

**OBSERVACIÓN DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN
TEJIDO MAMARIO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN**

ANGELA PATRICIA HERNÁNDEZ VARGAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2018**

OBSERVACIÓN DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN
TEJIDO MAMARIO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

ANGELA PATRICIA HERNÁNDEZ VARGAS

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Física

Director

Janeth Fernández Pinto

Ph.D(c) en Ciencias Naturales (Física)

Codirector

David Alejandro Miranda Mercado

Ph.D en Química Aplicada

Asesora médica

Olga Mercedes Álvarez Ojeda

Especialista en Patología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA

BUCARAMANGA

2018

A

Gelvis Hernández, María Vargas, Marcela y Emma por su apoyo y amor incondicional.

Agradecimientos

A mi amado Dios, simplemente sin Él nada soy. Al profesor David Miranda y Janeth por guiarme en este proceso de aprendizaje. A la doctora Olga Álvarez por su aporte en esta investigación. Al profesor Rafael Cabanzo y Ximena por su paciencia y colaboración. Y por supuesto, a Mónica por su amistad y apoyo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
1.1. Morfología del tejido mamario y cáncer de mama	17
1.2. Técnicas diagnósticas de cáncer de mama	20
1.2.1. Técnicas Tradicionales	20
1.2.2. Nuevas Técnicas	21
1.2.3. Técnicas funcionales	22
1.3. Efecto de Campo carcinogénico (Field Cancerization Effect "FCE")	24
1.4. Espectroscopia Raman	25
1.4.1. Fundamento Físico de la espectroscopia Raman	26
1.4.2. Instrumentación	32
1.4.3. Investigaciones y aplicaciones médicas de la espectroscopia Raman	35
1.4.4. Caracterización de materiales biológicos por espectroscopia Raman	36
1.5. Nuestra Investigación	41
2. MÉTODOS Y MATERIALES	43
2.1. Preparación de las muestras	43
2.2. Instrumentación	45
2.3. Adquisición espectral	46
2.4. Procesamiento y análisis de datos	47
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	48
3.1. Espectros Raman obtenidos	48
3.2. Corrección de línea base	50
3.3. Normalización	52
3.4. Identificación de Picos Raman	53
3.5. Análisis de Picos Raman y vinculación con el efecto de campo carcinogénico	57
4. CONCLUSIONES	64

BIBLIOGRAFÍA 66

LISTA DE FIGURAS

	pág.
1. Anatomía de la mama femenina	18
2. Representación de la dispersión de Rayleigh y Raman. (a) Oscilación del campo eléctrico incidente. (b) Las Vibraciones atómicas cambian la polarizabilidad, que a su vez cambia la amplitud de oscilación del momento dipolar. (c) Interacción del campo eléctrico con el momento dipolar del material. (d) Amplitudes resultantes de la interacción.	28
3. Vectores para estiramiento de enlace.	30
4. Vectores para flexión de los ángulos entre dos enlaces.	30
5. Vectores para el ángulo entre un enlace y un plano definido por dos enlaces.	31
6. Vectores para el ángulo de torsión.	31
7. Diagrama experimental para un sistema de espectroscopia Raman.	34
8. Muestras marcadas por la patóloga. La tinta azul encierra las zonas que contienen tejido normal y la tinta roja encierra las zonas que contienen tejido tumoral.	45
9. Espectros Raman obtenidos para la muestra 1883-17 B. A, Zona 1 de tejido normal. B, zona 2 de tejido normal. C, zona 3 de tejido normal. D, zona 1 de tejido tumoral. E, zona 2 de tejido tumoral. F, zona 3 de tejido tumoral.	49
10. Espectros Raman obtenidos para la muestra 4499-17 A2. A, Zona 1 de tejido normal. B, zona 2 de tejido normal. C, zona 3 de tejido normal. D, zona 1 de tejido tumoral. E, zona 2 de tejido tumoral. F, zona 3 de tejido tumoral.	50
11. Espectro Raman correspondiente a la zona normal 1 de la muestra 449917 A2. Izquierda: Espectro sin corrección de línea base. Derecha: Espectro después de aplicar la corrección de línea base.	51
12. Espectros Raman de la muestra 188317 B. Verde, zona 1 de tejido normal. Turquesa, zona 2 de tejido normal. Azul, zona 3 de tejido normal. Rojo, zona 1 de tejido tumoral. Naranja, zona 2 de tejido tumoral. Rosa, zona 3 de tejido tumoral.	53

13. Espectros Raman de la muestra 449917 A2. Verde, zona 1 de tejido normal.
Turquesa, zona 2 de tejido normal. Azul, zona 3 de tejido normal. Rojo, zona
1 de tejido tumoral. Naranja, zona 2 de tejido tumoral. Rosa, zona 3 de tejido
tumoral. 53

LISTA DE TABLAS

	pág.
1. Descripción de las muestras de tejido mamario empleadas en la investigación	44
2. Asignación de bandas Raman de la muestra 188317 B	55
3. Asignación de bandas Raman de la muestra 449917 A2	56
4. Bandas Raman de la muestra 188317 B asociados a compuestos moleculares del tejido.	58
5. Bandas Raman de la muestra 449917 A2 asociados a compuestos moleculares del tejido.	61
6. Bandas Raman de tejido mamario normal.	63

RESUMEN

TÍTULO: OBSERVACIÓN DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN TEJIDO MAMARIO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN¹.

AUTOR: ANGELA PATRICIA HERNÁNDEZ VARGAS ²

PALABRAS CLAVE: TEJIDO MAMARIO, ESPECTROSCOPIA RAMAN, EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO.

DESCRIPCIÓN:

En esta investigación se realizó un mapeo espectral sobre tejido mamario mediante espectroscopia Raman con el fin de observar el efecto de campo carcinogénico. Se estudiaron muestras de tejido mamario embebido en parafina montado sobre placas de vidrio, correspondientes a dos sujetos diferentes, las cuales presentan zonas histopatológicamente normales y tumorales. Las muestras fueron excitadas con un láser de longitud de onda de 785 nm y los espectros fueron adquiridos en un rango de 600 a 1800 cm^{-1} , cada muestra se midió en 6 zonas patológicas diferentes, 3 zonas pertenecientes a tejido normal y 3 zonas concernientes a tejido tumoral, para cada zona se tomaron y promediaron tres espectros con el fin de reducir el nivel de ruido. Los espectros obtenidos fueron procesados aplicando la corrección de línea base y normalizados para que compartieran el mismo rango de intensidades, luego se identificaron los picos o bandas Raman sobresalientes en el espectro de cada muestra y se realizó un análisis comparativo con distintas investigaciones reportadas en la literatura que estudiaron tejido mamario por espectroscopia Raman. Este análisis permitió identificar que algunas bandas Raman pertenecen a los compuestos empleados en el proceso de preparación de la muestra (hematoxilina, eosina, xilol, etanol y parafina) y otras son bandas Raman propias de tejido, estas últimas según lo reportado en la literatura están presentes solo en tejido cancerígeno, sin embargo, en los espectros obtenidos en esta investigación también aparecen en tejido normal, lo que comprueba que el tejido aparentemente normal presenta los mismos cambios del tejido cancerígeno, evidenciando la existencia de un efecto de campo carcinogénico en las muestras estudiadas.

¹Trabajo de grado.

²Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directora: Janeth Fernández Pinto, Codirector: David Alejandro Miranda Mercado, Asesor médico: Olga Mercedes Álvarez Ojeda.

ABSTRACT

TITLE: OBSERVATION OF THE FIELD CANCERIZATION EFFECT IN MAMMARY TISSUE THROUGH RAMAN SPECTROSCOPY³.

AUTHOR: ANGELA PATRICIA HERNÁNDEZ VARGAS ⁴

KEY WORDS: MAMMARY TISSUE, RAMAN SPECTROSCOPY, FIELD CANCERIZATION EFFECT.

DESCRIPTION:

In this research, a spectral mapping on mammary tissue was performed through Raman spectroscopy in order to observe the field cancerization effect . We studied samples of breast tissue embedded in paraffin mounted on glass plates, corresponding to two different subjects, which present histopathologically normal and tumor areas. The samples were excited with a wavelength laser of 785 nm and the spectra were acquired in a range of 600 to 1800 cm^{-1} , each sample was measured in 6 different pathological zones, 3 zones of normal tissue and 3 zones of tumor tissue, for each zone three spectra were taken and averaged in order to reduce the noise level. The spectra obtained were processed applying the baseline correction and normalized for they share the same range of intensities, later the Raman peaks or bands were identified in the spectrum of each sample and a comparative analysis was made with different investigations reported in the literature where studied mammary tissue by Raman spectroscopy. This analysis allowed to identify that some Raman bands belong to the compounds used in the sample preparation process (hematoxylin, eosin, xylol, ethanol and paraffin) and others are tissue-specific Raman bands, these last as reported in the literature are present only in carcinogenic tissue, however, in the spectra obtained in this research also appear in normal tissue, which proves that apparently normal tissue presents the same changes of the cancer tissue, evidencing the existence of a field cancerization effect in the samples studied.

³**Bachelor Thesis.**

⁴Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directora: Janeth Fernández Pinto, Codirectores: David Alejandro Miranda Mercado y Olga Mercedes Álvarez Ojeda.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad causada por cambios genéticos y epigenéticos, los cuales alteran el funcionamiento de las células, especialmente la forma como crecen y se dividen⁵. Esta enfermedad se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo de acuerdo con las cifras publicadas por la IARC (International Agency for Research Cancer), la cual prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas⁶. Según datos de la IARC uno de los tipos de cáncer que causa más defunciones en el mundo es el cáncer de mama, en 2012, este tipo de cáncer fue diagnosticado como el más frecuente en la mujer⁷. En Colombia el cáncer de mama es una enfermedad que va en ascenso, según la Subdirección de Enfermedades No Transmisibles (ENT) del Ministerio de Salud y Protección Social, esta enfermedad es un problema de salud pública debido a que anualmente fallecen 2.649 mujeres.

Teniendo en cuenta las altas tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial y en nuestro país, es necesario aportar al conocimiento de esta enfermedad. Una forma de contribuir en la comprensión del cáncer es investigar la proliferación de las transformaciones en el tejido que conducen a un estadio neoplásico avanzado mediante el estudio del efecto de campo carcinogénico FCE^{8,9,10}. Este efecto fue propuesto por Slaughter y colaboradores en 1953, para explicar la aparición de varios tumores y la recurrencia del cáncer oral. Según Slaughter el carcinoma epidermoide del epitelio oral origina un proceso de cancerización de campo, en el que un área del epitelio ha sido preconditionada por un agente carcinogénico generando un cambio irreversible

⁵ALATORRE, Alfredo. *¿Qué es el cáncer?* Random House España, 2004, pág. 15. ISBN: 9789706437754.

⁶TORRE, Lindsey A y col. «Global cancer statistics, 2012». En: *CA: a cancer journal for clinicians* 65.2 (2015), pág. 87.

⁷Ibíd., pág. 97.

⁸DAKUBO, Gabriel D y col. «Clinical implications and utility of field cancerization». En: *Cancer cell international* 7.1 (2007), pág. 2.

⁹RIVENBARK, Ashley G y COLEMAN, William B. «Field cancerization in mammary carcinogenesis—implications for prevention and treatment of breast cancer». En: *Experimental and molecular pathology* 93.3 (2012), págs. 391-398.

¹⁰RADOSEVICH, Andrew J y col. «Ultrastructural alterations in field carcinogenesis measured by enhanced backscattering spectroscopy». En: *Journal of Biomedical Optics* 18.9 (2013), pág. 097002.

en las células de dicha área, provocando la aparición de cáncer en múltiples puntos, la aparición de estos puntos de cáncer sugiere que existe una conexión entre ellos a pesar de su distanciamiento, por lo cual es evidente un efecto que se propaga por el tejido produciendo la reaparición de células anormales¹¹.

El concepto actual del efecto de campo carcinogénico implica que en tejido histopatológicamente normal se encuentren zonas con las mismas alteraciones bioquímicas que el tejido anómalo, es decir, los cambios bioquímicos presentes en células cancerígenas se extienden a zonas aledañas al tejido anormal¹². Recientemente, se ha formulado que este efecto ocurre a nivel del microambiente, en el cual las células anormales modifican la señalización celular del tejido haciendo que las células normales circundantes produzcan los niveles de oxígeno necesario para el crecimiento del tumor, esto se conoce como el efecto de amplificación de anomalías bioquímicas por FCE¹³. El estudio de los cambios a nivel microscópico asociados al FCE que ocurren en el proceso de transformación del tejido, se puede realizar implementando técnicas ópticas que permitan detectar dichos cambios. La espectroscopia Raman es una técnica que posibilita la observación de cambios en los modos vibracionales de las moléculas¹⁴ ante la presencia de anomalías¹⁵ asociadas a tejido neoplásico¹⁶.

Conociendo las ventajas de la espectroscopia Raman en el estudio de la composición del tejido y la importancia de estudiar el efecto de campo carcinogénico, se planteó esta investigación en la cual se realiza un mapeo espectral mediante microscopía Ra-

¹¹SLAUGHTER, Danely P; SOUTHWICK, Harry W y SMEJKAL, Walter. «“Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin». En: *Cancer* 6.5 (1953), págs. 963-968.

¹²TRUJILLO, Kristina A y col. «Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies». En: *Prostate cancer 2012* (2012).

¹³FERNÁNDEZ, Janeth y col. «Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells?» En: *Medical hypotheses* 97 (2016), págs. 107-111.

¹⁴TFAYLI, Ali y col. «Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies». En: *Applied spectroscopy* 63.5 (2009), págs. 564-570.

¹⁵DEHGHANI-BIGDOLI, Zohreh y col. «Common Raman Spectral Markers among Different Tissues for Cancer Detection». En: *Iranian Journal of Medical Physics* 11.4 (2014), págs. 308-315.

¹⁶FENG, Shangyuan y col. «Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors». En: *International journal of nanomedicine* 10 (2015), pág. 537.

man de muestras de tejido mamario histopatológicamente normal y anormal de dos sujetos diferentes, con el fin de visualizar alteraciones en el tejido asociadas al efecto de campo carcinogénico. Los resultados obtenidos en esta investigación, se muestran en el presente documento el cual está organizado en 4 capítulos, de la siguiente manera: El primer capítulo presenta la fundamentación teórica de la morfología y el cáncer de mama, las técnicas diagnósticas de cáncer de mama, el concepto del efecto de Campo Carcinogénico, todo lo relacionado con espectroscopia Raman y el fundamento de nuestra investigación. El segundo capítulo muestra la metodología implementada para la toma de las medidas Raman sobre el tejido en estudio. El tercer capítulo exhibe los resultados obtenidos del proceso de medición junto con el análisis correspondiente y finalmente se presentan las conclusiones de este proyecto de investigación.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

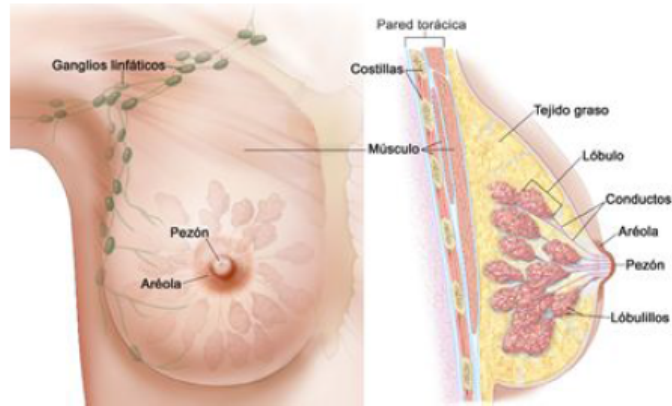
En este capítulo se introducen los conceptos principales necesarios para estudiar el tejido mamario con la técnica de espectroscopia Raman: en la primera sección, se presenta la morfología de la mama y el cáncer de mamas según su clasificación, en la segunda sección se presentan las técnicas diagnósticas del cáncer de mamas, en la tercera sección se explica el efecto de campo carcinogénico, en la cuarta sección se presenta todo lo concerniente a la espectroscopia Raman, y por último, se presenta nuestra investigación.

