

ESTUDIO DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN TEJIDO MAMARIO

JANETH FERNÁNDEZ PINTO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGS
2019**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN TEJIDO
MAMARIO**

JANETH FERNÁNDEZ PINTO

**Trabajo de Grado Presentado como Requisito para optar al Título de:
Doctor en Física**

Directores:

DAVID ALEJANDRO MIRANDO MERCADO¹

Dr., en Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS)

STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ²

Dra., Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA

BUCARAMANGS

2019

DEDICATORIA

*En memoria a mi querido padre, siempre
estarás en mi corazón. Tú me enseñaste
que el tiempo para amar es precioso.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Luis Francisco Fernández y Blanca Pinto, por enseñarme el valor de la familia y el amor incondicional.

A Cristian Navas por su paciencia, amor, complicidad, respeto y amistad, te amo. A mis hijos Ángela y Björn por llegar a mi vida regalándome el privilegio de ser su madre.

A mis hermanos por la vida que hemos compartido juntos.

A mi director, Ph.D David Alejandro Miranda Mercado a quien agradezco su ejemplo, tiempo, amistad, enseñanzas y guía durante todo este proceso, gracias por la confianza y por el crecimiento que el grupo de investigación CIMBIOS ha tenido durante este tiempo, sé que tu esfuerzo valdrá la pena.

A la profesora, Ph.D Stelia Carolina Méndez Sánchez por sus explicaciones y su valiosa contribución.

A las doctoras, MSc Claudia Janeth Uribe Pérez y Msc Olga Mercedes Álvarez Ojeda, quienes apoyaron esta investigación en conjunto con los laboratorios de patología de la Universidad Autónoma de Bucaramanga, UNAB y Universidad Industrial de Santander, UIS.

Al doctor, MSc. Álvaro Gómez Torrado por su tiempo, disposición, enseñanzas, guía y por ayudarnos a disponer de un espacio para realizar parte de esta investigación.

A mis amigos del grupo CIMBIOS, Melba Sánchez, Sandra Corzo, Marito, Sandra Pinto, José Roberto, Fabián Gonzales, Erika Godoi, Mónica.

A Colciencias por brindarme la maravillosa oportunidad de poder realizar mis estudios doctorales.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GENERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. GENERALIDADES	31
3.1 ALTERACIONES BIOFISICOQUÍMICAS ASOCIADAS AL CÁNCER DE MAMAS.....	31
3.2 EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO (ECC).....	36
3.3 DETECCIÓN DE ANORMALIDADES EN TEJIDO AL USAR ECC	38
3.4 HIPÓTESIS 1.....	40
3.5 HIPÓTESIS 2.....	44
4. DISPERSIÓN RAMAN Y EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO	48
4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO	49
4.1.1 Descripción clásica del efecto Raman	50
4.2 ANTECEDENTES.....	56
4.3 METODOLOGÍA	61
4.4 IDENTIFICACIÓN DE PICOS RAMAN	66
4.5 MAPEO ESPACIAL DE TEJIDO MAMARIO.....	81
4.6 RELACIÓN ENTRE ESPECTROS RAMAN Y EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO	85

5. RETRODISPERSIÓN DE LUZ POR TEJIDO MAMARIO Y SU RELACIÓN CON EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO	91
5.1 FUNDAMENTO TEÓRICO	92
5.1.1 Absorción	93
5.1.2 Dispersión	95
5.1.3 Dispersión Rayleigh	98
5.1.4 Dispersión Mie	100
5.1.5 Teoría de transporte radiativo	101
5.1.6 Cuantificación del movimiento de partículas en solución	104
5.1.7 Técnica DLS	107
5.1.8 Movimiento Browniano en tejidos	111
5.2 ANTECEDENTES	111
5.3 DETECCIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA FED-SA	116
5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA TÉCNICA FED-SA	119
5.4.1 Materiales	119
5.4.2 Diseño	122
5.4.3 Software	124
5.5 PROTOCOLO DE MEDIDAS	126
5.5.1 Consideraciones éticas	127
5.5.2 Mediciones sobre tejido mamario	128
5.6 MINIMIZACIÓN DE RUIDO Y CÁLCULO DE POTENCIA ESPECTRAL	131
5.6.1 Análisis de la señal discreta	134
5.6.2 Minimización del ruido blanco	135

