
Δc_2	7.210657827976770e-014
Δc_3	3.694058657507537e-020

Convergencia

El proceso descrito en las fases de propagación hacia delante y de retro-propagación hasta un cierto número de iteraciones (10000 en este caso) y/o hasta que el error disminuya hasta un valor específico. La figura 4.11 muestra el aspecto final de las funciones de membresía y el comportamiento convergente de la suma del error cuadrático. El error muestra una tendencia decreciente en las 10000 iteraciones. Las funciones de membresía no son simétricas ni se encuentran centradas en la posición que tenían al principio del proceso.

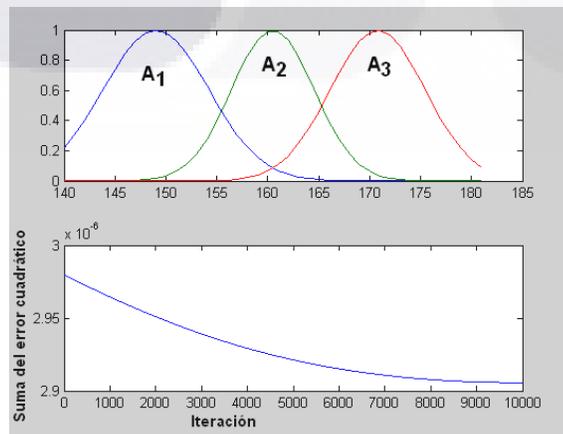


Figura 4.11 Funciones de membresía finales y suma del error cuadrático.

La figura 4.12 muestra el resultado final en tres gráficas; la primera, formada por diamantes, muestra los valores de salida de ANFIS en el conjunto de entrenamiento, la cual tiene sentido si se compara con la segunda, la de puntos, que es la salida deseada o T. Se aprecia que ambas gráficas son coincidentes. Finalmente, a cuadros y en la parte superior, se encuentra la gráfica de la salida interpolada equivalente al ruido de fluorescencia de la señal Raman.

Por último, un comparativo de los valores de los parámetros lineales y no lineales se resume en las tablas 5 y 6; como puede verse, los valores difirieron ligeramente, sin embargo, lo suficiente para generar un resultado aceptable en la interpolación de la señal de fluorescencia.

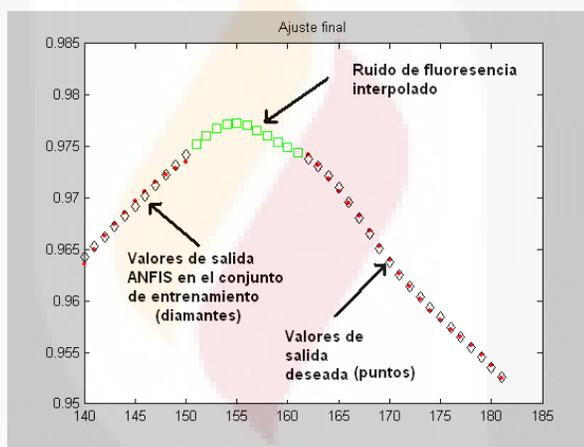


Figura 4.12 Resultado final con la señal de fluorescencia interpolada.

El entrenamiento de ANFIS se efectuó con Matlab (Matlab, 2007); aparte de los datos de la señal Raman, se necesita ingresar a Matlab la cantidad de épocas deseadas para que efectúe la predicción con mayor exactitud. Entre mayor sea el número de épocas, menor será el error que se presente aunque por otra parte se incrementará el tiempo computacional en que se lleva a cabo el entrenamiento.

Es importante realizar pruebas entre un entrenamiento largo y uno corto, con la finalidad de ver si es que existe una diferencia considerable en los resultados de entre dichos entrenamientos. En la tabla 8 se presenta los parámetros para el entrenamiento de ANFIS.

Tabla 12. Parámetros lineales antes y después del aprendizaje.

Parámetro	Valor Inicial	Valor final
p_1	0.00098208717961	0.00098906198966
q_1	0.82678394851996	0.82579756989415
p_2	-0.00027753790845	-0.00016774649854
q_2	1.01888140570804	1.00094692604090
p_3	-0.00095894910259	-0.00096473873790
q_3	1.12616038701525	1.12719967329014

Tabla 13. Parámetros no lineales antes y después del aprendizaje

Parámetro	Valor Inicial	Valor final
σ_1	4.2	5.18925187887153
σ_2	4.2	4.04621930516700
σ_3	4.2	4.65371796688808
c_1	150.25	149.022819953448
c_2	160.50	160.496302181620
c_3	170.75	170.793979233140

Tabla 14. Parámetros de ANFIS

Parámetros de ANFIS	Valores proporcionados			
Tipo de función	Gaussiana			
Número de funciones de membresía	30			
Número de épocas	10	100	500	1000
Tiempo de entrenamiento (mint.)	0.40	1	5	9

c) Predicción del ruido de fluorescencia en las regiones de ν con pico Raman. Una vez que se entrenó ANFIS se tiene una gráfica como la que se muestra en la figura 4.13, en la cual se puede observar la predicción de la *fluorescencia*. El área sombreada es la parte predicha por ANFIS.

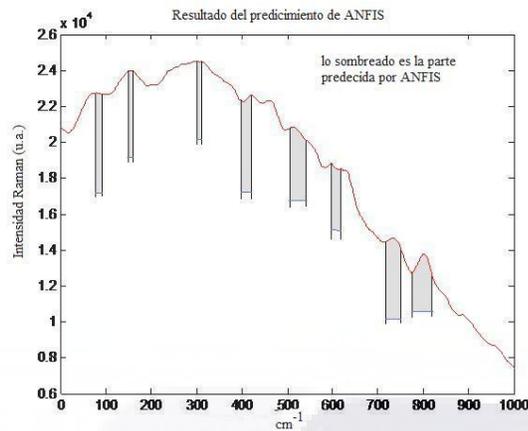


Figura 4.13 Gráfica resultante del entrenamiento de ANFIS.

4.1.7 Obtención del espectro (Etapa 7).- Esta es la parte culminante del algoritmo, en la cual se tiene que realizar un empalme entre la gráfica del espectro con ruido y la obtenida de ANFIS. Con ellos se tiene que efectuar una resta de las señales como se tiene en la expresión: $E_r = S_r - f$, por medio de la figura 4.14 se puede ver esta etapa.

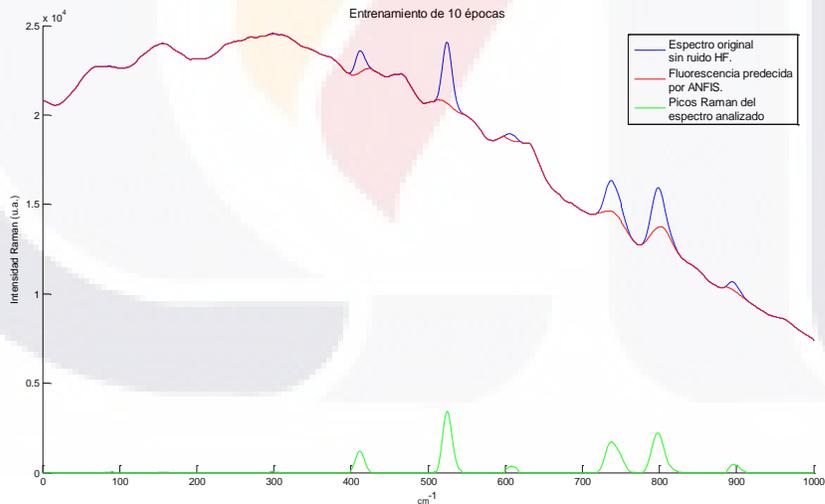


Figura 4.14 Gráfica de resultado final.

Dentro de la figura 4.14 se tienen tres gráficas, las cuales se hace mención acerca de lo que trata cada una de ellas. La de color rojo describe al espectro que se obtiene de aplicarle el filtrado de ruido de alta frecuencia, el color azul representa el resultado obtenido del entrenamiento de ANFIS para finalmente obtener la gráfica de color verde,

siendo está el resultado deseado. Por que únicamente se tienen los picos Raman del espectro, por medio de los cuales se puede realizar una interpretación más exacta.

4.2 Conclusiones finales

Las herramientas tecnológicas fundamentadas en inteligencia artificial aplicadas en ciencia exactas buscan diseñar constantemente nuevos métodos y/o propuestas para el campo de la medicina, biología, química, etc. Es por ello que en este proyecto se relaciona la IA con la bioquímica de las células dañadas con cáncer o con retrovirus. Es indudable que las enfermedades causadas por microorganismos como los virus han afectado en gran medida a los órganos que infectan desde hace mucho tiempo, tanto a animales como a humanos; pero se ha incrementado de forma alarmante la forma como dichos microorganismos han afectado al ser humano, causando cáncer o SIDA, caso específico el virus VIH causante del Sida y el HTLV-1 causante de leucemias. Este trabajo es un intento de descubrir nuevos conocimientos que apoyen el quehacer científico y contrarrestar la creciente tasa de morbilidad y mortalidad, principalmente en seres humanos. El objetivo de este trabajo como se ha mencionado, es encontrar patrones Raman definidos que revelen la presencia de relaciones estructurales escondidas en el genoma celular afectado por retrovirus como el VIH, utilizando técnicas de inteligencia artificial como sistemas neuro difusos como ANFIS compuesto de las técnicas de Lógica Difusa y Redes Neuronales.

Existen múltiples factores que favorecen la aparición de enfermedades en distintas partes del organismo humano, tal es el caso de la leucemia (enfermedad de la sangre) causada por la presencia y acción de un retrovirus, al igual que el Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) que es causado por la presencia y acción de otro retrovirus conocido como virus de la inmunodeficiencia humana conocido por sus siglas VIH, sin olvidar la creciente ola de cáncer en distintos órganos humanos como el cáncer de seno. El objetivo de este proyecto se enfoca específicamente en el estudio de señales Raman a través de los espectros Raman contenido datos que son procesados en un sistema neuro difuso llamado ANFIS, el cual extrae e infiere los picos que son característicos de las muestras de células ya sea de linfocitos del sistema inmune llamados células T-CD4 que son un tipo de leucocitos o de células de seno. Con el uso de una tecnología nueva llamada Tecnología de

Exaltación Raman de Superficie, conocida por sus siglas en inglés SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) (Shanmukh, 2008), y con apoyo de una herramienta de la Inteligencia Artificial, específicamente un sistema neuro difuso el cual es inferencial y adaptativo, compuesto por Redes Neuronales Artificiales y Lógica Difusa.