1.1. MORFOLOGÍA DEL TEJIDO MAMARIO Y CÁNCER DE MAMA

La glándula mamaria está conformada por diferentes tipos de tejidos, que van de tejido muy adiposo a tejido muy denso. Dentro del tejido, se encuentra una red de lóbulos, cada uno de los cuales está formado por pequeñas estructuras tubulares llamadas lobulillos encargados de producir leche. Tubos delgados llamados conductos se encargan de transportar la leche desde los lobulillos al pezón ubicado en el centro de la areola. La mama también contiene vasos sanguíneos y vasos linfáticos los cuales nutren las células y drenan los productos de desecho corporal. Los vasos linfáticos confluyen en pequeñas formaciones redondeadas denominadas ganglios linfáticos que ayudan a combatir las infecciones. La mama además contiene grasa y tejido conjuntivo, los cuales le proporcionan consistencia y volumen¹(ver figura 1).

¹INSTITUTO-NACIONAL-DE-CÁNCER. *Cáncer de mama. (en línea)*. EE.UU. 2015. (Recuperado en 20 noviembre 2017). Disponible en <https://www.cancer.gov/types/breast>.

Figura 1: Anatomía de la mama femenina



Fuente: INSTITUTO-NACIONAL-DE-CÁNCER. *Cáncer de mama. (en línea)*. EE.UU. 2015. (Recuperado en 20 noviembre 2017). Disponible en <https://www.cancer.gov/types/breast>

Según la American Cancer Society “el cáncer de mama se origina cuando las células en el tejido mamario comienzan a crecer en forma descontrolada, estas células normalmente forman un tumor que a menudo se puede observar en una radiografía o se puede palpar como una protuberancia, el tumor es maligno si las células pueden crecer penetrando los tejidos circundantes o propagándose (hacer metástasis) a áreas distantes del cuerpo”. Existen diferentes tipos de cáncer de mama, sin embargo, la mayoría de ellos están clasificados como: in situ, o invasivos y los más comunes según la American Cancer Society son: Carcinoma ductal in situ, Carcinoma ductal invasivo o infiltrante, Carcinoma lobulillar in situ, carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante²:

- **Carcinoma ductal in situ** (*ductal carcinoma in situ, DCIS*), también conocido como carcinoma intraductal, se considera un cáncer de seno no invasivo o preinvasivo. Las células que cubren los conductos han cambiado y lucen como

²AMERICAN-CANCER-SOCIETY. *Tipos de cáncer de seno. (en línea)*. EE.UU. 2018. (Recuperado en 19 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>.

células cancerosas, sin embargo, no se han propagado a través de las paredes de los conductos hacia el tejido que rodea el seno. El DCIS se considera un precáncer porque en algunos casos se puede convertir en un cáncer invasivo. Sin embargo, actualmente, no existe una buena manera de saber cuáles casos se convertirán en cánceres invasivos y cuáles no.

- **Carcinoma ductal invasivo o infiltrante** (*invasive ductal carcinoma, IDC*), es el tipo más común de cáncer de seno. Este cáncer comienza en un conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno. En este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Aproximadamente ocho de 10 de los cánceres invasivos del seno son carcinomas ductales infiltrantes.
- **Carcinoma lobulillar in situ** (*lobular carcinoma in situ, LCIS*), también se le denomina neoplasia lobulillar. Este cambio del seno no es un cáncer, aunque el nombre puede causar confusión. En el LCIS, las células con aspecto de células cancerosas crecen en los lobulillos de las glándulas productoras de leche del seno, pero no atraviesan la pared de los lobulillos.
- **Carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante** (*invasive lobular carcinoma, ILC*), comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). Al igual que el IDC, puede propagarse (hacer metástasis) a otras partes del cuerpo. Aproximadamente uno de cada 10 de los cánceres invasivos del seno es un ILC. El carcinoma lobulillar invasivo puede ser más difícil de detectar por mamograma que el carcinoma ductal invasivo.

Para detectar los distintos tipos de cáncer o las alteraciones presentes en el tejido mamario, se utilizan diversas técnicas que se describirán en la sección que se presenta a continuación.

1.2. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE CÁNCER DE MAMA

Para realizar un diagnóstico del tejido mamario se emplean diferentes técnicas las cuales actualmente se pueden clasificar en tres tipos, las tradicionales, las nuevas técnicas en formación de imágenes que no son actualmente implementadas en el sistema de salud en Colombia, y las técnicas funcionales, las cuales miden algún tipo de propiedad física y/o química dentro del tejido.

1.2.1. técnicas tradicionales Las técnicas de detección de cáncer de mama más utilizadas en nuestro país son:

Primero, *la autoexploración de mamas*, la cual consiste en palpar el tejido de la mama de forma regular, esta es una buena manera de detectar el cáncer de mama en un estadio temprano, este tipo de examen debe realizarse por lo menos una vez al mes.

Segundo, *la mamografía*, la cual es una técnica de radiología basada en los distintos grados de absorción de los rayos X por los diferentes componentes en los tejidos blandos de la mama, es una herramienta que sirve no solo para detectar el cáncer de mama sino también para diagnosticar y evaluar esta enfermedad. Es una técnica aplicable solo a mujeres mayores de 40 años y como cualquier examen médico implica riesgos, como lo es el que la prueba muestre erróneamente un posible tumor; esto se denomina un falso positivo, este hecho se presenta en el 10 al 15 por ciento de los casos³.

Tercero, *la resonancia magnética (IRM)*, es una tecnología que utiliza imanes y ondas de radio para generar imágenes transversales de alta definición del interior del cuerpo, la IRM de mama se aplica para el control de mujeres con alto riesgo de cáncer de mama, con el fin de obtener más información sobre una zona sospechosa que fue detectada en una mamografía. Esta técnica se usa para tratar de visualizar pequeñas masas, especialmente en el caso de mujeres que tienen tejido mamario muy denso. Sin embargo,

³BREASTCANCER.ORG. *Análisis para detectar el cáncer de mama: detección, diagnóstico y control. (en línea)*. EE.UU. 2016. (Recuperado en 20 enero 2018). Disponible en <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/analisis/tipos>.

las IRM tienen un índice más alto de resultados falso positivo.

Cuarto, *la biopsia*, es una operación que se hace para extraer tejido de una zona específica que resulta sospechosa después de un estudio por imágenes, un patólogo es el encargado de analizar la muestra de tejido para ver si hay células cancerosas o no, si el patólogo detecta la presencia de cáncer, procede a analizar sus características. Otras pruebas pueden indicar la presencia de cáncer, pero solo una biopsia permite formular un diagnóstico definitivo⁴.

1.2.2. nuevas técnicas Actualmente se están desarrollando nuevas técnicas por imágenes para la detección de cáncer de mama, sin embargo, se requiere tiempo para saber si cualquiera de estas técnicas resulta más eficaz o mejor que las utilizadas en la actualidad⁵.

Hay un tipo de mamograma nuevo conocido como *tomosíntesis del seno o mamografía en 3D*, el cual emplea un equipo que toma muchas radiografías a medida que se mueve sobre el seno empleando bajas dosis de radiación, una computadora reúne las imágenes en una imagen tridimensional. Un mamograma puede detectar el cáncer de seno en sus etapas tempranas, cuando es pequeño y aun antes de que se pueda palpar una protuberancia, los dos tipos principales de cambios en los senos que se encuentran con un mamograma son las calcificaciones y las masas.

También existe *la imagen diagnóstica molecular del seno (MBI)* es un estudio en el cual se inyecta un químico radiactivo en la sangre, y se utiliza una cámara especial para verlo en el seno. En la actualidad, este estudio se evalúa como una forma para darle seguimiento a una protuberancia o anomalía vista en un mamograma. También se está evaluando como un estudio que puede utilizarse para detectar cáncer en mujeres con

⁴ASCOCANCER.NET. *Cáncer de mama: Diagnóstico. (en línea)*. EE.UU. 2016. (Recuperado en 19 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/diagnostico>.

⁵AMERICAN-CANCER-SOCIETY. *Estudios por imágenes de seno recientes y experimentales. (en línea)*. EE.UU. 2018. (Recuperado en 20 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/estudios-experimentales-por-imagenes-para-los-senos.html>.

senos densos. La desventaja principal es que expone todo el cuerpo a radiación.

La mamografía por emisión de positrones (PEM) es un estudio por imágenes del seno en el cual una forma de azúcar unida a una partícula radiactiva se inyecta en la sangre para detectar células cancerosas. La PEM puede que sea mejor en la detección de agrupaciones pequeñas de células cancerosas en el seno. Al igual que la MBI, este estudio expone todo el cuerpo a radiación, así que es poco probable que sea un examen que pueda utilizarse cada año para la detección de cáncer de seno.

Otra técnica en estudio es *la elastografía* la cual se basa en la idea de que los cánceres de seno tienden a ser más firmes y más rígidos que el tejido circundante del seno. Para este estudio, se comprime ligeramente el seno para que la ecografía pueda mostrar cuán firme es un área sospechosa. Este estudio podría ser útil al indicar si el área es más probable que sea cáncer o un tumor benigno.

1.2.3. técnicas funcionales Como técnicas funcionales para la detección de cáncer de mama que se encuentran aún en investigación, están las técnicas eléctricas que estudian las propiedades eléctricas del tejido al interactuar corriente con este, *la tomografía de impedancia eléctrica (EIT)* hace parte de este grupo de técnicas, consiste en escanear los senos para medir su conductividad eléctrica, se basa en la idea de que las células cancerígenas conducen electricidad de forma distinta a como lo hacen las células normales. En la prueba se aplica una corriente eléctrica (que varía a distintas frecuencias) muy pequeña a través del seno que luego es detectada sobre la piel de este, esto se realiza con electrodos pequeños que se colocan sobre la piel. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado suficientes pruebas clínicas para que se pueda usar en pruebas de detección del cáncer de seno⁶.

Otro tipo de técnicas funcionales son las técnicas ópticas, las cuales permiten medir características funcionales y morfológicas del tejido. Dentro de este grupo se encuentra *la tomografía óptica difusa (DOT)*, una técnica rápida y no invasiva, la cual usa luz difusa

⁶DEAN, DA y col. «Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues». En: *Journal of electrostatics* 66.3-4 (2008), págs. 165-177.

que penetra los tejidos en diferentes proyecciones para producir imágenes tomográficas, proporcionando información sobre la absorción y dispersión de la luz, esta técnica es útil a la hora de detectar aumento en la vascularización sanguínea asociada a la alimentación de los tumores⁷. Otra técnica óptica es la termografía de mama también llamada imagen térmica, mediante la cual se mide la temperatura de la piel en la superficie mamaria, se fundamenta en la idea de que el tumor aumenta el flujo sanguíneo y metabolismo lo que conlleva al aumento de temperatura en la piel⁸.

La espectroscopia Raman es otra técnica óptica que se ha empleado para el estudio del cáncer de mama, es una técnica no destructiva, es decir, no altera el material que se desea analizar, y estudia tejido exvivo, en otras palabras, tejido que ha sido extraído de la mama por medio de una biopsia. Esta técnica proporciona información química y estructural de un material posibilitando de esta manera su identificación⁹, en cuanto al estudio de tejido la espectroscopia Raman permite observar diferencias bioquímicas entre tejido normal y anormal¹⁰, detectando cambios en los modos vibracionales de los componentes del tejido ante la presencia de anomalías asociadas a tejido neoplásico¹¹.

Actualmente, la investigación en detección temprana de cáncer no solo se enfoca en el desarrollo e implementación de nuevas técnicas, sino que se ha direccionado hacia el estudio del desarrollo de las anomalías presentes en el tejido, las cuales corroboran la existencia del efecto de campo carcinogénico.

⁷NIOKA, S y CHANCE, B. «NIR spectroscopic detection of breast cancer». En: *Technology in cancer research & treatment* 4.5 (2005), págs. 497-512.

⁸FAUSTINO-ROCHA, AI y col. «Ultrasonographic, thermographic and histologic evaluation of MNU-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats». En: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67.8 (2013), págs. 771-776.

⁹SALA, Oswaldo. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. Unesp, 1996, pág. 75. ISBN: 9788571398689.

¹⁰BUTLER, Holly J y col. «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials». En: *Nature protocols* 11.4 (2016), pág. 664.

¹¹SHAFER-PELTIER, Karen E y col. «Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo». En: *Journal of Raman Spectroscopy* 33.7 (2002), págs. 552-563.

1.3. EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO (FIELD CANCERIZATION EFFECT "FCE")

Este efecto se conoce como la existencia de alteraciones en tejido normal circundante a tejido anómalo (alterado)¹². FCE se ha detectado en diferentes tipos de cáncer entre ellos: pulmón¹³, colon¹⁴, ovario¹⁵ y mama¹⁶. Esto ha conducido a diversos grupos de investigación a proponer este efecto como una alternativa para realizar detección temprana del cáncer, por ejemplo, Vadim Backman y colaboradores han construido una técnica óptica PWS (Partial Wave Spectroscopy) que mide cambios en el índice de refracción de los tejidos, el cual cambia de acuerdo al estado del tejido¹⁷, estos cambios los han vinculado con FCE utilizando el denominado órgano espejo, es decir, para hacer pre tamizaje de cáncer de colon toman como órgano espejo el recto¹⁸. Esta teoría se ha llevado un poco más a profundidad relacionando todas las transformaciones anómalas que ocurren en el tejido a nivel celular con alteración de la señalización celular, es decir, las células anormales o transformadas cambian la señalización celular de las células normales para su proliferación, esto se conoce como el efecto de amplificación de anomalías bioquímicas por FCE¹⁹. Desde este punto de vista, cuando un paciente presenta alguna anomalía en el tejido mamario que conduzca a la implementación de una biopsia, el análisis histopatológico realizado solo permite por el alcance del microscopio a diferenciar zonas visiblemente alteradas y aquellas aparentemente normales, las cuales tienen

¹²TRUJILLO y col., «Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies», óp.cit., pág. 74.

¹³ROY, Hemant K y col. «Optical detection of buccal epithelial nanoarchitectural alterations in patients harboring lung cancer: implications for screening». En: *Cancer research* 70.20 (2010), págs. 7748-7754.

¹⁴BACKMAN, Vadim y ROY, Hemant K. «Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification». En: *Journal of Cancer* 4.3 (2013), pág. 251.

¹⁵DAMANIA, Dhwanil y col. «Insights into the field carcinogenesis of ovarian cancer based on the nanocytology of endocervical and endometrial epithelial cells». En: *International journal of cancer* 133.5 (2013), págs. 1143-1152.

¹⁶MAO, Yan y col. «Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer». En: *Cancer and Metastasis Reviews* 32.1-2 (2013), págs. 303-315.

¹⁷BACKMAN y ROY, «Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification», óp.cit., pág. 254.

¹⁸SUBRAMANIAN, Hariharan. «Optical sensing of tissue microstructure and cell nanostructure». Tesis doct. Northwestern University, 2009.

¹⁹FERNÁNDEZ y col., «Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells?», óp.cit., pág. 109.

una alteración en su señalización no son visibles. Por lo tanto, la existencia del FCE ha cobrado gran importancia en la detección temprana del cáncer. Este efecto se puede estudiar por medio de técnicas ópticas que permitan detectar cambios bioquímicos en el tejido y una de estas técnicas es la espectroscopia Raman²⁰.