5.7 POTENCIA ESPECTRAL Y TAMAÑO DE PARTÍCULAS	137
5.8 POTENCIA ESPECTRAL DE TEJIDO MAMARIO NORMAL	144
5.9 POTENCIA ESPECTRAL DE TEJIDO MAMARIO ANORMAL	146
5.10 COMPARACIÓN DE BANDAS ESPECTRALES DE TEJIDO MAMARIO NORMAL Y ANORMAL	148
5.11 RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS ESPECTRALES Y EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO	151
5.11.1 Análisis ANOVA	152
5.11.2 Curvas ROC.....	156
6. CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA.....	170
ANEXOS	196

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción patológica de las muestras para los pacientes P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7	63
Tabla 2. Líneas Raman identificadas para el xilol, n-propanol, etanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina entre los rangos de picos Raman de $600 - 1800\text{cm}^{-1}$	68
Tabla 3. Líneas Raman reportadas en la literatura para el xilol, n-propanol, etanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina, entre los rangos de picos Raman de $600 - 1800\text{cm}^{-1}$	69
Tabla 4. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras de los pacientes P1, P2, P3 y P4 entre los rangos $600-1800\text{cm}^{-1}$ del espectro Raman	78
Tabla 5. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras de los pacientes P5, P6 y P7 entre los rangos $600 - 1800\text{cm}^{-1}$ del espectro Raman	79
Tabla 6. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras del paciente P7 entre los rangos de $600 - 1800\text{cm}^{-1}$	80
Tabla 7. Descripción general del diagnóstico de las seis pacientes con anormalidades en el tejido mamario	130
Tabla 8. Relación señal ruido en los tres canales de adquisición antes (x) y después del procesamiento de datos (y).	133

Tabla 9. Valores de la media, desviación estándar, mínimo, máximo y cuartiles para las bandas de frecuencia.....	149
Tabla 10. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CSED y CSID	154
Tabla 11. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CSEI y CSII	154
Tabla 12. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CIED, CIEI y CIII.	154
Tabla 13. Área bajo la curva ROC de los cinco modelos elegidos.....	160
Tabla 14. Puntos de corte elegidos sobre la curva ROC del modelo 2, e índice de Youden	162

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de la glándula mamaria	32
Figura 2. Representación esquemática del tejido mamario en tres zonas	
(a) Con una tecnología no compatible con ECC	41
Figura 3. Representación de alteraciones multifocales en un órgano, purpura y azul con alteraciones bioquímicas	42
Figura 4. Representación general de la instrumentación utilizada por la espectroscopia Raman	53
Figura 5. Representación del espectro Raman Stokes y antiStokes.	54
Figura 6. Demarcación histopatológica sobre las muestras de tejido mamario. Área encerrada en negro cáncer, en azul tejido circundante normal	62
Figura 7. Muestras 5138-D y 3772-17A2 de tejido mamario.....	66
Figura 8. Espectros Raman sobre la muestra del paciente P1	71
Figura 9. Espectros Raman resultantes para los pacientes	72
Figura 10. Espectros Raman para las muestras de tejidos.....	73
Figura 11. Muestras de las pacientes P6 y P7, usadas para realizar el mapeo espacial con espectroscopia Raman	82
Figura 12. Espectro Raman de la paciente P6 D en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$	82
Figura 13. Espectro Raman de la paciente P6 D en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$	83