Durante el desarrollo del proyecto además de alcanzar el objetivo principal, se lograron exponer algunas contribuciones al conocimiento universal, tal es el caso de la aplicación de ANFIS en señales (datos) Raman específicamente ya mencionado anteriormente, se logra la reducción de la Dimensionalidad del proceso al obtener los picos Raman individuales y no en forma como se hace tradicionalmente, sino por fracciones del espectro; esto es una aportación muy importante.

Una tercera aportación es que se realiza la extracción de forma automática de los picos Raman puesto que no existen extractores automáticos de Picos, con el consecuente diseño del espectro patrón de la muestra. Al obtener los espectros patrón conteniendo los picos Raman característicos de la muestra, se tienen elementos para realizar una clasificación más clara, por lo que se proponen los inicios para desarrollar un método clasificador, que tendrá en un futuro un objetivo de diagnóstico.

El trabajo descrito tiene la finalidad de apoyar a los especialistas de la salud en el diagnóstico de enfermedades en etapas tempranas como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en pacientes sospechosos de portar la enfermedad en la fase de latencia, de manera rápida y a menor costo que los métodos bioquímicos tradicionales, descritos previamente en las secciones del marco teórico de este documento o como el cáncer en seno, puesto que se trabajo con datos Raman obtenidos de muestras de cáncer de mama. Es decir, el trabajo consistió, entre otras cosas, en diseñar un modelo para encontrar un patrón espectrográfico que contenga los picos Raman de una muestra de células dañadas ya sea de cáncer de seno o de linfocitos T CD-4 infectados con el genoma del Retrovirus llamado Virus de Inmunodeficiencia VIH; al identificar las relaciones estructurales del ADN ocultas, mediante la técnica de exaltación espectrofotométrica Raman y una herramienta híbrida de la inteligencia artificial llamada Sistema Adaptativo Inferencial Neuro Difuso (ANFIS).

Lo anterior se logró mediante el diseño del modelo conformado por un método que contempla 3 fases (1.- Obtención de datos Raman, 2.- Algoritmo de remoción de ruido y obtención de picos Raman característicos y 3.- Construcción del patrón espectrográfico para el diagnóstico de la enfermedad), distribuidos en 7 etapas y con metodologías novedosas en el área biológica, foto electrónica e inteligencia artificial.

La descripción rápida de las etapas que se realizaron son: en la primera etapa se introducen los datos Raman tomadas directamente de células dañadas, comprobadas por los métodos tradicionales, y provenientes del Centro de Investigaciones en Óptica. En la segunda etapa se normalizan los datos Raman, etapa importante para que el computador trabaje en forma óptima al mantener un rango estándar.

En la tercera etapa se realiza un filtrado de la señal con el objetivo de eliminar los ruidos de alta frecuencia y fluorescencia y evitar interferencia al identificar los picos Raman. En la cuarta etapa se buscan los candidatos a picos Raman, en cuanto a las amplitudes y longitudes específicas de un pico característico, de forma que el computador obtenga los candidatos a picos Raman reales. En la quinta etapa estos candidatos a picos Raman se evalúan para tener la certeza que son picos Raman reales.

La inteligencia artificial interviene en la sexta etapa, donde se utiliza el sistema adaptativo inferencial neuro difuso, llamado ANFIS, para inferir los picos Raman completos. En la última etapa con los picos identificados y completos, se construye el espectro patrón con los picos Raman específicos de la muestra en estudio.

En la última fase del modelo se diseña el patrón espectrográfico de la muestra de sangre infectada. Este trabajo termina en esta fase, puesto que se llegó a concretar el objetivo propuesto inicialmente; más sin embargo, la investigación en este ámbito no termina puesto que queda abierta para otros investigadores del área para seguir buscando patrones espectrográficos de los diferentes niveles de infección, es decir, de las diferentes etapas de desarrollo del retrovirus al entrar en el organismo humano, específicamente en los linfocitos T CD4, e identificar el nivel de daño producido y adelantarse al despertar del retrovirus al final de la fase de latencia para evitar que se presenten los síntomas característicos del SIDA en perjuicio del paciente. La visualización de estos trabajos

futuros contempla una amplia gama de oportunidades de investigación en el área de la salud, apoyada por el área electromecánica, fotoeléctrica e informática. La inteligencia artificial jugará un papel crucial en el desarrollo de la nueva ciencia a nivel molecular, Bioinformática, nanotecnología, biología molecular, etc.

4.3 Trabajo futuro

Al contar ya con el diseño del método para obtener el patrón espectrográfico conteniendo los picos Raman característicos de una muestra determinada de células dañadas e inclusive sanas, y después de haber probado dicho método con resultados satisfactorios, es decir al crear un patrón espectrográfico con los datos Raman de una muestra de dichas células; se visualiza como trabajo futuro el crear una serie de espectros patrón de muestras de células dañadas en distintas etapas, en el caso de cáncer, desde células con inicios de cáncer hasta células en metástasis (cáncer muy avanzado), identificadas y comprobadas con los métodos tradicionales ya sea bioquímicos o imagenología, etc. De igual forma obtener espectros patrón de las células de la sangre del sistema inmune, específicamente los linfocitos T CD 4 que son infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y que causa el SIDA. Esta enfermedad es difícil de detectar en el etapas tempranas como enfermedad, mas si se encuentran pocas células dañadas, se puede inferir que el SIDA estar presente en un futuro en el paciente.

Con los espectros patrón definidos, se puede realizar una clasificación más clara y a través de un sistema clasificador y un sistema inferencial se puede realizar diagnostico más preciso, rápido y menos costoso de enfermedades en etapas tempranas, trayendo como beneficio el iniciar tratamientos prematuros, con menor avance de la enfermedad, con menor costo en medicamentos y atención medica, menor tiempo de tratamiento y menor riesgo de muerte del paciente.

5. ANEXOS Publicaciones

Francisco Javier Luna Rosas, Julio Cesar Martínez, Jaime De la Torre, Miguel Mora, Alejandro Padilla. ANFIS: Fast identification of Breast Cancer. *International Conference on Bioinformatics Computational Biology*, BIOCOMP 2009, July 13-16, 2009, Las Vegas Nevada, USA, 2 Volumes 2009.

Jaime Rutilio De la Torre Sifuentes, Francisco Javier Luna Rosas, Julio Cesar Martínez, Alejandro Padilla, Miguel Mora. 2009. SERS and ANFIS: Fast Identification of the Presence of Retrovirus in CD4 Cells, Cause of AIDS. 40° *Congreso de Investigación y Desarrollo* (Monterrey, Nuevo Leon, México,. Octubre, 2009). Compendio. DR. 2009, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Impreso en México. ISBN: 978-607-501-007.

Torre, J., Luna, F., Martínez, J., Padilla, A., and Mora, M. 2008. SERS and ANFIS: Fast Identification of the Presence of Retrovirus in CD4 Cells, Cause of AIDS. In *Proceedings of the 7th Mexican international Conference on Artificial intelligence: Advances in Artificial intelligence* (Atizapán de Zaragoza, Mexico, October 27 - 31, 2008). A. Gelbukh and E. F. Morales, Eds. Lecture Notes In Artificial Intelligence, vol. 5317. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 936-947.

Torres, D., De La Torre, J., Ochoa, A., Hernández, A., Damiè M. 2008. Determining Burnout syndrome in the personal of an University. *Artificial Intelligence for Humans: Service Robots and Social Modeling*, SMIA Press, pp. 147-155, ISBN-978-607-00-0478-0.

Jaime R. De la Torre Sifuentes, Francisco Javier Luna Rosas, Alejandro Padilla Díaz, Felipe Padilla Díaz. Diseño de un sistema tutor inteligente para propiciar aprendizaje del proceso que se lleva a cabo en el desarrollo de algoritmos genéticos a través de la evaluación de tipo formativa. *Memorias del 3er Congreso Mexicano de Computación Evolutiva (COMCEV'2007)*, pages 141-147, 3-5 October, 2007, Aguascalientes, Ags., México. ISBN 970-728-055-7.

“SERS and ANFIS: Fast identification of the presence of retrovirus in CD4 cells, cause of AIDS”

Jaime De La Torre¹, Francisco Luna², Julio Martínez²
Alejandro Padilla³, Miguel Mora⁴

¹Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Aguascalientes, México
jtorre@itesm.mx

²Instituto Tecnológico de Aguascalientes, México
fjluna@ita.mx; jucemaro@yahoo.com.mx

³Laboratorio de Inteligencia Artificial, UA de Aguascalientes, México
apadilla@correo.uaa.mx

⁴Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, México
mmora@culagos.udg.mx

Abstract: The harmful presence of retrovirus in CD4 cells of the human immune system can result in the syndrome of human immunodeficiency known as AIDS, a disease that has extended widely across the entire planet. This paper proposes to obtain characteristic RAMAN spectra with specific peaks detected, eliminating the noise of high frequency (HF) and fluorescence of the signal obtained with SERS and improved with ANFIS. With the spectra cleaned of this noise (HF and fluorescence) the characteristic RAMAN spectra of each microorganism or retrovirus (HIV) in this case is defined. This method provides the specialists with important clinical tools to express an efficient diagnosis of AIDS.

Keywords: AIDS, ANFIS, Retrovirus, SERS, Simulation.

1. Introduction

The existence of several types of cancer [1], multiple factors exist that favor the appearance of cancer in different parts of the human body; in blood, two kinds of cancer appear: a) leukemia caused by the presence and action of a retrovirus (deltaretrovirus), and b) the syndrome of acquired immunodeficiency (AIDS) caused by the presence and action of another retrovirus known as human immunodeficiency virus or HIV (Lentivirus) [2]. HIV affects a type of lymphocytes (leukocytes), called CD4 cells, directly in blood (called “T” cells). HIV/AIDS is one of the most urgent threats to global public health. Some retroviruses cause cancer directly, integrating genes called *oncogenes* in the DNA of the guest cell, thus causing the malignant transformation of normal cells into cancerous cells. Others cause cancer indirectly by activating *proto-oncogen* of the guest. Oncogenic retrovirus has been studied since 1908, [3], [4], Fujinami and Inamoto [5], [6] and it constitutes the most important pathogenic agent of the last decades. The nature of the retroviral genome was discovered in the 1960’s. [7], [8]. At the moment two types of HIV are known; the HIV-1, that causes AIDS [9], and the VIH-II. Both isolated in Institute Pasteur [10], [11], [12]. The number of people living with HIV worldwide in 2007 was estimated at 33.2 million (30.3–36.1 million) [13], [14]. Worldwide, 0.8% (0.7–0.9%) of the adult population (aged 15–49 years) is estimated to be infected with HIV. Sub-Saharan Africa is the region most affected by HIV/AIDS, a total of 22.5 million in 2007. Although other regions are less severely affected, 4 million people in south and south-east Asia, 1.6 million in eastern Europe and central Asia and 1.7 million in Latin America, were living with HIV/AIDS. An estimated 63 000 (49000 – 98000) people died of AIDS last year in Latin America [13].