1.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN

La denominación Raman se debe al físico Indio Chandrasekhara Raman quien reportó este efecto en 1928, investigando la dispersión de la luz por las moléculas y fue galardonado por ello con el Premio Nobel en 1930²¹. Este efecto habría sido predicho teóricamente por Smekal en 1923 y hubo otras observaciones del mismo²², sin embargo, la publicación más completa fue la de Raman. Con la aparición del láser en 1960 se multiplicaron los trabajos de investigación relacionados con procesos multifotónicos. Cuando se incide una radiación monocromática sobre un líquido puro o un vapor y se analiza con detalle la radiación dispersada, representando la intensidad en función de la diferencia de frecuencias entre la radiación incidente y la dispersada, se obtiene el espectro Raman de la sustancia bajo estudio. Una de las características más importantes de este espectro es que independientemente de la frecuencia incidente, el espectro resultante es el mismo²³.

El efecto Raman se interpreta en el modelo de la mecánica clásica, como una dispersión inelástica de la luz en la que las moléculas o átomos ganan o pierden energía, de tal manera que la luz incidente sobre la muestra difiere de la dispersada. En las moléculas no solo se realizan transiciones electrónicas, también las moléculas vibran y rotan, y estos movimientos realizan transiciones energéticas. En la dispersión Raman se dan dos tipos de transiciones, denominadas Stokes en caso de que el sistema acceda a un estado

²⁰HAKA, Abigail S y col. «Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis». En: *Journal of biomedical optics* 14.5 (2009), pág. 054023.

²¹RAMAN, Chandrasekhara Venkata. «A new radiation». En: (1928).

²²REQUENA, Alberto y ROMÁN, José Z. *Espectroscopia*. Pearson Educación, 2004, pág. 540. ISBN: 9788420536774.

²³RAMOS, Jorge C.; LUNA, Adrián E. y LIMA, Carlos M. «Espectroscopia Raman y sus aplicaciones». En: *spectroscopy* 36 (2005), págs. 1059-1067.

de mayor energía denominado estado virtual, es decir, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula, como resultado de ello la radiación dispersada tendrá una frecuencia menor comparada con la frecuencia de la radiación incidente y anti-Stokes en caso de que el sistema finalice en un estado de menor energía, es decir, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón, en este caso la radiación dispersada tendrá una frecuencia mayor a la frecuencia de la radiación incidente²⁴.

1.4.1. fundamento físico de la espectroscopia raman Desde el punto de vista de la electrodinámica clásica, el fenómeno de dispersión puede interpretarse de la siguiente manera: Cuando un haz de luz monocromático incide sobre un material, parte de este haz es dispersado debido a la interacción de la onda electromagnética incidente con la materia, existen dos tipos de dispersión: la dispersión elástica o dispersión Rayleigh, donde la energía se conserva, es decir, la frecuencia de la onda resultante es igual a la frecuencia de la onda incidente. Cuando la luz dispersada tiene menor energía que la luz incidente, el efecto es llamado dispersión Raman stokes y cuando la luz dispersada tiene mayor energía que la luz incidente se denomina dispersión Raman anti-stokes.

Para explicar el fenómeno de dispersión Raman por medio de un modelo ondulatorio, se supone un haz de radiación como una onda electromagnética de frecuencia inicial ϑ_0 que incide sobre un material, esta onda electromagnética se compone de un campo eléctrico y un campo magnético, el cual es 10^8 veces menor en magnitud que el campo eléctrico, por lo que en esta interpretación la interacción del campo magnético con la materia se considera despreciable. Entonces, la variación en el tiempo de la magnitud del campo eléctrico E incidente está representado por:

$$E = E_0 \cos(2\pi\vartheta_0 t) \tag{1.1}$$

Donde E_0 es la amplitud de la onda incidente. Cuando este campo eléctrico interactúa con la nube electrónica de un enlace del analito, se induce un momento dipolar eléctrico

²⁴SMITH, Ewen y DENT, Geoffrey. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2013, pág. 112. ISBN: 9781118681329.

de la forma:

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\vartheta_0 t) \quad (1.2)$$

Donde α es la polarizabilidad eléctrica del enlace que varía en función de la distancia entre los núcleos de acuerdo con la ecuación:

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (1.3)$$

α_0 es la polarizabilidad del enlace a una distancia internuclear de equilibrio r_{eq} , r es la separación internuclear en un instante dado y $\frac{\partial \alpha}{\partial r}$ indica la variación de la polarizabilidad con respecto a la separación internuclear. La separación internuclear varía con la frecuencia de la vibración ϑ_m , así:

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi\vartheta_m t) \quad (1.4)$$

r_m es la separación internuclear máxima en relación con la posición de equilibrio, ϑ_m es la frecuencia normal de vibración de los átomos .

Sustituyendo (1.4) en (1.3) se tiene:

$$\alpha = \alpha_0 + r_m \cos(2\pi\vartheta_m t) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (1.5)$$

Ahora se sustituye (1.5) en (1.2) y se obtiene:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\vartheta_0 t) + E_0 r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos(2\pi\vartheta_m t) \cos(2\pi\vartheta_0 t) \quad (1.6)$$

Aplicando identidades trigonométricas a la anterior ecuación se llega a:

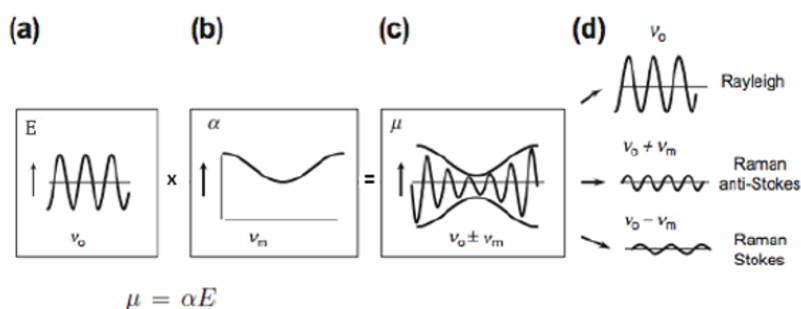
$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\vartheta_0 t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\vartheta_0 - \vartheta_m)t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\vartheta_0 + \vartheta_m)t] \quad (1.7)$$

La expresión (1.7) en este modelo representa el momento dipolar eléctrico de las moléculas o átomos dentro del material al interactuar con la onda electromagnética. En esta expresión se visualizan tres términos matemáticos que permiten observar dos fenómenos: dispersión de Rayleigh y Raman²⁵. El primer término a la derecha en esta

²⁵SKOOG, Douglas Arvid; HOLLER, F James y NIEMAN, Timothy A. *Principios de análisis*

ecuación se asocia a la dispersión de Rayleigh, la cual ocurre a una frecuencia ν_0 igual a la frecuencia de excitación externa, los dos siguientes términos se relacionan con el efecto Raman, obteniendo un término para la denominada frecuencia Stokes $\nu_0 - \nu_m$ y un término para la correspondiente frecuencia anti-Stokes $\nu_0 + \nu_m$ (ver figura 2).

Figura 2: Representación de la dispersión de Rayleigh y Raman. (a) Oscilación del campo eléctrico incidente. (b) Las Vibraciones atómicas cambian la polarizabilidad, que a su vez cambia la amplitud de oscilación del momento dipolar. (c) Interacción del campo eléctrico con el momento dipolar del material. (d) Amplitudes resultantes de la interacción.



Fuente: LARKIN, Peter. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017, pág. 154. ISBN: 9780128042090, pág. 18

Las variaciones de frecuencia que ocurren en el fenómeno de dispersión Raman, se deben a variaciones de energía. Los átomos que se encuentran enlazados formando moléculas y redes cristalinas, presentan constantes movimientos vibracionales y rotacionales, estos movimientos se realizan a frecuencias determinadas en función de la masa de las partículas y del comportamiento de los enlaces existentes. Para obtener teóricamente las frecuencias de vibración propias de una molécula se puede emplear la teoría de vibraciones moleculares, la cual permite la descripción del movimiento de los átomos en una molécula haciendo uso de las coordenadas internas que se definen en términos de distancias y ángulos de enlace, dichas coordenadas internas S_t , no son afectadas por las rotaciones o traslaciones del sistema como un todo²⁶.

instrumental. McGraw-Hill Interamericana de España, 2001, pág. 639. ISBN: 9789706868299.

²⁶WILSON, Edgar Bright; DECIUS, John Courtney y CROSS, Paul C. *Molecular vibrations:*

Para describir la energía potencial y la energía cinética en términos de las coordenadas internas es necesario establecer una relación entre las coordenadas internas y las coordenadas cartesianas de los átomos²⁷. La transformación entre las coordenadas cartesianas de desplazamiento y las coordenadas internas está dada por:

$$S_t = \sum_{i=1}^{3N} B_{ti} \xi_i \quad \forall \quad t = 1, 2, \dots, 3N - 6 \quad (1.8)$$

Las coordenadas internas se pueden expresar en términos de los vectores de máxima variación como sigue:

$$S_t = \sum_{\alpha=1}^N \vec{S}_{t\alpha} \cdot \vec{p}_\alpha \quad \forall \quad t = 1, 2, \dots, 3N - 6 \quad (1.9)$$

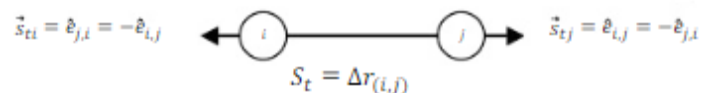
Donde $\vec{S}_{t\alpha}$ se define como un vector que contiene las componentes B_{ti} para un átomo α y \vec{p}_α es el vector cuyas componentes corresponden a los desplazamientos en coordenadas cartesianas ξ_i para un átomo α . A continuación se describen los vectores $\vec{S}_{t\alpha}$ para 4 diferentes coordenadas internas:

- **Estiramiento de enlaces:** El estiramiento es una coordenada que sólo involucra 2 átomos que están conectados por un enlace. En la figura 3 se muestra la coordenada interna de estiramiento y los vectores de máxima variación con los cuales puede describirse dicha coordenada.

the theory of infrared and Raman vibrational spectra. Courier Corporation, 1955, pág. 221. ISBN: 9780486137155.

²⁷MIRANDA, D. A. «Seminaro doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008.

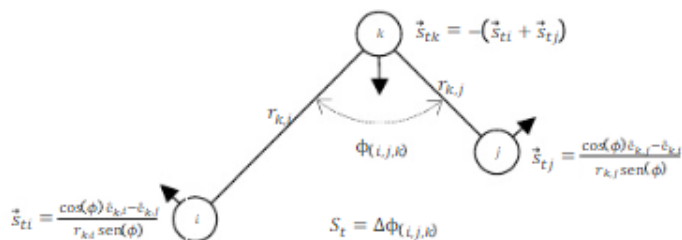
Figura 3: Vectores para estiramiento de enlace.



Fuente: MIRANDA, D. A. «Seminario doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008, pág. 12

- Flexión de los ángulos entre dos enlaces:** La flexión es la coordenada interna que involucra 3 átomos, de los cuales uno de ellos está enlazado con los otros dos por medio de dos enlaces que forman entre si un ángulo Φ . La flexión corresponde a la variación del ángulo entre los dos enlaces formados por los tres átomos como se muestra en la figura 4.

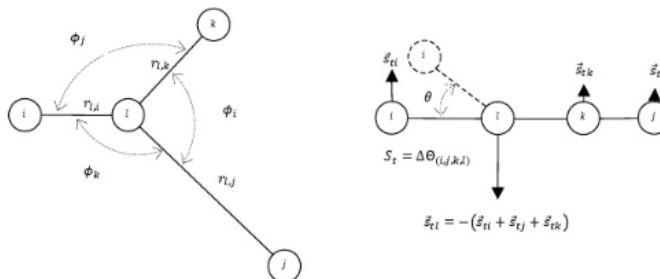
Figura 4: Vectores para flexión de los ángulos entre dos enlaces.



Fuente: MIRANDA, D. A. «Seminario doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008, pág. 14

- Ángulo entre un enlace y un plano definido por dos enlaces:** Es una coordenada interna que involucra 4 átomos, de los cuales uno de ellos está enlazado con los otros 3 por medio de tres enlaces que forman entre sí los ángulos ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 . Esta coordenada corresponde a la variación del ángulo entre uno de los enlaces y el plano definido por los otros dos enlaces como se muestra en la figura 5.

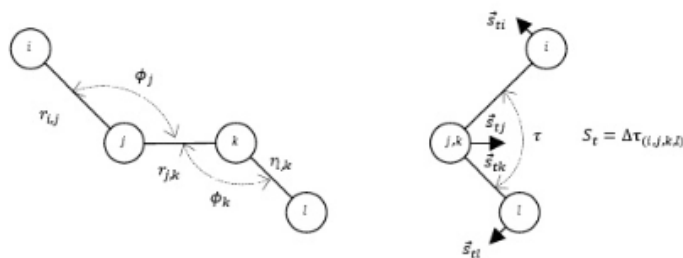
Figura 5: Vectores para el ángulo entre un enlace y un plano definido por dos enlaces.



Fuente: MIRANDA, D. A. «Seminario doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008, pág. 17

- **Torsión:** Es la coordenada interna que involucra 4 átomos. Esta coordenada interna corresponde a la variación del ángulo entre dos enlaces separados por dos átomos como se muestra en la figura 6.

Figura 6: Vectores para el ángulo de torsión.



Fuente: MIRANDA, D. A. «Seminario doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008, pág. 20

Para describir el movimiento de los átomos en una molécula o red cristalina es necesario calcular la energía cinética y la energía potencial en términos de las coordenadas internas S_t , para ello se define la matriz G la cual está relacionada con las masas y las distancias

de los enlaces atómicos:

$$G = \sum_{\alpha=1}^N \frac{1}{m_{\alpha}} \vec{S}_{t,\alpha} \cdot \vec{S}_{t',\alpha} \quad \leftrightarrow \quad t, t' = 1, 2, \dots, 3N - 6 \quad (1.10)$$

Donde m_{α} es la masa del átomo α , así la energía cinética viene dada por:

$$2T = \dot{\vec{s}}^{\dagger} G^{-1} \dot{\vec{s}} \quad (1.11)$$

La energía potencial en términos de las coordenadas internas S_t es la siguiente:

$$2V = \sum_{t,t'} F_{t,t'} S_t S_{t'} \quad (1.12)$$

Donde los coeficientes $F_{t,t'}$ forman la matriz de constantes de fuerza F . De modo que el Hamiltoniano que describe el movimiento de los átomos en una molécula en términos de las coordenadas internas, tiene la siguiente forma:

$$H = \frac{1}{2} \sum_{t,t'} (G^{-1})_{t,t'} \dot{S}_t \dot{S}_{t'} + \frac{1}{2} \sum_{t,t'} F_{t,t'} S_t S_{t'} \quad (1.13)$$

La ecuación secular en términos de las coordenadas internas es la siguiente:

$$|FG - w^2 I| = 0 \quad (1.14)$$

Esta ecuación secular permite calcular los modos normales de vibración a partir del cálculo de la matriz G y la matriz F . Experimentalmente se obtienen las frecuencias vibracionales propias de las moléculas que componen el material en estudio y se grafica la intensidad de la radiación dispersada en función de las frecuencias Raman²⁸.

1.4.2. instrumentación El equipo de espectroscopía Raman normalmente consta de tres componentes principales:

²⁸CARDONA, Manuel y PETER, Yu. *Fundamentals of semiconductors*. Springer, 2005, pág. 437. ISBN: 9783642007101.