Figura 14. Espectro Raman de la paciente P7 A2 en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$	84
Figura 15. Espectro Raman de la paciente P7 A2 en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$	84
Figura 16. Interacción de la luz con los tejidos: a. Fenómenos de reflexión, absorción y dispersión	93
Figura 17. Longitud de penetración de la luz infrarroja (NIR).	95
Figura 18. Descripción geométrica de la dispersión de la luz por una partícula	97
Figura 19. Corte en el plano XY, del sistema mama tumor antes (Izquierda) y después del agente de contraste ICG (Derecha).....	103
Figura 20. Fluctuaciones en la intensidad dispersada de acuerdo al tamaño de partículas que se difunden en un movimiento Browniano	104
Figura 21. Representación esquemática del patrón de moteado (Speckel) debido a la luz dispersada por partículas estacionarias suspendidas en una cubeta	108
Figura 22. Representación esquemática de la función de correlación con respecto al tamaño partículas grandes (a) y pequeñas (b).	109
Figura 23. Potencia espectral para diferentes tamaños de partículas colocados en suspensión y medidos a través del principio de la técnica DLS.....	110
Figura 24. a. Anatomía de la mama.....	117
Figura 25. Perfil espectral del LED en el infrarrojo utilizado en el sistema de iluminación	120

Figura 26. Responsividad en función de la longitud de onda del detector ODA-5WB- 100K.....	120
Figura 27. Sistema de adquisición de datos adquirido a NI (National Instruments). (a) Sistema CompactRio9067, (b) módulo 9223 con cuatro entradas de señal.....	122
Figura 28. Configuración del sistema FED-SA. 1.....	122
Figura 29. Sistema de iluminación y detección. Fotografía exterior (a) e interior (b)	123
Figura 30. Circuito eléctrico que alimenta los detectores D1 , D2 y se presenta la forma en como es amplificada la diferencia de la señal recibida por los detectores	124
Figura 31. Diagrama de bloques para la adquisición de datos con el sistema cRio9067 y el módulo 9223	125
Figura 32. Proyecto diseñado en Labview para manejar el sistema de adquisición de datos	126
Figura 33. Nomenclatura y división por cuadrantes utilizada para realizar las mediciones sobre el tejido mamario.....	129
Figura 34. Intensidad retro-dispersada en función del tiempo por el tejido mamario	132
Figura 35. Procedimiento implementado para calcular la potencia espectral	136
Figura 36. Medida del tamaño de partículas de alúmina y café por la técnica de espectroscopia EDS. Tamaño de alúmina de 60 – 300 <i>nm</i> (a), 100 – 300 <i>nm</i> (b), 500 <i>nm</i> – 100 <i>nm</i> (c).	137

Figura 37. Experimento para medir la potencia espectral de partículas en suspensión.....	138
Figura 38. Señal retro-dispersada en función del tiempo medida con el sistema FED_SA, para partículas en suspensión de 60-300nm, 100-400nm y 500- 1000nm	139
Figura 39. Potencia espectral en función de la frecuencia para partículas en suspensión de diferentes tamaños	140
Figura 40. Barra de errores sobre las medidas de potencia espectral en función del tamaño de partículas en suspensión	142
Figura 41. Tamaño de partícula medido por Zetasiser Malverin instrumentos	142
Figura 42. Potencia Espectral En Función De La Frecuencia Para Partículas De Poliestireno De Tamaño Medio De 315.9 Nm En Suspensión	143
Figura 43. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente normal PN020	145
Figura 44. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente normal PN035.	146
Figura 45. Procesamiento de datos sobre la señal biológica registrada para la paciente con anormalidades PN015	147
Figura 46. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente con anormalidades PN016.....	148
Figura 47. Representación en diagrama de cajas y bigotes para tres bandas de frecuencia (0-1, 1-10, 10-50 kHz) por cuadrantes, con etiquetas normal y anormal para el conjunto de datos de las 24 mujeres.....	150