All over the world, several types of analyses practiced, generally in blood samples of individuals in study (also other corporal fluids samples are used), determine if an individual is or not infected with the human immunodeficiency virus (HIV) that causes AIDS. Some of these different types of analysis are: Detection of the antibodies and/or antigens of the HIV [15], [16], analysis of viral counts [17], [18], [19], [20] and counts

of CD4 and CD8 cells [21]. Recently, a new technique has been used to detect virus, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) [22].

Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) [22] phenomenon have been applied in multiple scientific areas, like Physics [23], and Chemistry [24]; applications in Biochemistry [25], [26] and specifically in the detection of virus [27], [28]. SERS was used to obtain a Raman spectra of the chains (*A1/long*, *B1* and *A2*) of the syncytial respiratory virus (*SRV*), cause of a type of gripe [27], where this study presents a high index of reproduction, and the time required to obtain results is very short compared to other traditional biochemical analyses mentioned previously. The difference is from hours to seconds. These spectra can be improved using ANFIS (Adaptative Neuro Fuzzy Inference System), a combination of Neuronal Networks (NN) and Fuzzy Logic (FL), which are tools of Artificial intelligence.

ANFIS has been applied in some areas like Architecture [29], in automotive industry [30], in Biochemistry [31], and in Medicine [32], [33], [34].

This paper proposes to obtain characteristic RAMAN spectra with specific peaks detected, eliminating the noise of high frequency (HF) and fluorescence of the signal obtained with SERS. With the spectra cleaned off this noise (HF and fluorescence) the characteristic RAMAN spectra of each microorganism or retrovirus (HIV) is defined. It is important to make clear that, at present, we have not conducted experiments to acquire SERS signals because of the lack of the appropriate technology, and that most of our effort has been focused on the usage of artificial intelligence to a) clean up Raman signals –noise removal-, b) recognize Raman Peaks and, c) classify spectra into healthy or infected cells (the latter not reported here for HIV); the results are valid since SERS and non-SE Raman Spectroscopy produce the same kind of spectra, from a signal analysis perspective. The Raman spectra we have used so far are also of the biological type, i.e., spectra from the biopsy of breast cancer intended to detect it. In the sequel, what the work consists of will be explained.

2. Antecedents

2.1. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and virus detection.

Raman Spectroscopy is a high-resolution technique that provides chemical and structural information of organic and inorganic compounds thus allowing its identification. [35]. The Raman spectroscopy analysis is based on the examination of the light dispersed by a material when affecting a monochrome beam of light. Most of the dispersed light presents the same frequency that the incident light, but a very small fraction displays a change in the frequency, result of the interaction of the light with the matter. The dispersed light that presents frequencies different from the incident radiation is the one that provides information on the molecular composition of the sample and is known as Raman dispersion [35]. A Raman signal is composed by the Raman spectra and two signals considered “noise” inherent to the acquisition of it: the background noise or fluorescence, and the noise of high frequency.

Considering the high index of mutation that virus presents, the efficient detection of these organisms is fundamental to prevent diseases and later epidemics. [28], [22]. With the RAMAN technology improved with the use of silver nanorods, Yiping Zhao et al. from the University of Georgia in the USA have reported that they found the spectra of different types of virus [38], as Adenovirus, Rhinovirus and VIH spectra.

This is an important advance in the field of medicine. A rapid and effective diagnosis of the presence of these microorganisms in the human being will favor the rapid medical prescription and therefore decrease the morbidity and mortality in the population.

2.2. ANFIS Architecture

Adaptative Neuro Fuzzy Inference System (ANFIS) is an architecture such as functionally equivalent to diffuse inferential systems (fuzzy), that means, is equivalent to the type of diffuse rules based on Takagi and Sugeno. Some parameters allow establishing the set of training of ANFIS system, and some common rules presented by the fuzzy model of first order by Sugeno are needed [38], [39], [40]. It is important to consider that the ANFIS structure is one of a network with trainable parameters, the reason why the delta rule algorithms and backpropagation of the error is applicable [41]. ANFIS architecture is an interconnected network of a fuzzy system model Takagi-Sugeno of first order, with all its components: fuzzification, inference and defuzzification. [41]

3. Materials, Methods and Results

3.1. Removal of noise algorithm. Model proposed. Description of the algorithm

As it has been mentioned, a Raman signal is composed of the Raman spectra and two inherent signals of noise, the background noise or fluorescence and the noise of high frequency. The adopted strategy is based on determining the presence of possible peaks (maximums with certain morphologic characteristics) in the Raman Signal, isolating the regions (number of waves) in which these peaks happen, and to retain the outside noise of fluorescence in these regions, so that a continuous signal (outlines) is obtained (figure 1). This signal is composed of separated continuous sections with empty segments; the objective of the ANFIS system consists on determining a possible form (by interpolation) of the signal of fluorescence in the empty segments indeed; a sample of this concept is observed in figure 2. The sequence that is followed to remove the noise of the spectra implies the next 7 stages (see figure 3).

Stage 1. Loading Raman Signal. In this block the vector of data containing the Raman signal is introduced; a file containing the spectra data is generated, which is desired to eliminate the noise of HF and fluorescence. Figure 4 shows a Raman signal example to be processed.

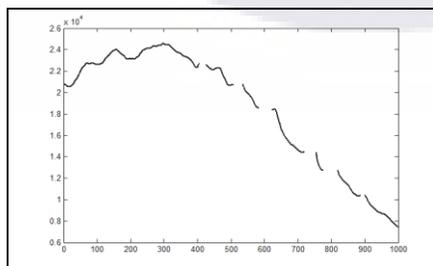


Fig. 1. Discontinuous Raman signals, with the removed regions of peaks

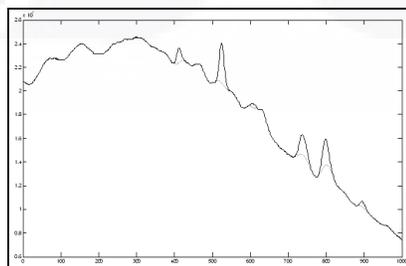


Fig. 2. Discontinuous Raman signal, fluorescence in the removed regions

Stage 2. Normalizing the graph. The idea of making this normalization is to have the signal under the same scale, because the original spectra are in different scales. To reach this objective it was necessary to

implement the method of linear interpolation, in x-axis taking 1000 samples (being this an arbitrary value). It is similarly required for the y-axis to be normalized, in this case the scale is from 0 to 1.

This is a better way to work on the spectra, because all the signals are in the same scale and the slope in each Raman signal will be able to be located appropriately and similarly.

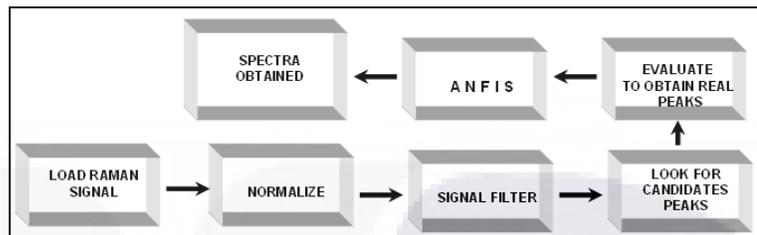


Fig. 3. Sequence of the designed Program to remove the Raman signal's noise

Stage 3. Signal filtering. Filtering is one of the objectives. The type of filter that is used is the “median”. With this method, the elimination of the noise of high frequency is obtained. In the representation of the spectra, those small peaks that are found, can cause a bad interpretation of the spectra and therefore generate confusion. Figure 5 shows a graph with HF noise eliminated in all the spectra.

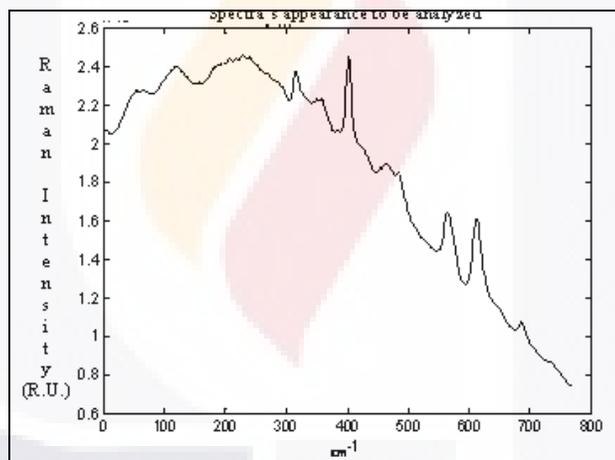


Fig. 4. Original graph obtained by spectroscopic analysis

Stage4. Looking for peaks candidates. In order to continue with the spectra analysis, some method that is able to evaluate the resulting signal of the filtration is handled. The way in which this part of the problem is approached is the following: in order to initiate the analysis, a sampling method named “windowing” will be implanted, with the window length equal to 15 samples. By sampling the signal this way, what we find are the maximums within the windows; but in order to set them a limit an evaluation will be done. This evaluation will consider them as Raman peaks if they are centered within that maximum value; if they lean towards a flank they will be discarded. Through this method we can detect the portions of the spectra which may have the shape of a peak, which might later turn to be a characteristic legitimate Raman peak.

Stage 5. Evaluating to obtain real peaks. This stage will be divided in two phases:

a) Widening of the window. The used methodology to determine whether it is peak or not, is the following; firstly, once all the possible peaks of the signal are obtained, the maximum values acquired are taken for

evaluation. Point to point is evaluated descending from the angle that it forms (towards the right side a unit is increased and to the left one a unit is decreased, this is with respect to x-axis), and if the angle is between 60° to -60° , the evaluation continues and it stops when this resulting angle is not within the rank established. In the points in which the condition is not fulfilled, it is stored, and these are considered as the beginning and term of a peak. If a smaller angle were chosen it would lose the aspect of the peak and the errors would appear. In figure 6 it is possible to observe what is being explained. For this case P1 and P2 are the limits of the peak, that means, the condition of the angle is not fulfilled from it; the little box tries to illustrate the angle that is formed between the points.