- *Fuentes de excitación*

La fuente de excitación utilizada en los equipos Raman es el láser, este tipo de fuente se caracteriza por ser monocromática, ser direccional y tener la misma fase, lo que la constituye en una fuente de emisión coherente, permitiendo la concentración de una gran cantidad de energía en una superficie relativamente pequeña. La alta intensidad por unidad de área producida por el láser genera la suficiente dispersión Raman como para poder ser medida con una intensidad mayor que el ruido no deseado del equipo. Las fuentes comúnmente utilizadas en los equipos Raman son las siguientes: láser de Argón cuya longitud de onda es 514.5 nm, láser de Kriptón cuya longitud de onda es 530.9 nm- 647.1 nm, láser de He-Ne cuya longitud de onda es 632.8 nm, laser de diodo con longitud de onda 785 nm-830 nm y Nd:YAG (por sus siglas en inglés neodymium-doped yttrium aluminium garnet) cuya longitud de onda es 1064 nm. Las fuentes mencionadas van desde el azul hasta el infrarrojo cercano²⁹.

- *Espectrómetros Raman*

Los primeros espectrómetros usaban lámparas de descargas de mercurio como fuente de iluminación y placas fotográficas para detectar la luz. La invención de tubos fotomultiplicadores permitió la colección y manipulación electrónicamente de la luz detectada pero sólo son capaces de medir una sola longitud de onda. Los espectrómetros modernos utilizan dispositivos acopladores de carga (CCDs) los cuales son altamente sensitivos y tienen la capacidad de medir todo el espectro de una sola vez. Hay una gama de opciones de CCD disponibles, incluyendo CCDs multiplicadores de electrones (EMCCDs) que a intensidades de dispersión extremadamente bajas pueden proporcionar una sensibilidad superior a los CCD convencionales. Para los estudios NIR más allá de 950 nm, los detectores multicéntricos como los detectores de arseniuro de galio indio (InGaAs) son ventajosos para superar el ruido generado térmicamente en la región de mayor longitud de onda³⁰.

La principal dificultad en la espectroscopia Raman es que La dispersión de Rayleigh es más intensa que la dispersión Raman y puede dominar fácilmente la señal,

²⁹MCCREERY, Richard L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Vol. 225. John Wiley & Sons, 2005, pág. 312. ISBN: 9780471231875.

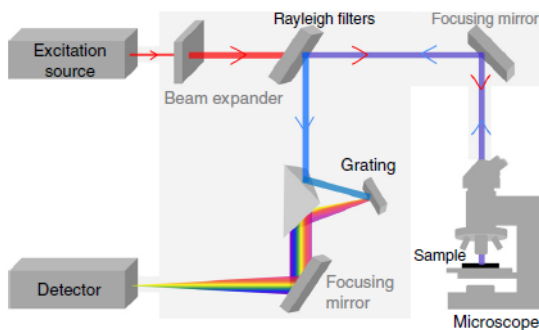
³⁰BUTLER y col., «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials», óp.cit., pág. 665.

por lo que debe ser filtrada ópticamente. Los filtros rechaza-banda (notch) se utilizan comúnmente debido a que son capaces de filtrar aproximadamente 100 cm^{-1} de la longitud de onda del láser. Sin embargo, este tipo de filtros no son usados cuando los desplazamientos Raman son más bajos a esa región. Para mejorar esto se emplean múltiples etapas de dispersión ya sean dobles o triples. Mientras más rejillas de difracción se tengan menor será el ruido que se introduzca en el detector³¹. La Figura 7 muestra el diagrama de un arreglo para hacer espectroscopia Raman, el cual consiste en una fuente de excitación, un microscopio y un espectrómetro Raman.

- *Unidades de medición*

Cabe resaltar que el desplazamiento del número de onda Raman respecto al número de onda incidente es independiente de este último y por ello suele tomarse este desplazamiento como abscisa para representar los espectros Raman. La banda Rayleigh estará situada en el centro como origen del eje. De tal forma en el eje de abscisas en realidad aparecerá la diferencia entre el número de onda Raman y el de excitación del láser. La magnitud del desplazamiento Raman es independiente de la longitud de onda de excitación³².

Figura 7: Diagrama experimental para un sistema de espectroscopia Raman.



Fuente: BUTLER, Holly J y col. «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials». En: *Nature protocols* 11.4 (2016), pág. 664

³¹RAMOS; LUNA y LIMA, «Espectroscopia Raman y sus aplicaciones», óp.cit., pág. 1061.

³²Ibíd., pág. 1063.

1.4.3. investigaciones y aplicaciones médicas de la espectroscopia raman

La espectroscopia Raman es una herramienta poderosa para el estudio de materiales biológicos ya que permite una rápida y alta resolución en la adquisición de información bioquímica y estructural, de ahí que es utilizada frecuentemente en Biología y Medicina en el diagnóstico de enfermedades y métodos de control de terapia³³. El uso de la espectroscopia Raman en la medicina comenzó a mediados de la década de 1970 con el trabajo de Yu y colaboradores el cual mostró que se podían obtener espectros Raman de lentes oculares³⁴, en esa misma década Hartman y colaboradores publicaron los primeros espectros Raman de virus intactos³⁵.

La capacidad de la técnica Raman a la hora de estudiar la composición química tanto in-vivo como in-vitro de tejido biológico sin destruir el material, la hace una herramienta importante en la investigación biomédica, es por ello que en las últimas décadas la espectroscopia Raman ha tenido distintas aplicaciones biomédicas que incluyen estudios in vivo e in vitro de la piel³⁶, estudios de fármacos de transferencia transdérmica³⁷, estudios en la composición y estado de enfermedades del hueso³⁸, estudio de dientes³⁹, estudios de información detallada de aterosclerosis intra-coronaria⁴⁰, estudios en la córnea y fluidos del ojo⁴¹, e Identificación de distintos tipos de Cáncer que incluyen cáncer

³³SALA, *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*, óp.cit., pág. 77.

³⁴ASKREN, Carl C; YU, Nai-Teng y KUCK Jr, John FR. «Variation of the concentration of sulfhydryl along the visual axis of aging lenses by laser Raman optical dissection technique». En: *Experimental eye research* 29.6 (1979), págs. 647-654.

³⁵RAMSER, Kerstin. «Raman spectroscopy of single cells for biomedical applications». En: *Applications of Raman spectroscopy to biology-from basic studies to disease diagnosis*, (Ghomi, M., Ed.), IOS Press, Amsterdam (2012), págs. 106-147.

³⁶CASPERS, PJ y col. «In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin». En: *BIOSPECTROSCOPY-NEW YORK- 4* (1998), S31-S40.

³⁷TFAYLI, Ali y col. «Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin». En: *Biopolymers* 87.4 (2007), págs. 261-274.

³⁸MORRIS, Michael D y col. «Bone tissue ultrastructural response to elastic deformation probed by Raman spectroscopy». En: *Faraday discussions* 126 (2004), págs. 159-168.

³⁹SPIZZIRRI, PG y col. «A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy». En: *Caries research* 46.4 (2012), págs. 353-360.

⁴⁰POLL, Sweder WE van de y col. «Raman spectroscopic evaluation of the effects of diet and lipid-lowering therapy on atherosclerotic plaque development in mice». En: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21.10 (2001), págs. 1630-1635.

⁴¹ASKREN; YU y KUCK Jr, «Variation of the concentration of sulfhydryl along the visual axis of aging lenses by laser Raman optical dissection technique», óp.cit., pág. 651.

de piel, oral⁴², de mama⁴³, de cuello uterino⁴⁴ y colo-rectal⁴⁵.

En cuanto al estudio de distintos tipos de cáncer, lo que hace relevante a la espectroscopia Raman es la capacidad de identificar marcadores asociados con cambios malignos en el tejido, dicha información espectroscópica es útil tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de cáncer. Los tejidos normales y neoplásicos tienen distintas características bioquímicas que son el resultado de procesos biológicos que ocurren a nivel celular. Estudios realizados en tejido mamario humano mediante espectroscopia Raman evidencian diferencias entre tejido mamario canceroso y tejido normal circundante, en regiones correspondientes a las vibraciones de carotenoides, ácidos grasos, proteínas y agua interfacial^{46,47}, también se ha comprobado que las diferencias entre los espectros Raman de tejido fresco y fijado en formalina son insignificantes y no afectan la calidad del espectro⁴⁸.

1.4.4. caracterización de materiales biológicos por espectroscopia raman

La espectroscopia Raman permite obtener una medición cualitativa de la composición bioquímica de una muestra ya que independientemente de la longitud de onda incidente cada molécula tiene modos vibracionales propios. Para especímenes biológicos las regiones Raman significativas que se observan caen en el rango de 400-2000 (cm^{-1}), y están asociados con vibraciones de unión de proteínas (1500-1700 cm^{-1}), carbohidratos (470-1200 cm^{-1}), grupos fosfato de ADN (980, 1080 y 1240 cm^{-1}) y bio-

⁴²OLIVEIRA, Ana Paula y col. «Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis». En: *Photomedicine and Laser Therapy* 24.3 (2006), págs. 348-353.

⁴³HAKA, Abigail S y col. «Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy». En: *Cancer research* 62.18 (2002), págs. 5375-5380.

⁴⁴KANTER, Elizabeth M y col. «Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis». En: *Journal of biophotonics* 2.1-2 (2009), págs. 81-90.

⁴⁵ANDRADE, PO y col. «Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 387.5 (2007), págs. 1643-1648.

⁴⁶ABRAMCZYK, Halina y col. «The label-free Raman imaging of human breast cancer». En: *Journal of Molecular Liquids* 164.1-2 (2011), págs. 123-131.

⁴⁷SURMACKI, Jakub y col. «Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis». En: *Molecular cancer* 12.1 (2013), pág. 48.

⁴⁸TFAYLI y col., «Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies», óp.cit., pág. 269.

moléculas celulares adicionales; las vibraciones de enlace asociadas con el estiramiento de CH, NH y OH en lípidos y proteínas también pueden observarse en números de onda superiores ($2700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$). Como consecuencia, se puede construir la huella biológica distintiva de la muestra bajo investigación⁴⁹.

Una dificultad de la espectroscopía Raman es la baja sensibilidad debido a que la dispersión inelástica o efecto Raman es un fenómeno cuya probabilidad de ocurrencia es 10^8 veces menor que la dispersión de Rayleigh. Otra dificultad en la implementación de esta técnica es la interferencia de la fluorescencia y las señales Raman asociadas a los compuestos utilizados para el tratamiento de las muestras. Aun así, la aplicabilidad de esta técnica se debe en gran parte al avance tecnológico de las fuentes láser, detectores de bajo ruido, filtros efectivos Rayleigh y óptica de alto rendimiento⁵⁰.

Para estudiar muestras biológicas implementando la espectroscopia Raman los principales aspectos experimentales a tener en cuenta son: la preparación de la muestra, instrumentación, adquisición espectral, procesamiento de datos y análisis de datos.

- **Preparación de la muestra:** Una de las principales ventajas de la espectroscopía Raman en estudios biológicos es la capacidad de proporcionar información espectral sin destruir la muestra y con una preparación mínima de esta. En cuanto a la preparación de la muestra se debe tener en cuenta:

Tipo de muestra. Aunque es posible analizar directamente los tejidos frescos, la fijación puede ser un paso importante en la preparación de muestras de tejido de mamíferos o muestras de células cultivadas, ya que es un método estándar para el archivo de muestras, que permite obtener secciones delgadas de tejido fijo e incrustado. Un problema con este tipo de muestras es que la formalina y parafina puede alterar los picos espectrales asociados con proteínas y lípidos en las muestras, sin embargo, estas contribuciones pueden eliminarse mediante la eliminación de cera de la muestra o depilación digital⁵¹. El análisis de tejidos frescos o con-

⁴⁹BUTLER y col., «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials», óp.cit., pág. 667.

⁵⁰CHASE, Bruce. «A new generation of Raman instrumentation». En: *Applied Spectroscopy* 48.7 (1994), 14A-19A.

⁵¹TFAYLI y col., «Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma

gelados a presión puede superar estos inconvenientes, aunque la adquisición de la muestra se vuelve más difícil⁵². El análisis de células vivas permite interrogar células in situ en ambientes acuosos y cultivos de células mientras se mantienen los parámetros clave de crecimiento⁵³.

Sustratos Raman. La elección del sustrato es un factor importante en el diseño experimental, y depende de los resultados experimentales y las características de la muestra. Las propiedades más importantes a la hora de considerar el sustrato son las señales de fondo espectrales, el costo, la disponibilidad y la composición del sustrato. Los portaobjetos de vidrio son los más usados por su rentabilidad, pero tienen una fuerte fluorescencia de fondo en la mayoría de las longitudes de onda⁵⁴. El fluoruro de calcio (CaF₂), cuarzo o diapositivas de sílice fundida se utilizan como sustratos Raman, ya que muestran una mínima interferencia de fondo. Los portaobjetos de fluoruro de bario (BaF₂) también se han usado como sustratos Raman, pero su solubilidad parcial en agua los hace inadecuados para estudios in vivo y acuosos⁵⁵.

- **Instrumentación:** Los componentes principales que constituyen un equipo Raman son los mencionados a continuación⁵⁶:

Fuente de excitación: Hay tres parámetros principales que se deben considerar a la hora de elegir la fuente de excitación o sistema láser: (i) el tipo de fuente láser, (ii) la longitud de onda deseada y (iii) el tamaño de punto deseado. Estos parámetros dependen de la idoneidad de la muestra, de la sensibilidad y resolución requeridas en el estudio.

Modo Raman: Existen diferentes técnicas espectroscópicas Raman dentro de las cuales se encuentra: La técnica CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering),

spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies», óp.cit., pág. 271.

⁵²MARIANI, Melissa M y col. «Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy». En: *Analyst* 134.6 (2009), págs. 1154-1161.

⁵³BONNIER, Franck y col. «Imaging live cells grown on a three dimensional collagen matrix using Raman microspectroscopy». En: *Analyst* 135.12 (2010), págs. 3169-3177.

⁵⁴MANTSCH, Henry y col. *Biomedical applications of synchrotron infrared microspectroscopy: a practical approach*. Royal Society of Chemistry, 2010.

⁵⁵WEHBE, Katia y col. «The effect of optical substrates on micro-FTIR analysis of single mammalian cells». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405.4 (2013), págs. 1311-1324.

⁵⁶BUTLER y col., «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials», óp.cit., pág. 668.

SRS (Stimulated Raman scattering), SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) y la micro espectroscopía Raman espontánea la cual tiene la ventaja de ser un enfoque estándar que no requiere instrumentación adicional.

Detector: Debido a la débil intensidad de la dispersión Raman, el detector incluido en el sistema Raman debe ser extremadamente sensible. Los dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) están comúnmente integrados en los sistemas Raman, debido a que exhiben altas eficiencias cuánticas y baja relación señal/ruido. Para los estudios NIR más allá de 950 nm se emplean los detectores multicéntricos como los detectores de arseniuro de galio indio (InGaAs) ya que superan el ruido generado térmicamente en la región de mayor longitud de onda.

Hardware adicional: Como la dispersión Rayleigh es más intensa, puede dominar fácilmente la señal, por lo que debe ser filtrada ópticamente. Los espectrómetros Raman utilizan filtros Rayleigh específicos de la longitud de onda del láser empleado. Otro aspecto a tener en cuenta es la abertura de muestreo del sistema, ya que este determina la cantidad de luz, y por lo tanto la dispersión Raman que pasa a través del espectrómetro, una abertura más grande permite más luz a través del sistema y aumenta la sensibilidad.