Figura 48. Representación en diagrama de cajas y bigotes para tres bandas de frecuencia (50-100, 100-150, 150-160 kHz) por cuadrantes, con etiquetas normal y anormal para el conjunto de datos de las 24 mujeres	151
Figura 49. Curva ROC para cinco modelos en los que se consideran las siguientes variables predictoras.....	159
Figura 50. Curva ROC para el modelo 2 que reúne las variables predictoras relacionadas con las Bandas de frecuencias y edad	163
Figura 51. Predicciones η de las variables predictor del modelo 2 en función de la categoría normal y anormal.....	164

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. DISPERSIÓN RAMAN	197
ANEXO B. MAMOGRAFÍAS PACIENTES CON CONDICIÓN DE ANORMALIDAD. FED-SA ESTUDIO.....	204
ANEXO C. ANOVA, NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD DE LOS DATOS	208
ANEXO D. MODELOS Y CURVA ROC	216

RESUMEN

Título: ESTUDIO DEL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO EN TEJIDO MAMARIO*.

Autor: JANETH FERNÁNDEZ PINTO**

Palabras Claves: Efecto de campo carcinogénico (ECC), espectroscopia Raman, Field effect detection by spectral analysis (FED-SA), movimiento Browniano

DESCRIPCIÓN:

En esta tesis doctoral se reporta el estudio del efecto de campo carcinogénico en tejido mamario por medio del estudio de las vibraciones moleculares y el estado de movimiento (Browniano) de moléculas en los medios intra y extra celulares. Para estudiar las vibraciones y el movimiento de las moléculas se emplearon dos técnicas experimentales, espectroscopia Raman y detección de efecto de campo carcinogénico por análisis espectral (Field Effect Detection by Spectral Analysis, FED-SA), donde FED-SA es una técnica experimental desarrollada como parte de esta tesis doctoral. En la investigación realizada se incluyeron 11 láminas de tejido mamario montado en parafina, para el estudio con espectroscopia Raman y para FED-SA se tomaron 192 medidas en 24 mujeres que participaron voluntariamente en el estudio. Las mediciones en mujeres fueron realizadas *in-vivo* con el dispositivo diseñado, luego de obtener el aval del Comité de Ética e Investigación Científica, CEINCI, de la Universidad Industrial de Santander, UIS. Los espectros Raman fueron tomados en dos zonas definidas como normal y anormal en cada muestra de tejido. En el conjunto de espectros se observaron anomalías bioquímicas asociadas a anormalidad, a distancias mayores a las dimensiones de la muestra, con ello se sugiere la posibilidad de detectar el efecto de campo carcinogénico por medio de espectroscopia Raman. Al realizar medidas con FED-SA se encontraron diferencias significativas $p < 0.05$ entre las pacientes con tejido normal y anormal; el análisis por curvas ROC, de modelos de regresión logística aplicados a parámetros espectrales FED-SA, sugiere una sensibilidad del 79 % y una especificidad del 96 %, lo cual es un resultado muy prometedor en el área de detección temprana.

* Tesis Doctoral.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: David Alejandro Miranda Mercado y Stelia Carolina Méndez Sánchez

ABSTRACT

TITLE: A STUDY OF FIELD CANCERIZATION EFFECT ON MAMMARY TIS-SUE*

AUTHOR: JANETH FERNÁNDEZ PINTO**

KEY WORDS: Field Cancerization effect (FCE), Raman spectroscopy, Field effect detection by spectral analysis (FED-SA), Brownian motion.