As it can be shown in the graph of figure 6, if the beginning and end of a peak do not have the same height a criterion of equalization in these points taking the smallest as reference value (the result will be a peak with the same height in both sides), or taking the original values can be implemented.

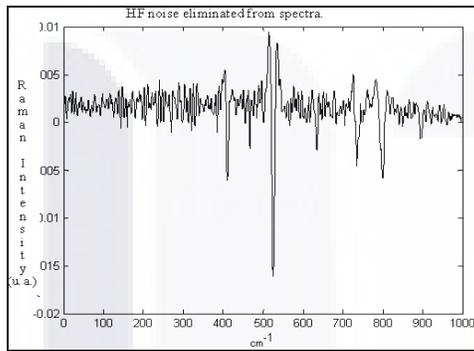


Fig. 5. Graph of the eliminated noise of the input signal

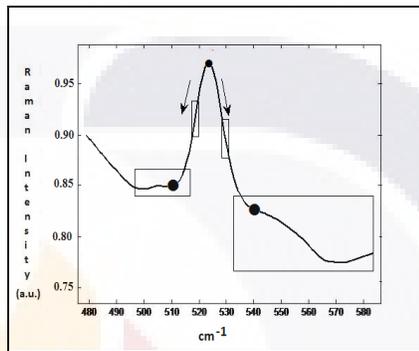


Fig. 6. Evaluation of the Peaks

b) Determining the Raman peak. The way to know if the peaks found in the first stage are determined as Raman peaks is by means of the *aspect reason (A.R.)*. So, the width and height of the possible peak are obtained. These values are obtained from phase 1, and the following relationship is applied: If, $A.R. = \text{height/width} \geq 0.6$ it is considered a Raman peak, in case of a different value from that relationship it is not a Raman peak. Once the two phases conclude, we have the Raman peaks of the signal, but they still present the problem of the fluorescence (f), which by the use of ANFIS will be eliminated.

Stage 6. ANFIS, developed configuration. ANFIS is used in the union of the points where some peak of the spectra initiate and finish. An adaptive network was constructed, functionally equivalent to the Sugeno's fuzzy model. The ANFIS Architecture for this Sugeno's fuzzy model of first order is transparent and effective, figure 7 shows this network

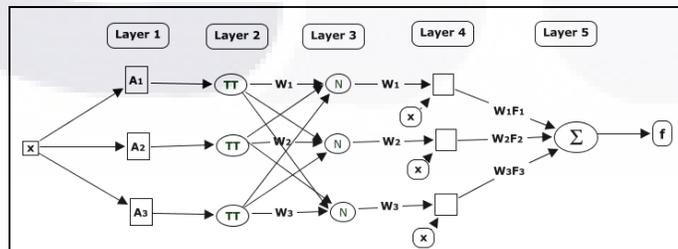


Fig. 7. ANFIS network Structure: One input, three rules, one output

The procedure to apply ANFIS will be explained step by step:

a) Preparation of data. For explanatory aims, a vector that contains a signal will be known as y , or output, and the vector of values of x-axis will be known as x , or input. These definitions allow us to establish the set of training of ANFIS system; figure 8 shows an ANFIS scheme with the respective inputs and outputs, as well as the column vectors that form the pairs of data of ANFIS training.

b) Training of ANFIS. For the training set, a portion of Raman spectra has been selected. The values required for the training are two: the scale in which Raman peak does not appear in the x-axis that goes from 140 to 181 as input variable and the amplitude y as output variable or target that presents the Raman peak. In the mentioned interval a Raman peak exists in the x-axe from 151 to 161. The respective vectors are:

$$\mathbf{x} = [140 \ 141 \ 142 \ 143 \ 144 \ 145 \ 146 \ 147 \ 148 \ 149 \ 150 \ 162 \ 163 \ 164 \ 165 \ 166 \ 167 \ 168 \ 169 \ 170 \ 171 \ 172 \ 173 \ 174 \ 175 \ 176 \ 177 \ 178 \ 179 \ 180 \ 181]^T$$

$$\mathbf{y} = [0.9636 \ 0.9650 \ 0.9663 \ 0.9675 \ 0.9686 \ 0.9697 \ 0.9707 \ 0.9715 \ 0.9723 \ 0.9729 \ 0.9735 \ 0.9742 \ 0.9732 \ 0.9719 \ 0.9706 \ 0.9695 \ 0.9683 \ 0.9668 \ 0.9653 \ 0.9639 \ 0.9626 \ 0.9614 \ 0.9602 \ 0.9591 \ 0.9581 \ 0.9572 \ 0.9565 \ 0.9557 \ 0.9548 \ 0.9537]^T$$

The distribution of these values in x, y-axes are shown in figure 9. Immediately significant results of the process of starting and training of network ANFIS appear.

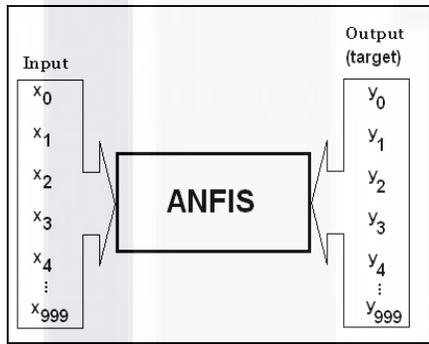


Fig. 8. Training Set for ANFIS

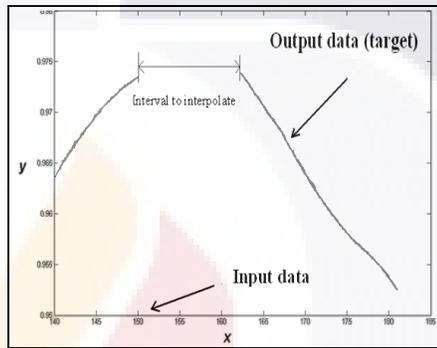


Fig. 9. Training Set for ANFIS

Phase of forward propagation: layer 1, (see figure 7), receives the vector \mathbf{x} in lot, and calculates the degree of membership $\mu_{A_k}(\mathbf{x})$ of each x_i in each membership function A_k ; layer 2 (layer II) makes the fuzzy product of the inputs, but to be only one input, the antecedent is formed by an only condition (if x is...), therefore the output of this layer is equal to that of layer 1; $w = \mu_{A_k}(\mathbf{x})$.

In layer 3 every element $w_{i,j}$ is normalized from w to the sum $w_{i,1} + w_{i,2} + w_{i,3}$; table 2 summarizes the results of the layers process described for the first 10 values of the \mathbf{x} input signals. In table 1 column x_i is the individual value of the input; the membership column (μ) and fuzzy product (Π) show the grade of membership of x_i values to each set of inputs; the firing strength or weight of firing of each rule w_i for this particular case is equal to $\mu A_i(x)$, reason why they are not exposed in the table.

Finally, in column \bar{w} the normalized firing strength is found. The following stage of the phase of forward propagation involves layers 4 and 5, implying to solve the (1) linear equations system. In which f_1, f_2 and f_3 are described in the formerly mentioned rules of the fuzzy system at the beginning of the explanation of this stage 6, reason why the equation can be rewritten as a matrix (see equation (2))

$$\bar{w}_1 f_1 + \bar{w}_2 f_2 + \bar{w}_3 f_3 = f. \tag{1}$$

Table 1. Some data of run of propagation of ANFIS for x_1 to x_{10}

I	x_i	Grade of membership*, Π^*			\bar{w}		
		$\mu_{A1}(x)$	$\mu_{A2}(x)$	$\mu_{A3}(x)**$	\bar{w}_1	\bar{w}_2	$\bar{w}_3 **$
1	140	0.0509	0.0000	0.0000	0.9999	0.0001	0.0000
2	141	0.0885	0.0000	0.0000	0.9998	0.0002	0.0000
3	142	0.1453	0.0001	0.0000	0.9996	0.0004	0.0000
6	145	0.4578	0.0011	0.0007	0.9976	0.0024	0.0015
10	149	0.9567	0.0236	0.1502	0.9760	0.0240	0.1532

In which f was replaced by the output (target) T. In order to find P and Q, see that $\theta = [P ; Q]^T$, and then (2) can be solved by the estimator SE, as it follows:

$$\overline{w_1 x + w_1} + \overline{w_2 x + w_2} + \overline{w_3 x + w_3} \begin{bmatrix} p_1 \\ q_1 \\ p_2 \\ q_2 \\ p_3 \\ q_3 \end{bmatrix} = T. \tag{2}$$

$$\hat{\theta} = (A^T A)^{-1} A^T y. \tag{3}$$

Continuing with the exemplification, the equation (3) is applied and the values of P and Q are calculated. (See table 2).

Table 2. First estimation of the linear parameters P and Q

Parameter	Value
p_1	0.00098208717961
q_1	0.82678394851996
p_2	-0.00027753790845
q_2	1.01888140570804
p_3	-0.00095894910259
q_3	1.12616038701525

The sum of the square error between the output (target) T, and the output of ANFIS system, is $2.979766593176202e^{-006}$ ($3e^{-6}$); this error is used by the back propagation algorithm as signal of error of the layer from output to the previous one, and with it starts the process of back propagation of the error to fit each trainable element of layer 1 of the ANFIS network; that one is the subject of the following subsection.

In the back propagation phase, the error of approximately $3e^{-6}$ now is the initial error, and it is back propagated to the preceding layers of the ANFIS network, from layer m, a portion of the error is back propagated to layer m-1; thus, from layer 5 to 4 there is an error signal $\varepsilon_{5,4}$, from 4 to 3 the signal is $\varepsilon_{4,3}$, and so on, until reaching error signal $\varepsilon_{2,1}$. This last one is used to fit the nonlinear trainable elements of layer 1, where

σ and c are the parameters of the fuzzy sets A_k , and the delta rule indicate the amount of adjustment that is necessary to do to these parameters. In general, the update equation (rule delta, and σ is the parameter to be updated) is:

$$\frac{\partial^+ E}{\partial \alpha} = \varepsilon_{m,m-1} \frac{\partial f_{m,m-1}}{\partial \alpha} \quad \text{y} \quad \varepsilon_{m,m-1} = \frac{f_{n+1}}{dx_i} + \sum_{i < j \leq n} \varepsilon_j \frac{\partial f_j}{\partial x_i} \quad (4)$$

where η is the learning coefficient (in this case, fixed to 0.5), α is the generic parameter to adjust, E is the gradient of the error or vector of the error gradient, that indicates in what sense the adjustment to the parameter α (+ ó -) must be. The signals of error and the adjustments for the memberships functions A_1 , A_2 and A_3 , are in table 3. Each non linear parameter is fit with the respective increase.