- **Adquisición espectral:** El modo de adquisición puede ser puntual o por mapeo, un enfoque puntual permite al usuario seleccionar áreas específicas de la muestra para estudiar con el punto láser. Por el contrario, un enfoque de mapeo de imágenes derivará espectros de una manera escalonada a través de un área de muestra más grande, permitiendo así la generación de imágenes. En cuanto a los parámetros de adquisición se debe encontrar un equilibrio entre el tiempo de adquisición, potencia del láser, promedio de medidas y la calidad espectral, ya que los períodos de muestreo muy largos pueden degradar la muestra.
- **Procesamiento y análisis de datos:** Los estudios espectroscópicos pueden generar grandes conjuntos de datos que requieren procesamiento computacional para obtener información bioquímica. Dependiendo de la adquisición espectral y de los objetivos experimentales, es posible extraer imágenes informativas, biomarcadores espectrales y patrones, y también clasificar muestras. El procesamiento de datos se puede dividir en tres etapas: (i) preprocesamiento del conjunto de datos, (ii)

extracción de características y (iii) clasificación⁵⁷. Para el preprocesamiento de los datos usualmente se lleva a cabo la corrección de línea base para disminuir la interferencia de fluorescencia, la normalización de los datos, y la aplicación de una técnica (por ejemplo, PCA) que permita reducir el ruido en el conjunto de datos.

Los métodos de extracción de características van desde lo más simple, como definir un área de banda, hasta emplear funciones computacionales. La extracción de características puede dividirse en dos enfoques: construcción de características y selección de características⁵⁸. La construcción de características se puede definir como la creación de nuevas características en un conjunto de datos (usando métodos lineales como PCA o PLS) que permiten la extracción de biomarcadores y reconocimiento de patrones en los datos. Los enfoques de selección de características extrapolan características existentes del conjunto de datos, como números de onda específicos, que se pueden usar para determinar biomarcadores espectrales⁵⁹.

En la clasificación de las muestras los espectros se pueden categorizar en función del aporte previo del usuario (clasificación supervisada) o la varianza espectral sola (sin supervisión). PCA es un enfoque no supervisado que se usa comúnmente para extraer variables clave que describen la mayor varianza dentro de un conjunto de datos⁶⁰. La clasificación supervisada es la más utilizada, ya que las salidas deseadas dependen de las etiquetas de clase proporcionadas por el usuario⁶¹.

En cuanto al análisis de datos, existen dos opciones: (i) análisis exploratorio, para la búsqueda de patrones y la extracción de biomarcadores, y (ii) el análisis de diagnóstico, para la clasificación espectral. Se elige el enfoque apropiado que

⁵⁷BAKER, Matthew J y col. «Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials». En: *Nature protocols* 9.8 (2014), pág. 1771.

⁵⁸TREVISAN, Júlio y col. «Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives». En: *Analyst* 137.14 (2012), págs. 3202-3215.

⁵⁹TREVISAN, Júlio y col. «Measuring similarity and improving stability in biomarker identification methods applied to Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy». En: *Journal of biophotonics* 7.3-4 (2014), págs. 254-265.

⁶⁰LASCH, Peter y col. «Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1688.2 (2004), págs. 176-186.

⁶¹ELLIS, David I y GOODACRE, Royston. «Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy». En: *Analyst* 131.8 (2006), págs. 875-885.

extraiga la información requerida de los espectros según el objetivo de análisis deseado.

1.5. NUESTRA INVESTIGACIÓN

Dadas las altas tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama tanto a nivel mundial como en nuestro país, es de suma importancia aportar al conocimiento de esta enfermedad, planteando y desarrollando métodos y técnicas que permitan la prevención, detección temprana y tratamiento de este tipo de cáncer con el fin de reducir dichas cifras. Por ello se desarrolla esta investigación la cual hace parte de un conjunto de trabajos realizados por el grupo de investigación CIMBIOS (Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores) de la Universidad Industrial de Santander, en los cuales se estudian las propiedades biofísico-químicas del cáncer.

El grupo de investigación CIMBIOS ha empleado técnicas ópticas como la espectroscopia en el infrarrojo cercano para detección temprana del cáncer de mama, los trabajos desarrollados consisten en el diseño e implementación de un phantom de mama con el fin de estudiar la interacción de la luz con el tejido biológico y detectar anomalías analizando la radiación que ha atravesado el medio⁶², el otro trabajo realizado consiste en la implementación de un montaje para caracterizar oxihemoglobina tomando como hipótesis que la angiogénesis es un factor predictor de enfermedades neoplásicas⁶³.

Como se ha mencionado anteriormente la espectroscopia Raman en el estudio de cancer de mama, ha mostrado grandes resultados en cuanto a la diferenciación de tejido sano y cancerígeno ya que evidencia cambios en la composición del tejido asociados al cáncer, por esta razón existen varios estudios reportados sobre su uso. Sin embargo, actualmente parte de la investigación en detección temprana de cáncer se ha enfocado en el

⁶²D. A. TRIANA, K. L. C. y. «Caracterización óptica, en el infrarrojo cercano, del tejido mamario para la detección temprana del cáncer de mamas». tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2014.

⁶³A. PLATA. «Implementación de un montaje para caracterizar oxihemoglobina basado en espectroscopia de infrarrojo cercano de onda continua (NIR-CW)». tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2008.

estudio del efecto de campo carcinogénico (FCE por sus siglas en inglés), para estudiar dicho efecto según investigaciones reportadas se han empleado técnicas ópticas como la espectroscopia de onda parcial (PWS por sus siglas en inglés) y técnicas eléctricas como la espectroscopia de impedancia eléctrica.

Teniendo en cuenta los resultados favorables reportados de la espectroscopia Raman en el estudio de tejido mamario, la necesidad de profundizar en la comprensión del efecto de campo carcinogénico y la evidencia de que no existen investigaciones que reporten el estudio de este efecto por la técnica espectroscópica en mención, se planteó esta investigación (la cual hace parte de un trabajo de tesis doctoral del grupo CIMBIOS) con el objetivo de observar el efecto de campo carcinogénico en tejido mamario haciendo uso de esta técnica espectroscópica. Para lograr este objetivo primero se llevó a cabo una revisión bibliográfica; luego se consiguieron las muestras para el estudio, las cuales forman parte del banco de muestras del departamento de patología de la Universidad Industrial de Santander; posteriormente se realizó el estudio patológico de las muestras seleccionadas correspondientes a tejido mamario de 2 sujetos; luego se realizó la toma de espectros Raman sobre cada una de las muestras, empleando la metodología construída por el grupo CIMBIOS para estudiar muestras de tejido mamario embebido en parafina montado sobre placas de vidrio, un total de 36 espectros Raman fueron tomados; y finalmente, los espectros obtenidos fueron procesados y analizados.

2. MÉTODOS Y MATERIALES

En este capítulo se describe la metodología que se siguió para la realización de esta investigación con el fin de cumplir el objetivo principal planteado: Observar el efecto de campo carcinogénico en tejido mamario por medio de espectroscopia Raman. Esta metodología hace parte de un trabajo de tesis doctoral más extenso titulado: Estudio del efecto de campo carcinogénico en tejido mamario, en el cual se tomaron todos los espectros raman de los componentes que se usan en el proceso de preparación de las muestras, desde el corte del tejido en el quirófano hasta montarlo sobre la placa de vidrio. En la primera sección se presenta el proceso que se siguió para la preparación de las muestras, en la segunda sección se describe la instrumentación empleada para la toma de los espectros, en la tercera sección se exhibe el proceso realizado para la adquisición de los espectros Raman y en la cuarta sección se indica el procesamiento y análisis de los datos obtenidos.

2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras empleadas en esta investigación fueron suministradas por el departamento de patología de la Universidad Industrial de Santander, bajo la dirección de la doctora Olga Álvarez. Estas muestras formaban parte del banco de muestras de dicho departamento, es decir, que no fue necesario realizar ningún tipo de intervención quirúrgica para adquirirlas con el fin de realizar esta investigación, pues ya se les había realizado el respectivo procedimiento histológico y estaban archivadas. Una vez finalizada la investigación las muestras fueron devueltas al departamento de patología sin presentar ningún daño, ya que la espectroscopia Raman no destruye las muestras. Se estudió un total de 2 muestras de tejido mamario correspondiente a dos sujetos de sexo femenino, la descripción de cada muestra se presenta en la tabla 1. Las muestras corresponden a tejido mamario extraído por intervención quirúrgica, embebido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina de acuerdo con el procedimiento de histología. Las muestras están montadas sobre una placa de vidrio y cubiertas por el mismo material.

Tabla 1: Descripción de las muestras de tejido mamario empleadas en la investigación.

Sujeto	Número de la muestra	Diagnóstico
1	1883-17 B	Adenocarcinoma mucosecretor de glándula mamaria viable en un 90 porciento, moderadamente diferenciado e infiltrante al estroma de sostén, invasión linfovascular presente.
2	4499-17 A2	Carcinoma de glándula mamaria residual viable en un 80 porciento, sin tipo específico, pobremente diferenciado e infiltrante, con invasión linfovascular y extensa necrosis tumoral.

Una vez suministradas las muestras biológicas por el departamento de patología después del respectivo procedimiento histológico, se procedió con el estudio patológico de las mismas bajo el microscopio por parte de la patóloga, se identificó que cada muestra seleccionada contiene zonas cancerígenas y también zonas normales por lo que se delimitaron las zonas sobre las cuales se tomarían las medidas Raman realizando marcas con tinta sobre el vidrio que cubre la muestra, la figura 8 muestra las marcas realizadas por la patóloga sobre cada muestra, la tinta azul encierra las zonas que a la vista del microscopio contienen tejido normal y la tinta roja encierra las zonas que contienen tejido tumoral. Para cada muestra se seleccionaron 6 puntos sobre los cuales se realizarían las medidas Raman, 3 puntos ubicados dentro de la región correspondiente a tejido normal y 3 puntos ubicados dentro de la región correspondiente a tejido tumoral.

Figura 8: Muestras marcadas por la patóloga. La tinta azul encierra las zonas que contienen tejido normal y la tinta roja encierra las zonas que contienen tejido tumoral.



También se adquirieron las muestras de hematoxilina, eosina, xilol, etanol y parafina pues dichos componentes están presentes en el tejido debido al proceso histológico realizado, cada uno de estos componentes fue montado sobre un portamuestras de vidrio y se dejó secar para luego realizar las respectivas medidas Raman. Los espectros Raman de las muestras de xilol, etanol y parafina ya se habían tomado previamente en la investigación doctoral de la cual forma parte este trabajo.

2.2. INSTRUMENTACIÓN

Los espectros de las muestras fueron tomados con un micro-Raman labRAM HR Evolution (Horiba Jobin Yvon). El detector incluido en el sistema Raman fue un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD). Las muestras fueron excitadas con un láser de 785nm enfocado sobre la muestra con un objetivo de 100x y potencia sobre la superficie de la muestra de 12,6 mw, el tiempo de adquisición fue de 45 s. con 20 acumulaciones para cada espectro. Todos los espectros fueron adquiridos en un rango de longitud de onda de 600 a 1800 cm^{-1} .

2.3. ADQUISICIÓN ESPECTRAL

Para realizar el mapeo espectral sobre las muestras en estudio se establecieron las condiciones experimentales del equipo Raman y se procedió con la adquisición de los espectros, el proceso que se siguió fue el siguiente:

- Se calibró y se alineó el espectrómetro
- Se estableció la longitud de onda del láser, la potencia del láser, el tiempo de exposición, el número de acumulaciones y el rango de longitud de onda de los espectros.
- La muestra a estudiar se colocó sobre el portador del objeto en el microscopio.
- Se escogió el objetivo indicado para la adquisición del espectro Raman.
- Se eligió el punto a medir sobre el tejido de acuerdo con las marcas realizadas por la patóloga, para cada punto se tomaron 3 espectros.
- Se realizó la adquisición del espectro Raman sobre el punto elegido.
- Los datos obtenidos se guardaron en un archivo txt.
- Los pasos anteriores se repitieron para cada uno de los puntos escogidos de cada muestra, en total se tomaron 36 espectros Raman, 18 espectros por cada muestra ya que se tomaron 3 espectros por cada punto seleccionado.
- Obtenidos los espectros Raman del tejido para cada punto seleccionado, se realizó la toma de espectros sobre la hematoxilina, eosina y vidrio con las mismas condiciones experimentales empleadas en las medidas sobre el tejido.
- Los datos obtenidos para cada uno de los componentes mencionados en el ítem anterior se guardaron en un archivo txt.

2.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Los espectros Raman obtenidos fueron procesados utilizando un algoritmo escrito en lenguaje Python, diseñado en la investigación doctoral (Estudio del efecto de campo carcinogénico), el proceso que se siguió fue el siguiente:

- Se realizó la corrección de línea base a cada conjunto de datos (tejido, hematoxilina, eosina y vidrio), los espectros del xilol, etanol y parafina tomados previamente también fueron procesados de la misma forma.
- Se realizó una normalización a cada conjunto de datos
- Se procedió a estudiar el conjunto de datos correspondiente al tejido y los datos correspondientes a la hematoxilina, eosina, xilol, etanol, parafina y vidrio se guardaron para luego comparar.
- Se extrajeron los picos relevantes observados en el espectro del tejido y se compararon con los picos encontrados en la literatura.
- Se identificaron los posibles biomarcadores correspondientes a los picos observados en cada una de las muestras estudiadas.
- Con los biomarcadores identificados se procedió a determinar que picos pertenecían a tejido normal y cuales a tejido anormal de acuerdo con investigaciones reportadas en la literatura.
- Con los picos Raman totalmente identificados se efectuó el análisis y vinculación de los resultados con el efecto de campo carcinogénico.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se estudian los espectros Raman obtenidos para cada una de las muestras empleadas en la investigación y se analizan los resultados correspondientes. En la primera sección se muestran los espectros raman obtenidos, en la segunda sección se describe la corrección de línea base realizada a los espectros, en la tercera sección se presenta el proceso de normalización que se llevo a cabo sobre los espectros Raman, en la cuarta sección se exhibe el proceso de identificación de picos Raman y en la quinta sección se muestra el análisis de los resultados y su vinculación con el efecto de campo carcinogénico.

3.1. ESPECTROS RAMAN OBTENIDOS

Las figuras 9 y 10 muestran los espectros Raman obtenidos en el laboratorio para las 6 zonas patológicas seleccionadas en cada muestra, el espectro que se exhibe por cada zona patológica es el espectro promedio, resultado de las 3 mediciones realizadas sobre la zona que indica la flecha (se promediaron las 3 mediciones con el fin de reducir el ruido de los datos). Tanto para la muestra 1883-17 B como para la muestra 4499-17 A2 las gráficas enumeradas de A a C exhiben los espectros correspondientes a zonas que según los estudios patológicos están catalogadas como tejido normal y las gráficas enumeradas de D a F exhiben los espectros correspondientes a zonas catalogadas como tejido tumoral.

Figura 9: Espectros Raman obtenidos para la muestra 1883-17 B. A, Zona 1 de tejido normal. B, zona 2 de tejido normal. C, zona 3 de tejido normal. D, zona 1 de tejido tumoral. E, zona 2 de tejido tumoral. F, zona 3 de tejido tumoral.