DESCRIPTION:

This doctoral thesis reports a study of field cancerization effect on mammary tissue through analysis of molecular vibrations, and the state of (Brownian) movement of molecules in both intra and extra cellular media. Two experimental techniques were used to study vibrations and movement of molecules: Raman spectroscopy and Field Effect Detection by Spectral Analysis, (FED-SA), where FED-SA is an experimental technique developed as part of this doctoral thesis. Research work included 11 mammary tissue paraffin mounted slides, for study through Raman spectroscopy; for FED-SA, 192 measurements were obtained in 24 women participating voluntarily in the study. Measurements in women were conducted in-vivo by means of the designed device, with endorsement of the Ethics and Scientific Research Committee, CEINCI, of Universidad Industrial de Santander, UIS. Raman spectra were taken into two zones defined as either normal or abnormal in each tissue sample. In the array of spectra, abnormality-associated biochemical anomalies were observed, at distances larger than the sample dimension, suggesting the possibility to detect carcinogenic field effect through Raman spectroscopy. Measuring through FED-SA, significant $p < 0.05$ differences were found between patients with normal or abnormal tissue; ROC-curve analysis of logistic regression applied to FED-SA spectral parameters suggests 79 % sensitivity and 96 % specificity, standing as a highly promising result in the area of early detection.

* Tesis Doctoral.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: David Alejandro Miranda Mercado y Stelia Carolina Méndez Sánchez.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se han detectado aproximadamente 200 tipos de cáncer en seres humanos, de los cuales 15 de ellos son considerados con mayor relevancia de acuerdo a las cifras de incidencia y mortalidad reportadas por la IARC (International Agency for Research on Cancer). Estas estadísticas revelan al cáncer de mamas como la enfermedad de mayor incidencia en la población femenina con un aproximado de dos millones de mujeres y cerca de 700 mil muertes en el mundo entero para el año 2018^{1,2}. Cifras que evidencian una problemática social que se extiende a todos los países, principalmente en vía de desarrollo como Colombia.

El cáncer de mamas es un tipo de enfermedad que se caracteriza por su alta heterogeneidad, es decir, sus diferentes tipos de neoplasias exhiben desiguales características histopatológicas y biológicas, así como diferentes resultados clínicos y respuestas a tratamientos^{3,4}. En cuanto a los métodos de detección, en Colombia los más usados son la auto exploración de las mamas y la mamografía por rayos x y en algunos casos, se implementa el uso de la ecografía o la resonancia magnética de imágenes.

Entre las técnicas de detección temprana, hasta el momento pueden mencionarse tres tipos; moleculares, que buscan identificar alteraciones en las proteínas reguladoras del ciclo celular como la p53, pRB y P16INK4a, y cambios genéticos

¹ AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. American Cancer Society, 2015, vol. 800, p. 1-64.

² WORLD CANCER RESEARCH FOUND INTERNATIONAL. Breast Cancer Statistics. American Institute for Cancer Research. 2015. (Recuperated 31 de enero de 2019). Disable: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>

³ ELLSWORTH, Rachel; BLACKBURN, Heather; SHRIVER, Craig; SOON-SHIONG, Patrick and ELLSWORTH, Darrell. Molecular heterogeneity in breast cancer: state of the science and implications for patient care. En Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, 2017. p. 65-72.

⁴ ZHANG, Mei; LEE, Adrian; ROSEN, Jeffrey. The cellular origin and evolution of breast cancer. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2017, vol. 7, no 3, pp. 27-128.

en BRCA1 o BRCA2^{5, 6, 7}; químicas, las cuales identifican componentes como octano 2,5,6 tri- metil, 1,4 dimetoxi 2,3 butanodiol y ciclohexano⁸; y ópticas, las cuales diferencian tejido normal y alterado, estudiando cambios en el índice de refracción del tejido o en la vascularización sanguínea^{9, 10}.