Table 3. Signal of error and increases of the nonlinear parameters.

<i>Element</i>	<i>Value</i>
$\varepsilon_{2-1,1}$	0.70130495843930
$\varepsilon_{2-1,2}$	-0.00009246332232
$\varepsilon_{2-1,3}$	0.00000000003158
$\Delta\sigma_1$	5.061675475029995e-006
$\Delta\sigma_2$	-3.519487749369613e-013
$\Delta\sigma_3$	9.237134301371558e-026
Δc_1	-2.074052389768388e-006
Δc_2	7.210657827976770e-014
Δc_3	3.694058657507537e-020

3.2 Convergence

The described process in the propagation and back propagation phases continues until certain number of iterations (10000 in this case) and/or until the error diminishes to a specific value.

c) Prediction of the fluorescence noise in the regions ν with Raman peak. When ANFIS was trained, in figure 10 the prediction of the fluorescence can be observed. The shaded area is the part that is predicted by ANFIS.

Stage 7. Obtaining the spectra. This is the culminating part of the algorithm, in which it must make a joint between the graph of the spectra with noise and the obtained one from ANFIS. With them a subtraction of the signals as it is had in the expression: $E_r = S_r - f$, must be carried out. In figure 11 there are three graphs, the continued one describes the spectra that is obtained to apply the filtration of noise of high frequency, the peaks represent the obtained result of the ANFIS training, finally the peaks below are the graph of the output desired (target) or expected result

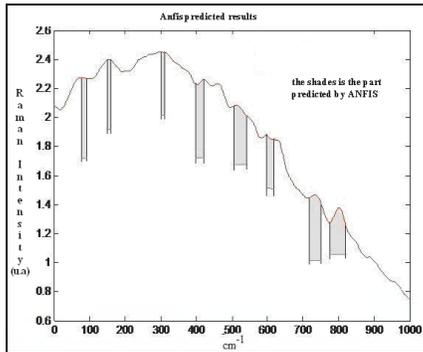


Fig. 10. Final graph of the ANFIS training

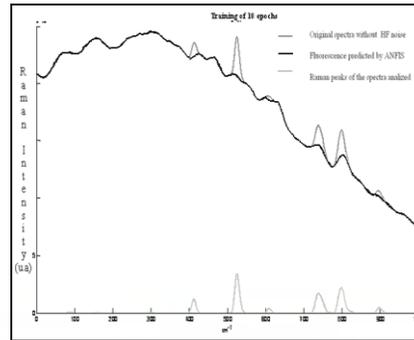


Fig. 11. Graph of final result

4. Conclusions and future works.

The sequence of the algorithm was described in detail to obtain the graph that contains the Raman peaks of the samples (spectra). It is important to carry out the normalization of the spectra, to obtain the aspect ratio, for the determination of the Raman peaks. And finally with the use of ANFIS the resulting graph appears in the initial scale of the spectra (normalized). The form in which the final spectra will appear is solely the Raman peaks, being these obtained to apply a subtraction between the spectra without noise of HF and those of the ANFIS result. It is important to take into account the computer time for the ANFIS training, the amount of times that it can be trained is infinite, but there exists the amount of times in which the error is reduced significantly or the error is zero. And if not careful computer time will be wrongly invested. On the other hand, to count on patterns of characteristic Raman spectra of microorganisms, as virus, bacteria or fungi, in isolated way or present in organs and cells; provides science with very valuable tools with the purpose of improving the quality of life of the human race. The patterns of retrovirus spectra causes of AIDS (HIV) present in CD4 cells are not yet well defined, but they are in process of being. Future studies in this field will somehow help scientists to find the cure or reach improvements in the health of the people with AIDS, thus improving their life quality.

Raman spectroscopy and ANFIS in the future will be used to characterize microorganism and infected or healthy cells to create new scientific discoveries and to develop new diagnostic tools. This fast method of identification will support the specialists to diagnose AIDS rapidly and at a smaller cost than the traditional methods.

5. References

1. Tirgan, M.H.: Breast Cancer, A biological imperfection; New York, NY, USA. (2006)
2. International Committee of Taxonomy of Virus: ICTV (2007)
3. Ellermann V, Bang O: Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig 1908:595-609.
4. Rous P: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J Ex Med, 13:397-411 (1911)

5. Vogt, P.K.: Historical introduction to the general properties of retroviruses. Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE., Cold Spring Harbor Laboratory, 1-25 (1997)
6. Gross, L.: Oncogenic viruses. Third edition. Oxford, Pergamon, New York (1980)
7. Duesberg, P.H.: Physical properties of Rous Sarcoma Virus RNA. Proc Natl Acad Sci, 60:1511-1518, USA. (1968)
8. Robinson, W.S., Robinson, H.L., Duesberg, P.H.: Tumor virus RNA's. Proc Natl Acad Sci 58:825-834, USA (1968)
9. Organización mundial de la salud OMS: Report on the global AIDS epidemic (2006), <http://www.who.int/research/es>
10. Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre M T, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. Science 1983;220 (4599):868-71
11. Gallo RC, Salahuddin, SZ., Popovic, M., Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS, Risk for AIDS. Science 1984;224:500-3
12. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., et al. Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. Science 1986; 233:343-6.
13. Report on the global AIDS epidemic 2008: executive summary. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2008. Geneva, UNAIDS. <http://www.unaids.org/en>
14. WHO report HIV /AIDS estimates are revised downwards, 2008: World Health Statistics 2008. Geneva, World Health Organization, 2008. <http://www.who.int>
15. Denis, F., Leonard, G., Sangare, A., et al. Comparison of 10 Enzyme Immunoassays for Detection of Antibody to Human Immunodeficiency Virus Type 2 in West Africa Sera. J Clin Microbiol 1988; 26(5):1000-4.
16. BIO-RAD. Booklet Trousse de confirmation pour la détection des anticorps humains anti- VIH1 dans le serum/plasma par immunoblotting. 2006. France
17. <http://www.roche.com>
18. <http://www.bayer.com>
19. <http://www.biomerieux.com>
20. Booklet Abbott AXSYM System VIH ½ gO 2006.Germany. <http://www.abbott.com>
21. InfoRed SIDA. Proyecto del Centro para la Educación y Entrenamiento sobre SIDA de Nuevo México. www.aidsinfonet.org
22. Shanmukh, S., Jones, L., Driskell, J., Zhao, Y., Dluhy, R., and Tripp, R.A "Rapid and Sensitive Detection of Respiratory Virus Molecular Signatures Using a Silver Nanorod Array SERS Substrate". Nano Lett., (2006) 6, 11, 2630 – 2636.
23. Matthew A Young, Douglas A Stuart, Olga Lyandres, Matthew R Glucksberg, Richard P Van Duyne. "Surface-enhanced Raman spectroscopy with a laser pointer light source and miniature spectrometer1. Canadian Journal of Chemistry 82.10 (2004): 1435-1441.
24. A. G Brolo, A. "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from a silver electrode modified with oxazine 720(1) Canadian Journal of Chemistry 82.10 (2004): 1474-1480.
25. S. Cinta Pînzaru, N. Leopold, I. Pavel and W. Kiefer. Raman, SERS and theoretical studies of papaverine hydrochloride and its neutral species. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Volume 60, Issues 8-9, July 2004, Pages 2021-2028
26. S. Cinta Pînzaru, a, N. Leopolda and W. Kiefer. Vibrational spectroscopy of betulinic acid HIV inhibitor and of its birch bark natural source. Talanta. Volume 57, Issue 4, 10 June 2002, Pages 625-631.

27. Shanmukh, S., Jones, L., Zhao, Y. P., Driskell, J. D., Tripp, R. A., Dluhy, R. A. Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 390(6): 1551–1555. ISSN 16182642.
28. Kathy Kincade. “SERS and silver nanorods quickly reveal viral structures” *Laser Focus World*; Jan 2007; 43, 1; Career and Technical Education pg. 49
29. A. Ayata, Adaptive neuro-fuzzy inference systems (ANFIS) application to investigate potential use of natural ventilation in new building designs in Turkey. *Energy Conversion and Management*. Volume 48, Issue 5, May 2007, Pages 1472-1479
30. Zarandi, M.H.F.; Turksen, I.B.; Maadani, B. Customer satisfaction assessment with fuzzy queries and ANFIS for an automotive industry. *Fuzzy Information, 2004. Processing NAFIPS, IEEE Annual Meeting*. Volume 2, Issue , 27-30 June 2004 Page(s): 723 – 728.
31. Buyukbingol E, Sisman A, Akyildiz M, Alparslan FN, Adejare A. Adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS): a new approach to predictive modeling in QSAR applications: a study of neuro-fuzzy modeling of PCP-based NMDA receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007 Jun 15;15(12):4265-82.
32. A. Subasi. Application of adaptive neuro-fuzzy inference system for epileptic seizure detection using wavelet feature extraction. *Computers in Biology and Medicine*, Volume 37, Issue 2, Pages 227 – 244.
33. E. Derya, Adaptive neuro-fuzzy inference system employing wavelet coefficients for detection of ophthalmic arterial disorders. Volume 34, Issue 3. April 2008, pages 2201-2209
34. Song Heejun, Lee Seongu, Kim Dongwon, Park Gwitae. New methodology of computer aided diagnostic system on breast cancer. *Advances in neural networks. International symposium on neural networks No2, Chongqing , CHine 2005*, vol. 3498, [Note(s) : L, 1055 ; 947 ; 1077 p.,] (13 ref.)
35. Raman, C. V. , *Nature*, 108, 367, 1921
36. C. V. Raman, K.S. Krishnan, A new type of Secondary Radiation, *Nature*, 121, 619, 1928.
37. Contreras, J.G., *Espectroscopia RAMAN y estructura molecular*. UNECO, 1, 1987.
38. Takagi, T. and Sugeno, M. (1985). Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control, *Transactions on Systems Man and Cybernetics*, 15(1): 116–132.
39. Sugeno, M., Kang, G. T. Structure identification of fuzzy model. *Fuzzy sets and Systems*. 28:15-33, 1988
40. Takagi, T. and Sugeno, M. Derivation of fuzzy control rules from human operator’s control actions. *Proceedings of the IFAC Symposium on Fuzzy Information, Knowledge Representation and Decision Analysis*, pages 55-60. July 1983.
41. Roger, J.S., 1997. *Neuro-fuzzy and Soft Computing*. Prentice Hall. Nj, USA.