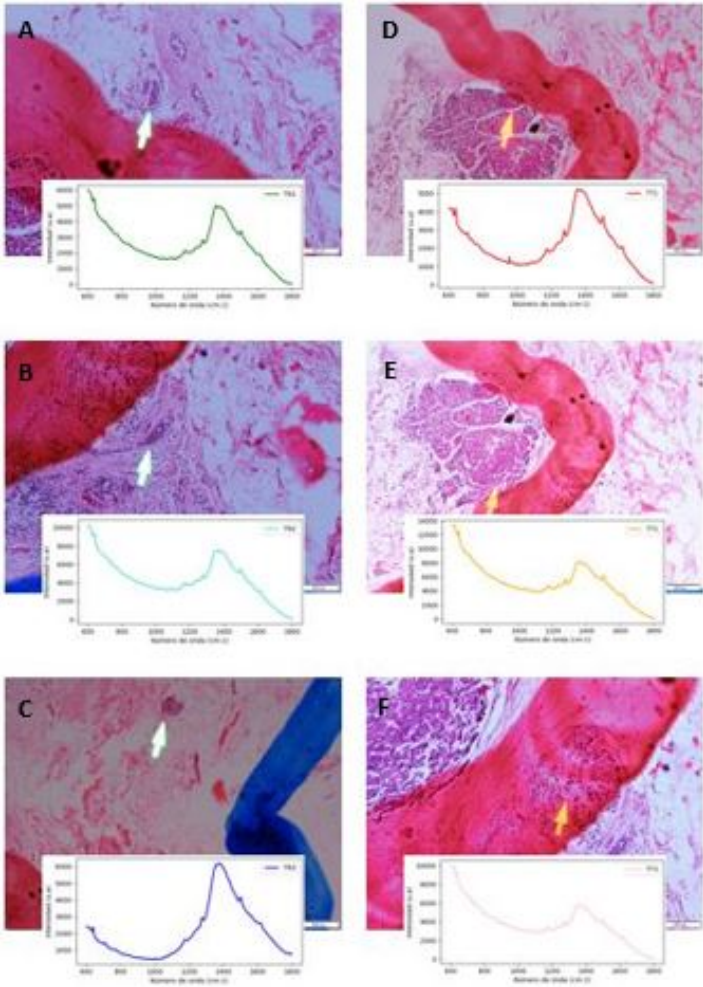
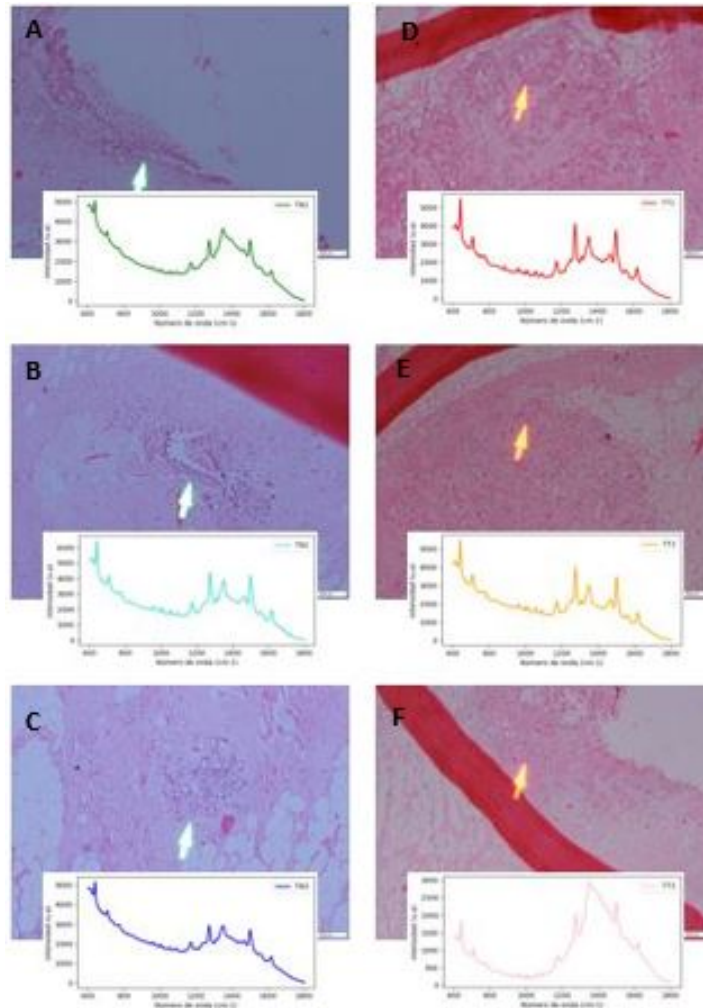


Figura 10: Espectros Raman obtenidos para la muestra 4499-17 A2. A, Zona 1 de tejido normal. B, zona 2 de tejido normal. C, zona 3 de tejido normal. D, zona 1 de tejido tumoral. E, zona 2 de tejido tumoral. F, zona 3 de tejido tumoral.



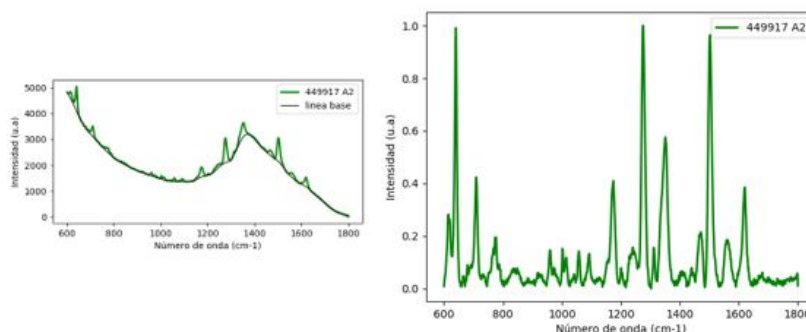
3.2. CORRECCIÓN DE LÍNEA BASE

El Espectro Raman contiene señal útil que comprende la información deseada (Bandas Raman), y también contiene señal correspondiente a ruido, considerada como todo aquello que no corresponde a la dispersión Raman. Para realizar el análisis de un Espectro Raman es conveniente aislar la señal Raman del ruido. El ruido en un Espectro

Raman puede clasificarse en cinco grupos diferentes: Ruido shot, ruido generado por la muestra, ruido generado por el instrumento, ruido computacional y ruido generado por fuentes externas¹. Los tipos de ruido más comunes en un espectro Raman son: el ruido shot, que resulta de la naturaleza aleatoria de la luz y se produce en el receptor debido a la conversión óptico-eléctrica; y la fluorescencia, la cual es una emisión óptica no deseada en espectroscopía Raman, independiente de la frecuencia de radiación y que se produce si hay absorción del fotón incidente por parte del material.

Los espectros obtenidos en el laboratorio para cada una de las muestras en investigación poseen ruido debido a la fluorescencia, para aislar este tipo de ruido se realizó una corrección de línea base a los espectros Raman. El algoritmo de programación de estimación de línea base se hizo basado en el método de suavizado asimétrico de mínimos cuadrados (AsLS por sus siglas en inglés), ya que este es un método rápido incluso para señales grandes, y en el que la flexibilidad y posición de la línea base pueden ajustarse fácilmente². A continuación, en la figura 11 se muestra la corrección de línea base para uno de los espectros obtenidos, este espectro corresponde a la zona normal 1 de la muestra 449917 A2.

Figura 11: Espectro Raman correspondiente a la zona normal 1 de la muestra 449917 A2. Izquierda: Espectro sin corrección de línea base. Derecha: Espectro después de aplicar la corrección de línea base.



¹PELLETIER, MJ. «Quantitative analysis using Raman spectrometry». En: *Applied spectroscopy* 57.1 (2003), 20A-42A.

²EILERS, Paul HC y BOELEN, Hans FM. «Baseline correction with asymmetric least squares smoothing». En: *Leiden University Medical Centre Report 1.1* (2005), pág. 5.

El proceso de corrección de línea base se realizó para cada uno de los espectros Raman obtenidos de las 6 zonas patológicas de cada muestra estudiada, es decir, para cada uno de los espectros mostrados en las figuras 9 y 10.

3.3. NORMALIZACIÓN

Después de hacer la corrección de línea base a cada uno de los espectros se debe independizar la intensidad de las bandas raman de las condiciones de medida, de manera que los espectros compartan el mismo rango de intensidades, para ello se realizó una normalización vectorial. El tipo de normalización más usado en espectroscopia raman es la normalización a vector unidad, ya que una de las principales fuentes de variabilidad en este tipo de espectroscopia es la intensidad del láser³. Mediante este pretratamiento se favorece la reducción en la variabilidad de la intensidad de la fuente de excitación.

En la figura 12 se muestran los espectros Raman obtenidos de la muestra 188317 B para cada una de las 6 zonas estudiadas después de realizar la corrección de línea base y la apropiada normalización y en la figura 13 se muestran los espectros Raman obtenidos de la muestra 449917 A2 después de la correspondiente corrección de línea base y normalización para cada una de las 6 zonas estudiadas.

³ARRUABARRENA, Julen; MASPOCH, Andrés; COELLO, Jordi y col. «Espectroscopia NIR y RAMAN para el control de calidad en industria farmacéutica». En: (2014).

Figura 12: Espectros Raman de la muestra 188317 B. Verde, zona 1 de tejido normal. Turquesa, zona 2 de tejido normal. Azul, zona 3 de tejido normal. Rojo, zona 1 de tejido tumoral. Naranja, zona 2 de tejido tumoral. Rosa, zona 3 de tejido tumoral.

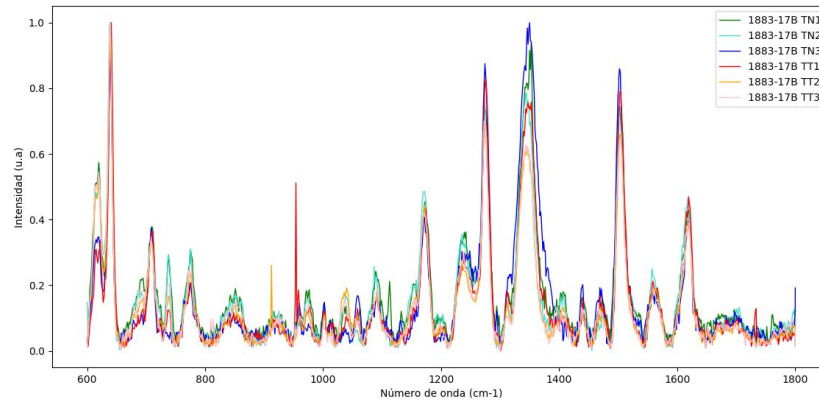
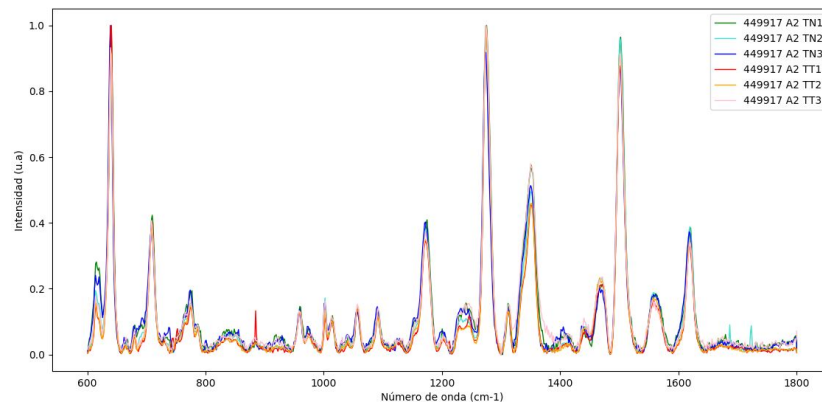


Figura 13: Espectros Raman de la muestra 449917 A2. Verde, zona 1 de tejido normal. Turquesa, zona 2 de tejido normal. Azul, zona 3 de tejido normal. Rojo, zona 1 de tejido tumoral. Naranja, zona 2 de tejido tumoral. Rosa, zona 3 de tejido tumoral.



3.4. IDENTIFICACIÓN DE PICOS RAMAN

Luego de realizar el pretratamiento de los espectros Raman correspondientes a cada muestra, se procedió a identificar las bandas espectrales sobresalientes en cada muestra por separado, la tabla 2 presenta la posición de los picos Raman para cada una de las 6 zonas patológicas estudiadas en la muestra 188317 B y la asignación de cada pico de

acuerdo con distintas referencias encontradas en la literatura⁴⁵⁶⁷. Donde TN1 denota zona 1 de tejido normal, TN2 equivale a zona 2 de tejido normal, TN3 corresponde a zona 3 de tejido normal, TT1 indica zona 1 de tejido tumoral, TT2 denota zona 1 de tejido tumoral, TT3 equivale a zona 3 de tejido tumoral. La tabla 3 presenta la posición de los picos Raman para cada una de las 6 zonas patológicas estudiadas en la muestra 449917 A2 y la asignación de cada pico de acuerdo con distintas referencias encontradas en la literatura.

Las filas sombreadas en las tablas pertenecen a los picos Raman que están asociados a los distintos componentes empleados en el proceso histológico, que se realiza para poder observar el tejido con los microscopios óptico o electrónico y de esta forma poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos.

⁴MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza y REHMAN, Ihtesham U. «Raman spectroscopy of biological tissues». En: *Applied Spectroscopy Reviews* 42.5 (2007), págs. 493-541.

⁵STONE, Nicholas y col. «Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers». En: *Faraday discussions* 126 (2004), págs. 141-157.

⁶ANDRONIA, Luisa y col. «Raman Spectroscopy of the Hematoxylin-Eosin Stained Tissue». En: *ProEnvironment Promediu* 8.24 (2015).

⁷NARAYANAN, V Anantha; STOKES, David L y VO-DINH, Tuan. «Vibrational spectral analysis of Eosin Y and Erythrosin B—intensity studies for quantitative detection of the dyes». En: *Journal of Raman spectroscopy* 25.6 (1994), págs. 415-422.

Tabla 2: Asignación de bandas Raman de la muestra 188317 B.

Posición de picos / cm^{-1}							Asignación
Pico	TN1	TN2	TN3	TT1	TT2	TT3	
1	614	614	613	614	614	614	614 Eosina
2	639	639	639	639	639	639	639 Eosina
3	709	709	708	709	707	709	709 Eosina
4	737	737	-	736	735	738	736 Eosina
5	773	773	773	773	773	773	773 Hematoxilina
6	850	848	847	848	850	851	847 Hematoxilina, 850 aminoácidos/valina/polisacáridos
7	922	920	922	921	921	922	920 Prolina/glucosa/ácido láctico
8	959	958	959	957	957	959	956 Carotenoides, 960 Eosina
9	975	973	974	975	973	974	972 colágeno, 974 vibración de ribosa
10	1003	1002	1002	1001	1001	1002	1002 Fenilalanina
11	1038	1037	1035	1038	1037	1035	1035 Colágeno
12	1061	1056	1058	1056	1057	1057	1057 Lípidos, 1061 xilol
13	1088	1087	1088	1088	1087	1088	1090 Etanol
14	1172	1170	1172	1172	1172	1172	1172 Tirosina
15	1202	1198	1201	1202	1201	1199	1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, 1202 xilol
16	1238	1235	1239	1239	1235	1238	1235-39 Amida III
17	1274	1274	1274	1275	1274	1274	1275 Amida III
18	1344	1343	1345	1345	1344	1343	1345 Colágeno
19	1405	1404	-	-	1405	1404	1406 inmunoglobulina G
20	1441	1440	1438	1439	1439	1439	1440 Parafina, 1441 Lípidos
21	1472	1473	1471	1472	1472	1470	1472 Parafina
22	1501	1502	1502	1503	1503	1502	1501 Eosina
23	1560	1559	1558	1558	1560	1561	1560 Triptófano
24	1617	1616	1618	1618	1617	1617	1616 Tirosina y triptófano, 1617 Eosina, 1618 triptófano

Tabla 3: Asignación de bandas Raman de la muestra 449917 A2.