Estas técnicas y el estudio de las alteraciones relacionadas con el cáncer de mamas ya sea en etapas tempranas, intermedias y/o avanzadas permiten mejorar el conocimiento y tratamiento de esta enfermedad, pues un diagnóstico precoz es de vital importancia para prevenir el avance a estadios avanzados o metástasis. Una forma de realizar seguimiento a estas etapas del cáncer es la medición del efecto de campo carcinogénico, porque este se encuentra vinculado a la existencia de expresiones propias del cáncer en tejido aparentemente normal en mamas y otros tipos de cáncer^{11, 12, 13, 14}. La presencia de este efecto fue sugerida en 1953 por

⁵ PUSZTAIA, Lajos; MAZOUNIA, Chafika; ANDERSONB, Keith; WUC, Yun and FRASER, Symmansc. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *The Oncologist*, 2006, vol. 11, no 8, p. 868-877.

⁶ DWORKIN, Amy; HUANG, Tim; and TOLAND, Amanda. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. En *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2009. p. 165-171.

⁷ SHUBBAR, Emman. Analysis of Novel Biomarkers for Unfavorable Breast Cancer Prognosis (tesis). Gothenburg: University of Gothenburg. 2012.

⁸ WANG, Changsong, et al. Volatile Organic Metabolites Identify Patients with Breast Cancer, Cyclomastopathy and Mammary Gland Fibroma. *Scientific reports*, 2014, vol. 4, p. 5383.

⁹ MIRANDA, D.; CRISTIANO, K.; GUTIÉRREZ, J. Breast phantom for mammary tissue characterization by near infrared spectroscopy. En *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2013. p. 012018.

¹⁰ FARNSWORTH, Rae Helen; LACKMANN, M.; ACHEN, M.; and STACKER, S. Vascular remodeling in cancer. *Oncogene*, 2014, vol. 33, no 27, p. 3496-3505.

¹¹ HEAPHY, Christopher M., et al. Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *International journal of cancer*, 2006, vol. 119, no 1, p. 108-116.

¹² CHAI, Hong y BROWN, Robert. Field effect in cancer—an update. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 39(4):331–337, 2009.

¹³ TRUJILLO, Kristina A., et al. Breast field cancerization: isolation and comparison of telomerase-expressing cells in tumor and tumor adjacent, histologically normal breast tissue. *Molecular Cancer Research*, 2011, vol. 9, no 9, p. 1209-1221.

¹⁴ RIVENBARK, Ashley G., and COLEMAN, William B. Field cancerization in mammary carcinogenesis—Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Experimental and molecular pathology*, 2012, vol. 93, no 3, p. 391-398.

Slaugther¹⁵ y en la última década ha cobrado especial interés no solo en la comprensión de la transformación del tejido normal en cancerígeno^{16,17,18}, sino también en la detección temprana del cáncer por medio de técnicas ópticas^{19,20,21,22}.

La existencia del efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario implica que las anomalías bioquímicas debido a las células anormales se extiende en una zona mucho mayor a la del área circundante a esta^{23,24,25}. De hecho, para cáncer de colón es posible, por las alteraciones bioquímicas asociadas por el efecto de campo carcinogénico, detectarlo en células en el recto, a decenas de centímetros donde se encuentran las células anormales^{26,27}. Esto conduce a que las alteraciones bioquímicas debido a las células cancerígenas se extienden en un volumen mayor al volumen ocupado por las células anormales.

¹⁵ SLAUGHTER, Danely; SOUTHWICK, Harry; and SMEJKAL, Walter. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 1953, vol. 6, no 5, p. 963-968.

¹⁶ HEAPHY, Christopher M.; GRIFFITH, Jeffrey K.; BISOFFI, Marco. Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. *Breast cancer research and treatment*, 2009, vol. 118, no 2, p. 229-239.

¹⁷ NOSHO, Katsuhiko, et al. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology*, 2009, vol. 137, no 5, p. 1609-1620.

¹⁸ TIWARI, Ashish K., et al. Neo-angiogenesis and the premalignant micro-circulatory augmentation of early colon carcinogenesis. *Cancer letters*, 2011, vol. 306, no 2, p. 205-213.

¹⁹ RADOSEVICH, Andrew J., et al. Ultrastructural alterations in field carcinogenesis measured by enhanced backscattering spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 2013, vol. 18, no 9, p. 097002.