Articulo Publicado en: *Proceedings of the 7th Mexican international Conference on Artificial intelligence: Advances in Artificial intelligence*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 936-947.

6. GLOSARIO

ADN: Acido desoxirribonucleico. Es una macromolécula que forma parte de todas las células que contiene información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.

ANFIS: Adaptive-network-based fuzzy inference system, es una interfaz gráfica de usuario que permite diseñar sistemas borrosos

ANN: Artificial Neural Networks o redes neuronales artificiales, son un paradigma de aprendizaje y procesamiento automático inspirado en la forma en que funciona el sistema nervioso en mamíferos. Es un sistema de interconexión de neuronas en una red que trabaja para producir un estímulo de salida.

ARN: Acido Ribonucleico, macromolécula formada por una cadena de ribonucleótidos. Es el único material genético de ciertos virus. El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

CCR5: C-C chemokine receptor type 5: Es una proteína (cistina cistina) que pertenece a la familia de las beta quimosinas receptoras que se encuentran en las membrana de las células de los linfocitos.

CXCR4: Chemokine (Cistine-X-Cistine) receptor 4. También llamada Fusina, Es una proteína que pertenece a la familia de las beta quimosinas receptoras que se encuentran en las membrana de las células de los linfocitos, y que sirve de receptor para que el virus de la inmunodeficiencia humana pueda infectar a las células.

FL: Fuzzy Logic. Conocida como lógica borrosa o difusa.

HF: High Frequency (altas frecuencias). Son las siglas utilizadas para referirse a la banda del espectro electromagnético que ocupa el rango de frecuencias de 3 MHz a 30 MHz.

HTLV: Human T-Lymphotropic virus, significa virus linfotrófico T humano, virus que ataca linfocitos T del sistema inmune humano

IA: Siglas usadas para referirse a inteligencia artificial

Nanorods: En nanotecnología son objetos con dimensiones entre 1–100 nm. Pueden ser fabricadas a partir de metales o semi conductores directamente por síntesis química.

NCBI: The National Center for Biotechnology o el Centro Nacional para la Información Biotecnológica es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (National Library of Medicine), una rama de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health o NIH). Está localizado en Bethesda, Maryland y fue fundado el 4 de noviembre de 1988 con la misión de ser una importante fuente de información de biología molecular. Almacena y constantemente actualiza la información referente a secuencias genómicas en GenBank, un índice de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica en PubMed, una recopilación de enfermedades genéticas humanas en OMIM, además de otros datos biotecnológicos de relevancia en diversas bases de datos.

OMS: Organización mundial de la salud. Es el organismo de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) especializado en gestionar políticas de prevención, promoción e intervención en salud a nivel mundial.

Perceptrón: es un tipo de red neuronal artificial desarrollado por Frank Rosenblatt. usa una matriz para representar las redes neuronales y es un discriminador terciario.

Retrovirus: son partículas infecciosas cuyo genoma está formado por una cadena simple de ARN de aproximadamente 8500 nucleótidos. Su estructura genética implica que, una vez han infectado la célula huésped, ésta deba transformarse en una cadena doble de ADN denominada provirus para poder reproducirse en el interior de la célula. El proceso de conversión lo lleva a cabo una enzima viral llamada transcriptasa inversa.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida. Enfermedad causada por la presencia infectiva del retrovirus de la inmuno deficiencia humana.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

SERS: Surface Enhanced Raman Spectroscopy, or Surface Enhanced Raman Scattering. Es una técnica muy sensible donde se resalta el efecto raman de moléculas sobre superficies metálicas rugosas.

TCD 4: Son linfocitos T. Los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células. Con referencia al grupo de anticuerpos monoclonales que los detectan, (cluster of differentiation). La cifra de linfocitos CD4 en sangre periférica corresponde a un 2% del total de linfocitos CD4; éstos se localizan fundamentalmente en los órganos linfoides (médula ósea, timo, ganglios linfáticos, tejido linfoide de las mucosas, bazo, etc.).

T norm: Norma Triangular, es una clase de operación binaria utilizado en el marco de probabilísticos y adentro lógica multi-evaluada, específicamente adentro lógica difusa. Una t-norma generaliza intersección en y conjunción en lógica.

UNAIDS: The Joint United Nations Programme en HIV/AIDS. ONUSIDA: Es el programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA

VIH: Virus de la Inmuno deficiencia Humana. Retrovirus causante del SIDA en humanos.

WHO: World Health Organization. Es la Organización mundial de la Salud.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. *Inmunología Celular y Molecular*. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2001.
- Abbott Lab. Booklet Abbott AXSYM System VIH ½ gO. (2006). Germany. www.abbott.com
- Abraham A & Nath B, *Evolutionary Design of Neuro-Fuzzy Systems – A Generic Framework*, In *Proceedings of the 4th Japan – Australia joint Workshop on Intelligent and Evolutionary Systems*, Japan, November 2000.
- Abraham A & Nath B, *Designing Optimal Neuro-Fuzzy Systems for Intelligent Control*, In *proceedings of the Sixth International Conference on Control Automation Robotics Computer Vision, (ICARCV 2000)*, Singapore, December 2000.
- Abraham, A. *Neuro Fuzzy Systems: state of the art modeling techniques*, in *Proceedings of the 6th International Work-Conference on Artificial and Natural Neural Network: connectionist models of neurons, learning process and artificial intelligence- part I*. 2001: Springer-Verlang.
- Alberghina, L., Westerhoff, H. (Editors) – *Systems Biology: Definitions and Perspectives*, *Topics in Current Genetics* 13, Springer Verlag (2005), ISBN 13: 978-3540229681
- Albrecht, M., Grant, J., Creighton, A. (1977). "Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode". *Journal of the American Chemical Society* 99: 5215–5219.
- Alcamí, J. *El virus de la inmunodeficiencia humana*. Bristol Myers Squibb Virologia. España. 2007.
- Alcamí J. *Inmunopatología del SIDA*. En: Gatell JM (ed). 6ª ed. Barcelona: Masson 2000: 20-49.
- Alexandre G Brolo, Aaron C Sanderson. "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from a silver electrode modified with oxazine 720(1)" *Canadian Journal of Chemistry* 82.10 (2004): 1474-1480.

- Bäck, T., Fogel, D., Michalewicz, Z. Handbook of Evolutionary Computation. Oxford University Press, New York NY, 1997.
- Baltimore D (1971). «Expression of animal virus genomes». Bacteriol. Rev 35 (3): 235–41
- Baltimore, D., Tumor viruses: 1974. 1975, 39:1187-1200.
- Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre M T, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. Science 1983;220 (4599):868-71
- Barriol J., Rivail Jean-Louis. Spectroscopies de la Molecule. Primera Edición. Presses Universitaires de France. 1970
- Bayer Laboratories web site. www.bayer.com.
- Baxter Laboratory in Genetic Pharmacology. 2006. Stanford University School of Medicine. USA. www.stanford.edu
- Bherenji H R and Khedkar P, Learning and Tuning Fuzzy Logic Controllers through Reinforcements, IEEE Transactions on Neural Networks, Vol (3), pp. 724-740, 1992.
- Biomerieux Lab., we site. www.biomerieux.com
- BIO-RAD. Booklet Trousse de confirmation pour la détection des anticorps humains anti-VIH1 dans le serum/plasma par immunoblotting. 2006. France
- BISTI: Biomedical information Science and Technology Initiative Working. Definition of Bioinformatics and Computational Biology. July 17, 2000. The NIH Biomedical Information Science and Technology Initiative Consortium. (www.bisti.nih.gov)
- Blank A. Leucemia / linfoma de células T del adulto. En: Zaninovic V, Galindo J, Blank A, eds. Enfermedades asociadas con el virus HTLV-I. Cali, Colombia: XYZ Impresores 1992:153-66.
- Bohachevsky, I.O., Johnson, M.E., Stein, M.L. Optimal deployment of missile interceptors, Am. J. Math. Management Sci. 8 (3 & 4), 361-387 (1988).
- Boza condoreña, G. (1995). Efecto de la topología de redes neuronales de backpropagation en la optimizacion de procesos químicos vía modelos matemáticos neuronales empíricos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

- Breslauer, K., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L. "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Nat. Acad. Sci. Press, U.S.A., vol. 83, June 1986, pp. 3746-3750.
- Brolo, A., Sanderson, A. "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from a silver electrode modified with oxazine 720(1) " Canadian Journal of Chemistry 82.10 (2004): 1474-1480.
- Brumme, Z., Dong, W., Yip, B., Wynhoven, B., Hoffman, N., Swanstrom, R., Jensen, M., Mullins, J. Hogg, J., Montaner, S., Harrigan, P. "Clinical and Immunological Impact of HIV Envelope V3 Sequence Variation after Starting Initial Triple Antiretroviral Therapy," AIDS, vol. 18, pp. F1-F9, 2004.
- Cáceres, Francisco (2002). "Bases Biológicas y Teóricas de las Redes Neuronales Artificiales". Proyecto de Licenciatura de Ingeniería Civil Electrónica. Facultad de Ingeniería. Universidad Mayor. Santiago. Chile.
- Calladine, C., Drew, H. "Principles of sequence-dependent flexure of DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:907-18, 1986.
- Campion, A, and P. Kambhampati. Chem. Soc. Rev., 27:241, 1998.
- Cao, Y., Mirkin, R.J., Mirkin, C.A. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection: Science; 8/30/2002, Vol. 297 Issue 5586, p1536.
- Caspar, DL., Klug, A., (1962). «Physical principles in the construction of regular viruses». Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 27: 1–24.
- Castiglione, F., Pappalardo, F., Bernaschi, M., Motta, S. Optimization of HAART with genetic algorithms and agent-based models of HIV infection. Bioinformatics. Oxford University press. Vol 23, no. 24 2007 pp. 3350-3355.
- Cocho, G., Medrano, L., Miramontes, P., Rius, J. "Selective Constrains over DNA Sequences", Biologically Inspired Physics, NATO ASI Series Physics V 263, Plenum Press, New York, 1991.
- Cohen, D. "Sistemas de Información para la toma de Decisiones". (1997) Mc Graw Hill.