Posición de picos / cm^{-1}							Asignación
Pico	TN1	TN2	TN3	TT1	TT2	TT3	
1	614	614	614	614	614	614	614 Eosina
2	639	639	638	640	640	640	639 Eosina, 640 Tirosina
3	708	708	707	708	708	708	709 Eosina
4	772	772	772	773	772	772	773 Hematoxilina
5	839	839	843	840	840	843	840-60 Estructura polisacárido
6	959	959	959	959	959	958	957 Hidroxiapatita, 960 Eosina
7	975	974	973	974	974	975	974 Vibración de ribosa
8	1002	1003	1001	1002	1002	1003	1002 Fenilalanina
9	1014	1013	1013	1013	1014	1013	1013 Eosina
10	1056	1056	1054	1056	1056	1057	1057 Lípidos
11	1090	1090	1089	1091	1091	1091	1090 Etanol
12	1123	1123	1126	1126	1123	1127	1123 Lípidos, 1126 Parafina
13	1173	1172	1172	1173	1173	1172	1172 Tirosina, 1173 citosina/ guanina
14	1202	1202	1200	1203	1202	1202	1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, 1202 xilol
15	1240	1237	1236	1237	1237	1239	1235-39 Amida III, 1240 Colágeno
16	1276	1276	1274	1275	1274	1275	1275 Amida III
17	1312	1313	1313	1313	1313	1315	1314 Colágeno
18	1347	1347	1346	1347	1347	1347	1345 Colágeno
19	1407	1408	1406	1409	1409	1409	1406-1409 Inmunoglobulina G
20	1440	1441	1440	1441	1441	1441	1440 Colesterol, 1441 Lípidos, 1440 parafina
21	1469	1468	1469	1469	1468	1469	1465 Lípidos
22	1501	1501	1501	1501	1501	1501	1501 Eosina
23	1559	1558	1559	1559	1559	1558	1560 Triptófano
24	1618	1619	1618	1619	1619	1619	1618 Triptófano, 617 Eosina

3.5. ANÁLISIS DE PICOS RAMAN Y VINCULACIÓN CON EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENÉTICO

En las tablas 2 y 3 se mostraron los picos Raman observados para las muestras 188317 B y 449917 A2 y la asignación correspondiente de acuerdo con distintas referencias en la literatura. Las filas sombreadas en las tablas pertenecen a los picos Raman que están asociados a los distintos componentes empleados en el proceso histológico, que se realiza para poder observar el tejido con los microscopios óptico o electrónico y estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos⁸. Dichos componentes que se perciben en los espectros Raman obtenidos son:

- **Parafina:** La parafina es una mezcla de hidrocarburos que cuando se solidifica tiene aspecto de cera de vela, en histología es el medio de inclusión más usado para obtener secciones finas de tejido.
- **Etanol:** Es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro e inflamable, en un proceso histológico se emplea para rehidratar la muestra antes del proceso de tinción y deshidratarla después del proceso de tinción.
- **Eosina:** Utilizada en el proceso de tinción del tejido, es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva. Tiñe en tonos de color rosa componentes y orgánulos citoplasmáticos, colágeno, y fibras musculares, pero no los núcleos. Aquellos componentes que se tiñen con eosina son conocidos como acidófilos o eosinófilos.
- **Hematoxilina:** También se utiliza en el proceso de tinción del tejido, es un compuesto que tiñe los componentes aniónicos (ácidos) de los tejidos, a los que da una coloración violeta. Tiñe intensamente los núcleos de las células, dado que estos contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos.

⁸ATLAS-DE-HISTOLOGÍA-VEGETAL-Y-ANIMAL. *Proceso histológico. (en línea)*. España. 2018. (Recuperado en 3 mayo 2018). Disponible en <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-proceso.php>.

- **Xilol:** Es un derivado dimetilado del benceno, que se emplea en histología en los pasos iniciales como solvente de la parafina en los cortes (desparafinización) y en los últimos pasos de preparado de muestras (tinción y montaje) como líquido intermediario o aclarante, también permite el uso de medios de montaje hidrófobos (resinas sintéticas) para la preservación de la muestra teñida.

A continuación, en la tabla 4 se presentan los picos Raman de la muestra 188317 B, que según las referencias encontradas en la literatura no están asociados con componentes empleados en el proceso de histología, sino que corresponden a picos o bandas de compuestos moleculares que componen el tejido.

Tabla 4: Bandas Raman de la muestra 188317 B asociados a compuestos moleculares del tejido.

Posición de picos / cm^{-1}							Asignación
Pico	TN1	TN2	TN3	TT1	TT2	TT3	
7	922	920	922	921	921	922	920 Prolina/glucosa/ácido láctico
9	975	973	974	975	973	974	972 colágeno, 974 vibración de ribosa
10	1003	1002	1002	1001	1001	1002	1002 Fenilalanina
11	1038	1037	1035	1038	1037	1035	1035 Colágeno
14	1172	1170	1172	1172	1172	1172	1172 Tirosina
16	1238	1235	1239	1239	1235	1238	1235-39 Amida III
17	1274	1274	1274	1275	1274	1274	1275 Amida III
18	1344	1343	1345	1345	1344	1343	1345 Colágeno
19	1405	1404	-	-	1405	1404	1406 Inmunoglobulina G
23	1560	1559	1558	1558	1560	1561	1560 Triptófano

Como se aprecia en la tabla 4, las bandas Raman mostradas aparecen casi en la misma posición para el tejido normal y el tumoral, el corrimiento de las bandas es apenas de 2 a 3 cm^{-1} entre las distintas zonas donde se tomó el espectro, estas pequeñas diferencias

se pueden atribuir a la calibración del equipo Raman⁹.

La mayoría de las bandas Raman que se presentan en la tabla 4 de acuerdo con distintas investigaciones encontradas en la literatura, en las cuales estudiaron tejido mamario utilizando espectroscopia Raman corresponden a bandas observadas únicamente en tejido identificado con algún tipo de lesión cancerígena, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la presencia de dichas bandas también en las zonas catalogadas como tejido normal según los estudios histopatológicos.

Las bandas que cumplen las características antes mencionadas están ubicadas en: 920 cm^{-1} banda asociada con el estiramiento del enlace C-C del anillo de prolina, glucosa y ácido láctico, esta banda según Christopher Frank y colaboradores está presente en tejido mamario con lesión identificada como carcinoma ductal infiltrante¹⁰; la banda en 975 cm^{-1} asignada a colágeno y vibración de ribosa, Liu y colaboradores en su investigación encontraron que esta banda aparece en tejido correspondiente a carcinoma ductal infiltrante¹¹; la banda en 1002 cm^{-1} asignada a fenilalanina, Rachel Kast y colaboradores encontraron en su investigación que esta banda está presente únicamente en tejido catalogado como cancerígeno¹²; la banda en 1172 cm^{-1} asignada a Tirosina, solo está presente en tejido identificado como carcinoma infiltrante según lo reportado por Haka y colaboradores en su investigación¹³; la banda en 1275 cm^{-1} asignada a la amida III, se presenta en tejido con carcinoma ductal infiltrante como lo reportan Bitar y colaboradores en su investigación¹⁴; la banda en 1345 cm^{-1} asignada a colágeno, se evidencia en tejido cancerígeno según la investigación realizada por Hu y colaborado-

⁹HU, Chengxu y col. «Raman spectra exploring breast tissues: Comparison of principal component analysis and support vector machine-recursive feature elimination». En: *Medical physics* 40.6Part1 (2013).

¹⁰FRANK, Christopher J; MCCREERY, Richard L y REDD, Douglas CB. «Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues». En: *Analytical chemistry* 67.5 (1995), págs. 777-783.

¹¹LIU, C-H y col. «Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection». En: *Technology in cancer research & treatment* 12.4 (2013), págs. 371-382.

¹²KAST, Rachel E y col. «Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model». En: *Biopolymers* 89.3 (2008), págs. 235-241.

¹³HAKA y col., «Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis», óp.cit., pág. 46.

¹⁴BITAR, Renata Andrade y col. «Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy». En: *Journal of biomedical optics* 11.5 (2006), pág. 5401.

res¹⁵; la banda en 1560 cm^{-1} asignada a triptófano, abramczyk y colaboradores en su investigación reportan que esta banda está presente en tejido cancerígeno¹⁶.

Las bandas Raman ubicadas en 1035 cm^{-1} asignada a colágeno, 1235 cm^{-1} correspondiente a amida III y 1406 cm^{-1} asignada a inmunoglobulina G, no se encuentran reportadas en la literatura como bandas presentes exclusivamente en tejido cancerígeno. Sin embargo, para el caso del colágeno en investigaciones sobre cáncer afirman que esta molécula proteica que forma parte de la matriz extracelular (red que mantiene unidas las células, tejidos y órganos) antes se consideraba como una barrera de resistencia pasiva a las células tumorales, pero ahora se ha evidenciado que también participa activamente en la promoción de la progresión tumoral¹⁷.

En la tabla 5 se presentan los picos Raman de la muestra 449917 A2, que según las referencias encontradas en la literatura no están asociados con componentes empleados en el proceso de histología, sino que corresponden a picos de compuestos moleculares que componen el tejido.

¹⁵HU y col., «Raman spectra exploring breast tissues: Comparison of principal component analysis and support vector machine-recursive feature elimination», *óp.cit.*, pág. 407.

¹⁶ABRAMCZYK y col., «The label-free Raman imaging of human breast cancer», *óp.cit.*, pág. 128.

¹⁷FANG, Min y col. «Collagen as a double-edged sword in tumor progression». En: *Tumor Biology* 35.4 (2014), págs. 2871-2882.

Tabla 5: Bandas Raman de la muestra 449917 A2 asociados a compuestos moleculares del tejido.

Posición de picos / cm^{-1}							
Pico	TN1	TN2	TN3	TT1	TT2	TT3	Asignación
5	839	839	843	840	840	843	840-60 Estructura polisacárido
7	975	974	973	974	974	975	974 Vibración de ribosa
8	1002	1003	1001	1002	1002	1003	1002 Fenilalanina
10	1056	1056	1054	1056	1056	1057	1057 Lípidos
13	1173	1172	1172	1173	1173	1172	1172 Tirosina, 1173 citosina/ guanina
15	1240	1237	1236	1237	1237	1239	1235-39 Amida III, 1240 Colágeno
16	1276	1276	1274	1275	1274	1275	1275 Amida III
17	1312	1313	1315	1313	1313	1315	1314 Colágeno
18	1347	1347	1346	1347	1347	1347	1345 Colágeno
19	1407	1408	1406	1409	1409	1409	1406-1409 Inmunoglobulina G
23	1559	1558	1559	1559	1559	1558	1560 Triptófano

Las bandas Raman que se mencionan a continuación se presentan tanto en el tejido normal como en el tejido cancerígeno según los resultados obtenidos en el presente trabajo, no obstante, dichas bandas de acuerdo con investigaciones reportadas en la literatura, corresponden a bandas observadas únicamente en tejido identificado con algún tipo de lesión cancerígena.

La banda Raman ubicada alrededor de los 975 cm^{-1} asociada a vibración de ribosa, en su investigación Shafer-Peltier y colaboradores encontraron que esta banda aparece en tejido cancerígeno¹⁸; las bandas Raman ubicadas en 1002 cm^{-1} asignada a fenilalanina, 1172 cm^{-1} asignada a Tirosina y 1275 cm^{-1} asignada a la amida III, corresponden a bandas presentes únicamente en tejido identificado como cancerígeno, según las in-

¹⁸SHAFER-PELTIER y col., «Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo», óp.cit., pág. 558.

investigaciones realizadas por Rachel Kast y colaboradores¹⁹, Haka y colaboradores²⁰, y Bitar y colaboradores²¹ respectivamente. La banda Raman ubicada alrededor de los 1314 cm^{-1} está asociada al modo de torsión CH_3/CH_2 del colágeno, según abramczyk y colaboradores dicha banda solo está presente en tejido cancerígeno²². Las bandas Raman ubicadas alrededor de los 1345 cm^{-1} asignada a colágeno y 1560 cm^{-1} asignada a triptófano, corresponden a bandas presentes únicamente en tejido cancerígeno según lo reportado por Hu y colaboradores y abramczyk y colaboradores en sus investigaciones²³.

Las bandas Raman ubicadas alrededor de los 840 cm^{-1} asignada a estructura de polisacárido, 1057 cm^{-1} asignada a lípidos, 1235 cm^{-1} correspondiente a amida III y 1406 cm^{-1} asignada a inmunoglobulina G, no se encuentran reportadas en la literatura como bandas presentes exclusivamente en tejido cancerígeno.

En la tabla 6 se muestran las bandas Raman correspondientes a tejido mamario normal, según las investigaciones reportadas por los autores anteriormente mencionados, estas bandas no aparecen en el tejido identificado como normal que se estudió en esta investigación.

¹⁹KAST y col., «Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model», óp.cit., pág. 239.

²⁰HAKA y col., «Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis», óp.cit., pág. 48.

²¹BITAR y col., «Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy», óp.cit., pág. 5402.

²²ABRAMCZYK, Halina y col. «Raman 'optical biopsy' of human breast cancer». En: *Progress in biophysics and molecular biology* 108.1-2 (2012), págs. 74-81, pág. 129.

²³HU y col., «Raman spectra exploring breast tissues: Comparison of principal component analysis and support vector machine-recursive feature elimination», óp.cit., pág. 408.

Tabla 6: Bandas Raman de tejido mamario normal.

Posición de bandas / cm^{-1}	Asignación
750	Ácido láctico
870	Prolina
968	Lípidos
1080	Fosfolípidos
1158	Proteínas
1266	Amida III
1304	Adenina, citosina
1440	Lípidos
1518	Porfirina
1660	Amida I
1750	Lípidos

4. CONCLUSIONES

En esta investigación se tomaron espectros Raman de muestras de tejido mamario de dos sujetos diferentes, las muestras fueron analizadas inicialmente por patología, donde se concluyó que ambas muestras presentaban zonas normales y también zonas tumorales identificadas como carcinoma de glándula mamaria sin tipo específico.

Estas muestras biológicas fueron analizadas por espectroscopia Raman, este análisis no fue sencillo, primero porque este tipo de dispersión tiene una probabilidad de ocurrencia muy baja y segundo, debido a que los métodos histológicos tradicionales para la preparación de la muestra requieren de reactivos que tienen su propia huella Raman, y a la hora de tomar los espectros pueden solapar la señal del tejido, también el sustrato sobre el cual está la muestra, que en este caso fue el vidrio puede opacar la señal Raman. Sin embargo, después de realizar el preprocesamiento de los espectros Raman obtenidos se evidenciaron algunas bandas que son señales propias del tejido mamario, estas bandas fueron comparadas con varias referencias reportadas en la literatura en las cuales dichas bandas únicamente estaban presentes en tejido cancerígeno, no obstante, en esta investigación estas bandas también están presentes en el tejido que según el estudio patológico es normal.

La observación de estas bandas en tejido aparentemente normal indica que en realidad ya han ocurrido cambios a nivel celular en la composición bioquímica del tejido de las zonas normales, es decir, estas zonas muestran las mismas alteraciones bioquímicas que el tejido anómalo, hay una conexión entre las zonas normales y cancerígenas a pesar de la distancia que las separa, lo cual evidencia la existencia de un efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario. Las bandas Raman obtenidas de las señales espectrales indican la presencia de ribosa, fenilalanina, tirosina, citosina, guanina, amida III, colágeno y triptófano, los cuales son compuestos constituyentes de proteínas, azúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos. También se indica la presencia de inmunoglobulina G la cual es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus.

Esta investigación sugiere que se pueden observar alteraciones asociadas al efecto de campo carcinogénico en la composición del tejido identificado como normal al mapear el tejido utilizando espectroscopia Raman, el estudio de los cambios a nivel microscó-

pico que ocurren en el tejido durante su transformación de normal a tumoral permite profundizar y aportar al conocimiento del cáncer de mama, enfermedad que presenta altas tasas de incidencia y mortalidad en la población mundial.

BIBLIOGRAFÍA

A, PLATA. «Implementación de un montaje para caracterizar oxihemoglobina basado en espectroscopia de infrarrojo cercano de onda continua (NIR-CW)». tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2008.

ABRAMCZYK, Halina; BROZEK-PLUSKA, Beata; SURMACKI, Jakub; JABLONSKA, Joanna y KORDEK, Radzislaw. «The label-free Raman imaging of human breast cancer». En: *Journal of Molecular Liquids* 164.1-2 (2011), págs. 123-131.