- Coleman C.M, Rothwell E.J, Ross J,E, “Investigation of Simulated Annealing, Ant Colony Optimization and Genetic Algorithm for Self-structuring Antennas”. IEEE Transactions on Antennas and Propagation. Vol. 52, No.4. April. 2004.
- Contreras, J.G., Espectroscopia RAMAN y estructura molecular. UNECO, 1, 1987.
- Corana A, Marchesi M, Martini C, Ridella S. “Minimizing Multimodal Functions of Continuous Variables with the Simulated Annealing Algorithm”, ACM Transactions on Mathematical Software. Vol, 13, No.3, September 1987
- Chung, King-Thom and Ferris, Deam Hunter (1996), AMS. News 62, 539-543.
- Crossingham, B., Marwala, T. Using Genetic Algorithms to Optimise Rough Set Partition Sizes for HIV Data Analysis CoRR abs/0705.2485: (2007)
- Darwin,C . The origin of species. (1859). Londres.
- Delves PJ, Roitt IM: the immune system, N Eng J Med, 343 (1); 37-50, 2000.
- Denis, F., Leonard, G., Sangare, A., et al. Comparison of 10 Enzyme Immunoassays for Detection of Antibody to Human Immunodeficiency Virus Type 2 in West Africa Sera. J Clin Microbiol 1988; 26(5):1000-4.
- Dickerson, R. “Base sequence and helix structure variation in B and A DNA”, J. Mol. Biol. 166:419-41, 1993.
- Dorigo M y Maniezzo V y Colorni A., “Ant System: An Autocatalytic Optimizing Process”. Technical Report 91-016, Dipartimento di Electtronica e Informazione - Politecnico di Milano, Italia, pp. 1-26, 1991.
- Dorigo M., Maniezzo M. y Colorni A., “The Ant System: Optimization by a colony of cooperating agents”, IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics-Part B, USA, Vol. 26, No. 1, pp. 1-13, 1996.
- Durkin, J. “Expert Systems: Design and Development”. New York. Maxwell Macmillan. (1994)
- EBI: European Bioinformatics Institute. Cambridge, England. www.ebi.ac.uk

- Elechiguerra, J.L., Burt, J., Morones, J., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H., Yacaman, M.J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* 2005, 3:6.
- Farmer J. D., N. H. Packard et al. *The Immune System, Adaptation, and Machine Learning*, 1986.
- Fleischmann, M.; Hendra P., McQuillan, A.J. (1974). Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chemical Physics Letters* 26 (2): 163–166.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224(4648): 500-3.
- García Tamayo, F., *Fundamentos de Inmunobiología*. Publicado por UNAM, 1997. ISBN 9683651712
- Gladwin, M., B. Trattler, *Clinical Microbiology made ridiculously simple*, Medmaster, Miami, 2004.
- Glover, Fred, "Future Paths for Integer Programming and Links to Artificial Intelligence", *Computers & Operations Research*, Volume 13, No. 5, 1986.
- Glover, Fred, "Tabu Search : A Tutorial", *Interfaces*, Vol 20, No. 4, pp. 74-94, July-August 1990.
- Glover, Fred & Laguna, Manuel, "Tabu Search", En Reeves, Colin R. (Editor), "Modern Heuristic Techniques for Combinatorial Problems", John Wiley & Sons, Inc. 1993, pp. 70-150
- Glover, Fred & A. Kochenberger Gary, "Handbook of Metaheuristics", Iower Academic Publishers. 2003
- Graham, D., Smith, W., Linacre, Munro, C., Watson, N. and White P., Selective detection of deoxyribonucleic acid at ultralow concentrations by serrs. *Anal. Chem.*, 69:4703, 1997.

- Grant C, Barmak k, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. Humant T cell leukemia virus type I and neurologic disease. *J Cell Physiol* 2002;190 (2):133-59.
- Griffin SD, Allen JF, Lever AM: The major human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) packaging signal is present on all HIV-2 RNA species: cotranslational RNA encapsidation and limitation of Gag protein confer specificity. *J Virol.* 2001, 75:12058-12069.
- Gross, L., *Oncogenic viruses*. Third edition. Oxford, Pergamon; 1980.Hooke, R. *Micrographia Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. 1665. England.
- Haase A, Henry K, Zupanic M, et al. Quantitative image análisis of VIH-1 dynamics in vivo: virion clearence rate, infected cell life-spam, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6
- Hansen, P., "The steepest ascent mildest descent heuristic for combinatorial programming", *Congress on Numerical Methods in Combinatorial Optimization, Capri, Italy, 1986*
- Hebb, D.O.1949. *The Organization of Behavior*. New York: John Wiley & Sons.
- Holland, J. H. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1975.
- Hu, j., Zheng, Pc., Shen, GL., Yu, RQ., Liu, GK., Sub-attomolar HIV-1 DNA detection using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst.* 2010 May 26;135(5):1084-9
- Huang S. Back to the biology in systems biology: what can we learn from biomolecular networks? *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004; 2:279–97
- Hsu F, Chang P, Chan K, “Optimization of two-dimensional randome boresight error performance using simulated annealing technique”, *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, Vol. 41, No. 9, September 1993.
- ICTV db Index of Viruses: Virus Taxonomy, 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Listing in Taxonomic Order. U.S. National Center for Biotechnology Information, National Library for Medicine, National Institutes of Health. 2007.
- Jang R, *Neuro-Fuzzy Modeling: Architectures, Analyses and Applications*, PhD Thesis, University of California, Berkeley, July 1992.

- Jang, S., Sun, C., Mizutani, E. (1997). *Neuro-fuzzy and Soft Computing*. Pearson Ed. U.S.A.
- Jeanmaire, D., Richard L., Van Duyne, P. (1977). "Surface Raman Electrochemistry Part I. Heterocyclic, Aromatic and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry* (Elsevier Sequouia S.A.) 84: 1–20.
- Juang Chia Feng, Lin Chin Teng, An Online Self Constructing Neural Fuzzy Inference Network and its Applications, *IEEE Transactions on Fuzzy Systems*, Vol 6, No.1, pp. 12-32, 1998.
- Karp. Gerald, *Cell and molecular biology.*, 3rd ed., Vonn Hoffman Press., U.S.A., 2002. ISBN: 0-471-38913-7.
- Kasabov N and Qun Song, Dynamic Evolving Fuzzy Neural Networks with 'm-out-of-n' Activation Nodes for On-line Adaptive Systems, Technical Report TR99/04, Department of information science, University of Otago, 1999.
- Kedzierska K, Crowe S, Turville S, et al. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on VIH-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003; 13: 39-56.
- Kincade, K., "SERS and silver nanorods quickly reveal viral structures" *Laser Focus World*; Jan 2007; 43, 1; Career and Technical Education pg. 49
- Kirkpatrick, S., Gelatt C.D., Vecchi M.P. "Optimization by Simulated Annealing." *Science*. Volume 220, Number 4598. May 1983.
- Klein, R., Dubes, R. Experiments in projection and clustering by simulated annealing, *Pattern Recognition* 22 (2), 213-220 (1989).
- Kohonen, T. "Self-organized formation of topologically correct feature maps," *Biological Cybernetics*, vol. 43, pp. 59–69, 1982.
- Kosko, B., *Neural Networks and fuzzy systems, a dynamical approach to machine intelligence*, Englewood Cliffs, NJ Prentice-Hall, 11, 379, 1992
- Kosko, B., *Neural Networks and fuzzy systems, a dynamical approach to machine intelligence*, Englewood Cliffs, NJ Prentice-Hall, 10, 311, 1992

Koza, J. R. Genetic Programming: On the Programming of Computers by Means of Natural Selection. MIT Press, (1980).

Krishnan, R.S., Shankar, R.K. J. Raman Spectrosc., 10, 1 (1981)

Kyrk, J. (2009). Cell Biology Animation site <http://www.johnkyrk.com>.

Lamers, S., Salemi, M., McGrath, M., Fogel, G. “Prediction of R5, X4, and R5X4 HIV-1 Coreceptor Usage with Evolved Neural Networks,” IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, vol. 5, No. 2, April-June 2008.

Landsberg, G.R., Mandelstam, L. Rus. J. Phys. Chem., 60, 335 (1928)

Laumann, E., Youm. Y. “Racial/ethnic group differences in the prevalence of sexually transmitted diseases in the United States: a network explanation”. Sex Transm Dis, 26, pp. 250– 61, 1999.

Lederberg, J., McCray, A. (2001). «'Ome Sweet 'Omics -- A Genealogical Treasury of Words». *The Scientist* 15 (7).

Leke Betechuoh, B., Marwala, T., Tettey, T. “Using Inverse Neural Networks for HIV Adaptative Conrol,” International Journal of Computational Intelligence Reserarch. Vol. 3, No. 1 (2007), pp. 11–15.

Lin C T & Lee C S G, Neural Network based Fuzzy Logic Control and Decision System, IEEE Transactions on Comput. (40(12): pp. 1320-1336, 1991.

Lippman, Richard (1987). “An Introduction to Computing with neural nets. IEEE ASSP Magazzine. Vol. 3. No. 4. Pp-4-22.

Loannidis, J. Trikalinos, T., Law, m. “HIV Lipodystrophy Case Definition Using Artificial Neural Network Modeling,” Antiviral Therapy, vol. 8, pp. 435-441, 2003.

Lodish, H. et al. 1999. Molecular cell biology. 4th edition. W.H. Freeman an Co. USA.

Mamdani, E. H., Application of fuzzy algorithms for control of simple dynamic plant, Academic Press: Neva York, 1974.

Maniez-Montreul, M. HTLV-I and HTLV-II virus. Ann. Biol (Paris). 1998; 56: 563-70

Matlab R2007a. Mathworks, inc.

- Matthew A Young, Douglas A Stuart, Olga Lyandres, Matthew R Glucksberg, Richard P Van Duyne. "Surface-enhanced Raman spectroscopy with a laser pointer light source and miniature spectrometer1." *Canadian Journal of Chemistry* 82.10 (2004): 1435-1441.
- Marinari, E., Parisi, G. Simulated tempering: A new Monte Carlo scheme, *Europhys. Lett.*, (submitted) (1992).
- Mc Allister A. El virus HTLV - I: Aspectos generales y biología molecular. En: Zaninovic V, Galindo J, Blank A, eds. *Enfermedades asociadas con el virus HTLV-I*. Cali, Colombia: XYZ Impresores, 1992:1-10.
- McCulloch, W., Pitts, W. "A logical calculus of the ideas immanent in neurons activity", *Bull. Math. Biophys.*, 5, 115-133, (1943).
- Mc Neill, D., and P. Freiberger, *Fuzzy Logic: The revolutionary computer technology that is changing our world*, Simon and Schuster, New York, 1994.
- Meijer C.A, "Simulated Annealing in the Design of Thinned Arrays Having Low Sidelobe Levels", *Proceedings of the South African Symposium on Communications and Signal Processing Rondebosh (South Africa)*, September 1998.
- Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 2005
- Michielssen E, Mittra R, "RCS Reduction of dielectric cylinders using the simulated annealing approach" , *IEEE Microwave and guided wave letters*, Vol 2, No. 4. April 1992.
- Milich, L., Margolin, B., Swanstrom, R. "V3 Loop of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Protein: Interpreting Sequence Variability," *J. Virology*, vol. 67, no. 9, pp. 5623-5634, 1993.
- Miramontes P. Un modelo de autómatas celulares para la evolución de los ácidos nucleicos (A cellular automaton model for the evolution of nucleic acids). Tesis de doctorado en matemáticas. UNAM. 1992.

- Mitsuo, G., Runwei, C. "Genetic Algorithms & Engineering Optimization" Wiley Series in Engineering Design and Automation. Harid R. Parsaei. Series Editor. 2000
- Mock, J. J., Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics* 2002, 116, (15), 6755.
- Montagnier L. (2002) Historical essay. A History of HIV Discovery. *Science* 298(5599): 1727-8.
- Moskovits, M., *Rev. Mod. Phys.*, 57:783, 1985.
- Murphy F, Fauquet C, Bishop D, et al. *Virus Taxonomy: Six report of the International Committee on the Taxonomy of viruses*. Nueva York: Springer Verlag 1995.
- Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. Tercera Edición. John Wiley and Sons. 1978.
- Nauck D, Kruse R, *Neuro-Fuzzy Systems for Function Approximation*, 4th International Workshop Fuzzy-Neuro Systems, 1997.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. Bethesda, MD, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Noble, D., *The Music of Life* Oxford University Press (2006) p21
- Ohlmann J.W and Bean J.C. "Compressed Annealing: Simulated Annealing Under Pressure. Technical Report, Department of Industrial and Operations Engineering, University of Michigan. Ann Arbor, Michigan. 2000
- Olins, D.E.; Olins, A.L. (2003), "Chromatin history: our view from the bridge", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (10): 809–813
- Pal, S.K. and S. Mitra, *Neuro-Fuzzy Pattern Recognition*. 10 ed. Series on Intelligent Systems, ed. Wiley-Interscience. 1999, New York: John Wiley & Sons. 375.
- Parker, D. (1982). "Learning Logic". Invention Report. S81-64. File 1. Office of Technology. Licensing. Stanford University.
- Pawlak, Z. *Rough Sets, Theoretical Aspects of Reasoning about Data*, chap. 3, p. 33. Kluwer Academic Publishers, 1991.

- Pepper J.W, Golden B.L and Wasil L.A, "Solving the traveling salesman problem with demon algorithms and variants. Technical Report, Smith School of Business, University of Maryland, College Park, Maryland. 2000.
- Pichardo-Molina, et all. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. (2006) *Lasers Med Sci*. DOI 10.1007/s10103-006-0432-8., Springer-Verlag.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AP, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type -C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T - cell lymphoma. *Proc Natl Acad Asc USA* 1980; 79:7415-9.
- Quiroz-Gutierrez A, "Biophysical Considerations and Evolutionary Aspects of DNA-dimer Frequency in AIDS Retrovirus Genomes", *Topics in Contemporary Physics*, IPN Press, México, 2000, pp. 239-248.
- Raman, C. *Nature*, 108, 367 (1921)
- Ramanathan, K. *Proc. Ind. Assoc. Cult. IV Sci.*, 8, 181 (1923)
- Raman, C.V., Krishnan, K.S. A new type of Secondary Radiation. *Nature*, 121, 619, 1928.
- Rayleigh Lord, *Scientific Papers*, 5, 540 (1900)
- Regueiro JR, López Larrea C. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune* (2ª Ed). Madrid, Editorial Médica Panamericana, 1997
- Resch, W. Hoffman, N., Swanstrom, R. "Improved Success of Phenotype Prediction of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Envelope Variable Loop 3 Sequence Using Neural Networks," *J. Virology*, vol. 76, pp. 3852-3864, 2001.
- Richards, E., Gunn, E. Tabu search design for difficult forest management optimization problems. *Canadian Journal of Forest Research*; Jun 2003; 33, 6; Career and Technical Education. pg. 1126
- Roche website (www.roche.com).
- Rous P: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Ex Med* 1911, 13:397-411.
- Rosenblatt, F. 1962. *Principles of Neuro dynamics*. New York: Spartan Books.

- Rumelhart, D., Hinton, G. y Williams, R. (1986). "Learning Representations by Backpropagating Errors". *Nature* 323. pp. 533-536.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. (March 1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35 (11): 3362–7.
- Sauer, U. et al. "Getting Closer to the Whole Picture" *Science (journal)* 316 550 17 April 2007.
- Shanmukh, S., Jones, L., Zhao, Y. P., Driskell, J. D., Tripp, R. A., Dluhy, R. A. Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 390(6): 1551–1555. ISSN 16182642.
- Shanmukh, S., Jones, L., Driskell, J., Zhao, Y., Dluhy, R., and Tripp, R.A Rapid and Sensitive Detection of Respiratory Virus Molecular Signatures Using a Silver Nanorod Array SERS Substrate. *Nano Lett.*, (2006) 6, 11, 2630 – 2636.
- SI: Sanger Institute. Hinxton, Cambridge, UK. (www.sanger.ac.uk)
- Smekal, A. *Naturwis.*, 11, 873 (1923)
- Snoep J.L. and Westerhoff H.V.; Alberghina L. and Westerhoff H.V. (Eds.) (2005.). "From isolation to integration, a systems biology approach for building the Silicon Cell". *Systems Biology: Definitions and Perspectives*: p7, Springer-Verlag.
- Soriano V, Heredia A. Sexta Conferencia Internacional sobre retrovirus humanos: HTLV-I. Revisión. *PUB OF SEISIDA* 1994;5 (8):456-61.
- Stacy, M and Van Duyne, R. *Chem. Phys. Lett.*, 102:365, 1983.
- Sugeno, M., Kang, G. T. Structure identification of fuzzy model. *Fuzzy sets and Systems*. 28:15-33, 1988
- Sugeno, M., Fuzzy measures and fuzzy integrals: a survey. In M.M. Gupta, G.N. Saridis, and B.R. Gaines, editors, *fuzzy automata and decision processes*, pg. 89-102. North-Holland, New York, 1977.
- Sulzberger SM, Tschicholg-Gurman NN, Vestli SJ, FUN: Optimization of Fuzzy Rule Based Systems Using Neural Networks, In *Proceedings of IEEE Conference on Neural Networks*, San Francisco, pp 312-316, March 1993.

- Takagi, T. and Sugeno, M. Deivation of fuzzy control rules from human operator's control actions. Proceedings of the IFAC Symposium on Fuzzy Information, Knowledge Representation and Decision Analysis, pages 55-60. July 1983
- Takagi, T. and Sugeno, M. Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control, Transactions on Systems Man and Cybernetics, 15(1): 116–132, 1985.
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Watanabe T, Mochizuki M, Kiyokawa T, Mori S, et al. Adult T-cell leucemia and HTLV-I. Related Diseases. Gann Monograph on Cancer Research 1992;39:1-15.
- Tano S, Oyama T, Arnould T, Deep combination of Fuzzy Inference and Neural Network in Fuzzy Inference, Fuzzy Sets and Systems, 82(2) pp. 151-160, 1996.
- UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic 2008: executive summary. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2008. Geneva. <http://www.unaids.org/en>
- Vogt, PK: Historical introduction to the general properties of retroviruses. In Retroviruses. Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE. New York, Cold Spring Harbor Laboratory; 1997:1-25.
- Wade, A., Kyne, A., Mera, N., Pourkashanian, M. et al. Genetic algorithm optimization of a chemistry mechanism for oxidation of liquid hydrocarbons. American Institute of Aeronautics and Astronautics. AIAA Journal. New York: Oct 2005. Vol. 43, Iss. 10; pg. 2259.
- Wang, D., Larder, B. “Enhanced Prediction of Lopinavir Resistance from Genotype by Use of Artificial Neural Networks,” J. Infectious Diseases, vol. 188, pp. 653-660, 2003.
- Wang, Z., Neuro-Fuzzy Modeling for Microarray Cancer Gene Expression Data, in PRS in Applications and Algorithms Group. 2005, Oxford University Computing Laboratory.
- Watson, J.D. and F.H. Crick. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acids. Nature 171:737-738.
- Weil R, Israel A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. Curr Opin Immunol. 2004, 16: 374-81

- Werbos, P. (1974) "Beyond Regression: New Tools for Prediction and Analysis in the Behavioral Sciences". Ph. D. Thesis. Harvard University.
- Widrow, B. (1960). "Adaptive Switching Circuits". IREWESCON Convention Record. Part 4. pp. 96-104. Reimpreso (1988) "Neurocomputing". pp. 126-134, MIT Press.
- Widrow, B., and Stearns, S.D. 1985. Adaptive Signal Processing. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- WHO report HIV /AIDS estimates are revised downwards, 2008: World Health Organization, 2008. Geneva, World Health Organization, 2008. www.who.int
- WT: Wellcome Trust. London, UK. www.wellcome.ac.uk
- Wu, Q., Sloane, T. CMOS leaf-cell design using simulated annealing, Report, Bucknell University, Lewisburg, PA, (1992).
- Yager, R., On a general class of fuzzy connectives. Fuzzy Sets and Systems, 4:235-242, 1980.
- Yang, Y., Liu, H. Genetic algorithm for Protein conformation sampling and Optimization In a discrete backbone dihedral angle space. Journal of Computational Chemistry. New York: Oct 2006. Vol. 27, Iss. 13; pg. 1593.
- Young, M., Stuart, D., Lyandres, O., Glucksberg, M., Van Duyne, R. Surface-enhanced Raman spectroscopy with a laser pointer light source and miniature spectrometer, Canadian Journal of Chemistry 82.10 (2004): 1435-1441.
- Zadeh, L. Fuzzy logic, IEEE Computer, 1:83, 1988.
- Zinn, P. Adaptive multicomponent analysis by genetic algorithm. Journal of Chemical Information and Modeling. Washington: Jul/Aug 2005. Vol. 45, Iss. 4; pg. 880