ABRAMCZYK, Halina; BROZEK-PLUSKA, Beata; SURMACKI, Jakub; JABLONSKA-GAJEWICZ, Joanna y KORDEK, Radzislaw. «Raman ‘optical biopsy’ of human breast cancer». En: *Progress in biophysics and molecular biology* 108.1-2 (2012), págs. 74-81.

ALATORRE, Alfredo. *¿ Qué es el cáncer?* Random House España, 2004, pág. 15. ISBN: 9789706437754.

AMERICAN-CANCER-SOCIETY. *Estudios por imágenes de seno recientes y experimentales. (en línea)*. EE.UU. 2018. (Recuperado en 20 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/estudios-experimentales-por-imagenes-para-los-senos.html>.

— *Tipos de cáncer de seno. (en línea)*. EE.UU. 2018. (Recuperado en 19 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/comprension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>.

ANDRADE, PO; BITAR, RA; YASSOYAMA, K; MARTINHO, H; SANTO, AME; BRUNO, PM y MARTIN, AA. «Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 387.5 (2007), págs. 1643-1648.

ANDRONIA, Luisa y col. «Raman Spectroscopy of the Hematoxylin-Eosin Stained Tissue». En: *ProEnvironment Promediu* 8.24 (2015).

ARRUABARRENA, Julen; MASPOCH, Andrés; COELLO, Jordi y col. «Espectroscopia NIR y RAMAN para el control de calidad en industria farmacéutica». En: (2014).

ASCOCANCER.NET. *Cáncer de mama: Diagnóstico. (en línea)*. EE.UU. 2016. (Recuperado en 19 enero 2018). Disponible en <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/diagnostico>.

ASKREN, Carl C; YU, Nai-Teng y KUCK JR, John FR. «Variation of the concentration of sulfhydryl along the visual axis of aging lenses by laser Raman optical dissection technique». En: *Experimental eye research* 29.6 (1979), págs. 647-654.

ATLAS-DE-HISTOLOGÍA-VEGETAL-Y-ANIMAL. *Proceso histológico. (en línea)*. España. 2018. (Recuperado en 3 mayo 2018). Disponible en <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-proceso.php>.

BACKMAN, Vadim y ROY, Hemant K. «Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification». En: *Journal of Cancer* 4.3 (2013), pág. 251.

BAKER, Matthew J y col. «Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials». En: *Nature protocols* 9.8 (2014), pág. 1771.

BITAR, Renata Andrade; SILVA MARTINHO, Herculano da; TIERRA-CRIOLLO, Carlos Julio; RAMALHO, Leandra Náira Zambelli; NETTO, Mario Mourão y MARTIN, Airton Abrahão. «Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy». En: *Journal of biomedical optics* 11.5 (2006), pág. 5401.

BONNIER, Franck; KNIEF, Peter; LIM, B; MEADE, AD; DORNEY, Jennifer; BHATTACHARYA, Kunal; LYNG, FM y BYRNE, HJ. «Imaging live cells grown on a three dimensional collagen matrix using Raman microspectroscopy». En: *Analyst* 135.12 (2010), págs. 3169-3177.

BREASTCANCER.ORG. *Análisis para detectar el cáncer de mama: detección, diagnóstico y control. (en línea)*. EE.UU. 2016. (Recuperado en 20 enero 2018). Disponible en <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/analisis/tipos>.

BUTLER, Holly J y col. «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials». En: *Nature protocols* 11.4 (2016), pág. 664.

CARDONA, Manuel y PETER, Yu. *Fundamentals of semiconductors*. Springer, 2005, pág. 437. ISBN: 9783642007101.

CASPERS, PJ; LUCASSEN, GW; WOLTHUIS, R; BRUINING, HA y PUPPELS, GJ. «In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin». En: *BIOSPECTROSCOPY-NEW YORK- 4* (1998), S31-S40.

CHASE, Bruce. «A new generation of Raman instrumentation». En: *Applied Spectroscopy* 48.7 (1994), 14A-19A.

D. A. TRIANA, K. L. C. y. «Caracterización óptica, en el infrarrojo cercano, del tejido mamario para la detección temprana del cáncer de mamas». tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2014.

DAKUBO, Gabriel D; JAKUPCIAK, John P; BIRCH-MACHIN, Mark A y PARR, Ryan L. «Clinical implications and utility of field cancerization». En: *Cancer cell international* 7.1 (2007), pág. 2.

DAMANIA, Dhwanil; ROY, Hemant K; KUNTE, Dhananja; HURTEAU, Jean A; SUBRAMANIAN, Hariharan; CHERKEZYAN, Lusik; KROSNJAR, Nela; SHAH, Maitri y BACKMAN, Vadim. «Insights into the field carcinogenesis of ovarian cancer based on the nanocytology of endocervical and endometrial epithelial cells». En: *International journal of cancer* 133.5 (2013), págs. 1143-1152.

DEAN, DA; RAMANATHAN, T; MACHADO, D y SUNDARARAJAN, R. «Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues». En: *Journal of electrostatics* 66.3-4 (2008), págs. 165-177.

DEHGHANI-BIGDOLI, Zohreh; BAYGI, Miran; HOSEIN, Mohammad; KABIR, Ehsanollah y MALEKFAR, Rasoul. «Common Raman Spectral Markers among Different Tissues for Cancer Detection». En: *Iranian Journal of Medical Physics* 11.4 (2014), págs. 308-315.

EILERS, Paul HC y BOELEN, Hans FM. «Baseline correction with asymmetric least squares smoothing». En: *Leiden University Medical Centre Report* 1.1 (2005), pág. 5.

ELLIS, David I y GOODACRE, Royston. «Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy». En: *Analyst* 131.8 (2006), págs. 875-885.

FANG, Min; YUAN, Jingping; PENG, Chunwei y LI, Yan. «Collagen as a double-edged sword in tumor progression». En: *Tumor Biology* 35.4 (2014), págs. 2871-2882.

FAUSTINO-ROCHA, AI y col. «Ultrasonographic, thermographic and histologic evaluation of MNU-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats». En: *Bio-medicine & Pharmacotherapy* 67.8 (2013), págs. 771-776.

FENG, Shangyuan y col. «Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors». En: *International journal of nanomedicine* 10 (2015), pág. 537.

FERNÁNDEZ, Janeth; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, Stelia C; GONZALEZ-CORREA, CA y MIRANDA, David A. «Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells?» En: *Medical hypotheses* 97 (2016), págs. 107-111.

FRANK, Christopher J; MCCREERY, Richard L y REDD, Douglas CB. «Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues». En: *Analytical chemistry* 67.5 (1995), págs. 777-783.

HAKA, Abigail S; SHAFER-PELTIER, Karen E; FITZMAURICE, Maryann; CROWE, Joseph; DASARI, Ramachandra R y FELD, Michael S. «Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy». En: *Cancer research* 62.18 (2002), págs. 5375-5380.

HAKA, Abigail S; VOLYNSKAYA, Zoya I; GARDECKI, Joseph A; NAZEMI, Jonathan; SHENK, Robert; WANG, Nancy; DASARI, Ramachandra Rao; FITZMAURICE, Maryann y FELD, Michael S. «Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis». En: *Journal of biomedical optics* 14.5 (2009), pág. 054023.

HU, Chengxu y col. «Raman spectra exploring breast tissues: Comparison of principal component analysis and support vector machine-recursive feature elimination». En: *Medical physics* 40.6Part1 (2013).

INSTITUTO-NACIONAL-DE-CÁNCER. *Cáncer de mama. (en línea)*. EE.UU. 2015. (Recuperado en 20 noviembre 2017). Disponible en <https://www.cancer.gov/types/breast>.

KANTER, Elizabeth M; VARGIS, Elizabeth; MAJUMDER, Shovan; KELLER, Matthew D; WOESTE, Emily; RAO, Gautam G y MAHADEVAN-JANSEN, Anita. «Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis». En: *Journal of biophotonics* 2.1-2 (2009), págs. 81-90.

KAST, Rachel E y col. «Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model». En: *Biopolymers* 89.3 (2008), págs. 235-241.

LARKIN, Peter. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017, pág. 154. ISBN: 9780128042090.

LASCH, Peter; HAENSCH, Wolfgang; NAUMANN, Dieter y DIEM, Max. «Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1688.2 (2004), págs. 176-186.

LIU, C-H y col. «Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection». En: *Technology in cancer research & treatment* 12.4 (2013), págs. 371-382.

MANTSCH, Henry y col. *Biomedical applications of synchrotron infrared microspectroscopy: a practical approach*. Royal Society of Chemistry, 2010.

MAO, Yan; KELLER, Evan T; GARFIELD, David H; SHEN, Kunwei y WANG, Jianhua. «Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer». En: *Cancer and Metastasis Reviews* 32.1-2 (2013), págs. 303-315.

MARIANI, Melissa M; LAMPEN, Peter; POPP, Juergen; WOOD, Bayden R y DECKERT, Volker. «Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy». En: *Analyst* 134.6 (2009), págs. 1154-1161.

MCCREERY, Richard L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Vol. 225. John Wiley & Sons, 2005, pág. 312. ISBN: 9780471231875.

MIRANDA, D. A. «Seminario doctoral II: Modelado Computacional de Vibraciones Moleculares del Cation Amonio: Aplicación de la Teoría de la Simetría». PhD thesis. Universidad de los Andes, 2008.

MORRIS, Michael D; FINNEY, William F; RAJACHAR, Rupak M y KOHN, David H. «Bone tissue ultrastructural response to elastic deformation probed by Raman spectroscopy». En: *Faraday discussions* 126 (2004), págs. 159-168.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza y REHMAN, Ihtesham U. «Raman spectroscopy of biological tissues». En: *Applied Spectroscopy Reviews* 42.5 (2007), págs. 493-541.

NARAYANAN, V Anantha; STOKES, David L y VO-DINH, Tuan. «Vibrational spectral analysis of Eosin Y and Erythrosin B—intensity studies for quantitative detection of the dyes». En: *Journal of Raman spectroscopy* 25.6 (1994), págs. 415-422.

NIOKA, S y CHANCE, B. «NIR spectroscopic detection of breast cancer». En: *Technology in cancer research & treatment* 4.5 (2005), págs. 497-512.

OLIVEIRA, Ana Paula; BITAR, Renata Andrade; SILVEIRA JR, Landulfo; ZÂNGARO, Renato Amaro y MARTIN, Airton Abrahão. «Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis». En: *Photomedicine and Laser Therapy* 24.3 (2006), págs. 348-353.

PELLETIER, MJ. «Quantitative analysis using Raman spectrometry». En: *Applied spectroscopy* 57.1 (2003), 20A-42A.

POLL, Sweder WE van de y col. «Raman spectroscopic evaluation of the effects of diet and lipid-lowering therapy on atherosclerotic plaque development in mice». En: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21.10 (2001), págs. 1630-1635.

RADOSEVICH, Andrew J; MUTYAL, Nikhil N; YI, Ji; STYPULA-CYRUS, Yolanda; ROGERS, Jeremy D; GOLDBERG, Michael J; BIANCHI, Laura; BAJAJ, Shailesh y ROY, Hemant K. «Ultrastructural alterations in field carcinogenesis measured by enhanced backscattering spectroscopy». En: *Journal of Biomedical Optics* 18.9 (2013), pág. 097002.

RAMAN, Chandrasekhara Venkata. «A new radiation». En: (1928).

RAMOS, Jorge C.; LUNA, Adrián E. y LIMA, Carlos M. «Espectroscopia Raman y sus aplicaciones». En: *spectroscopy* 36 (2005), págs. 1059-1067.

RAMSER, Kerstin. «Raman spectroscopy of single cells for biomedical applications». En: *Applications of Raman spectroscopy to biology-from basic studies to disease diagnosis*, (Ghomi, M., Ed.), IOS Press, Amsterdam (2012), págs. 106-147.

REQUENA, Alberto y ROMÁN, José Z. *Espectroscopia*. Pearson Educación, 2004, pág. 540. ISBN: 9788420536774.

RIVENBARK, Ashley G y COLEMAN, William B. «Field cancerization in mammary carcinogenesis—implications for prevention and treatment of breast cancer». En: *Experimental and molecular pathology* 93.3 (2012), págs. 391-398.

ROY, Hemant K y col. «Optical detection of buccal epithelial nanoarchitectural alterations in patients harboring lung cancer: implications for screening». En: *Cancer research* 70.20 (2010), págs. 7748-7754.

SALA, Oswaldo. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. Unesp, 1996, pág. 75. ISBN: 9788571398689.

SHAFER-PELTIER, Karen E; HAKA, Abigail S; FITZMAURICE, Maryann; CROWE, Joseph; MYLES, Jonathan; DASARI, Ramachandra R y FELD, Michael S. «Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo». En: *Journal of Raman Spectroscopy* 33.7 (2002), págs. 552-563.

SKOOG, Douglas Arvid; HOLLER, F James y NIEMAN, Timothy A. *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill Interamericana de España, 2001, pág. 639. ISBN: 9789706868299.

SLAUGHTER, Danely P; SOUTHWICK, Harry W y SMEJKAL, Walter. «“Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin». En: *Cancer* 6.5 (1953), págs. 963-968.

SMITH, Ewen y DENT, Geoffrey. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2013, pág. 112. ISBN: 9781118681329.

SPIZZIRRI, PG; COCHRANE, NJ; PRAWER, S y REYNOLDS, EC. «A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy». En: *Caries research* 46.4 (2012), págs. 353-360.

STONE, Nicholas; KENDALL, Catherine; SMITH, Jenny; CROW, Paul y BARR, Hugh. «Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers». En: *Faraday discussions* 126 (2004), págs. 141-157.

SUBRAMANIAN, Hariharan. «Optical sensing of tissue microstructure and cell nanostructure». Tesis doct. Northwestern University, 2009.

SURMACKI, Jakub; MUSIAL, Jacek; KORDEK, Radzislaw y ABRAMCZYK, Halina. «Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis». En: *Molecular cancer* 12.1 (2013), pág. 48.

TFAYLI, Ali; GOBINET, Cyril; VRABIE, Valeriu; HUEZ, Regis; MANFAIT, Michel y PIOT, Olivier. «Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies». En: *Applied spectroscopy* 63.5 (2009), págs. 564-570.

TFAYLI, Ali; PIOT, Olivier; DRAUX, Florence; PITRE, Franck y MANFAIT, Michel. «Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin». En: *Biopolymers* 87.4 (2007), págs. 261-274.

TORRE, Lindsey A; BRAY, Freddie; SIEGEL, Rebecca L; FERLAY, Jacques; LORTET-TIEULENT, Joannie y JEMAL, Ahmedin. «Global cancer statistics, 2012». En: *CA: a cancer journal for clinicians* 65.2 (2015), pág. 87.

TREVISAN, Júlio; ANGELOV, Plamen P; CARMICHAEL, Paul L; SCOTT, Andrew D y MARTIN, Francis L. «Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives». En: *Analyst* 137.14 (2012), págs. 3202-3215.

TREVISAN, Júlio; PARK, Juhyun; ANGELOV, Plamen P; AHMADZAI, Abdullah A; GAJJAR, Ketan; SCOTT, Andrew D; CARMICHAEL, Paul L y MARTIN, Francis L. «Measuring similarity and improving stability in biomarker identification methods applied to Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy». En: *Journal of biophotonics* 7.3-4 (2014), págs. 254-265.

TRUJILLO, Kristina A; JONES, Anna C; GRIFFITH, Jeffrey K y BISOFFI, Marco. «Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies». En: *Prostate cancer 2012* (2012).

WEHBE, Katia; FILIK, Jacob; FROGLEY, Mark D y CINQUE, Gianfelice. «The effect of optical substrates on micro-FTIR analysis of single mammalian cells». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405.4 (2013), págs. 1311-1324.

WILSON, Edgar Bright; DECIUS, John Courtney y CROSS, Paul C. *Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra*. Courier Corporation, 1955, pág. 221. ISBN: 9780486137155.