²⁰ BACKMAN, Vadim; ROY, Hemant. Light-scattering technologies for field carcinogenesis detection: a modality for endoscopic prescreening. *Gastroenterology*, 2011, vol. 140, no 1, p. 35-41.

²¹ BACKMAN, Vadim; and ROY, Hemant. Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification. *Journal of Cancer*, 2013, vol. 4, no 3, p. 251.

²² YI, Ji, et al. Spatially resolved optical and ultrastructural properties of colorectal and pancreatic field carcinogenesis observed by inverse spectroscopic optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 2014, vol. 19, no 3, p. 36-13.

²³ TRUJILLO, Kristina A., et al. Op. Cit.

²⁴ RIVENBARK, Ashley G., and COLEMAN, William B. Op. Cit.

²⁵ HEAPHY, Christopher M.; GRIFFITH, Jeffrey K.; BISOFFI, Marco. Op. Cit.

²⁶ TIWARI, Ashish K., et al. Op. Cit.

²⁷ BACKMAN, Vadim; and ROY, Hemant. Op. Cit.

Un aspecto importante, implícito en las alteraciones bioquímicas presentes en tejido mamario cancerígeno o anormal²⁸, corresponde con el cambio en su dinámica celular^{29,30,31,32}, la cual depende de las sustancias en el tejido. La mayor parte del tejido humano está compuesta de agua en la cual se encuentran suspendidas moléculas e iones³³. El movimiento de moléculas en soluciones acuosas está dominado por la interacción térmica con el ambiente, lo cual se manifiesta en un fenómeno conocido como movimiento Browniano³⁴. Para partículas en solución acuosa, el movimiento Browniano puede ser cuantificado por medio del análisis espectral de la intensidad de la radiación electromagnética retro-dispersada por el medio³⁵. El estudio de tamaños de nano-partículas por medio de radiación electromagnética retro-dispersada ha evolucionado en las técnicas de dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering)³⁶.

El movimiento aleatorio (Browniano) de las moléculas de agua en tejidos como el cerebral y de mamas es aprovechado por la técnica de Resonancia Magnética, cuya señal de resonancia es sensible a este movimiento³⁷. En esta se resalta que la mayoría de procesos patológicos que pueden llegar a afectar los tejidos modifican

²⁸ RANIERO, L., et al. In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2011, vol. 130, no 4-6, p. 1239-1247.

²⁹ WANG, Yuan-Yuan, et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer letters*, 2012, vol. 324, no 2, p. 142-151.

³⁰ LU, Pengfei; WEAVER, Valerie; and WERB, Zena. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 2012, vol. 196, no 4, p. 395-406.

³¹ ELOSEGUI-ARTOLA, Alberto, et al. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. *Nature materials*, 2014, vol. 13, no 6, p. 631.

³² CONTAG, Christopher H., et al. Monitoring dynamic interactions between breast cancer cells and human bone tissue in a co-culture model. *Molecular Imaging and Biology*, 2014, vol. 16, no 2, p. 158-166.

³³ HALL, John E. *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences, 2015.

³⁴ EINSTEIN, Albert. On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the molecular-kinetic theory of heat (English translation, 1956). *Investigations on the theory of the Brownian movement*, 1905.

³⁵ CLARK, Noel A.; LUNACEK, Joseph H.; and BENEDEK, George B. A study of Brownian motion using light scattering. *American Journal of Physics*, 1970, vol. 38, no 5, p. 575-585.

³⁶ GOLDBURG, W. Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 67(12): 1152–1160, 1999.

³⁷ CONTRERAS, C. Utrilla, et al. Diffusion-Weighted MRI: from Brownian motion to Head & Neck Tumor Characterization. *International Journal of Interactive Multimedia & Artificial Intelligence*, 2017, vol. 4, no 5.

los valores del coeficiente de difusión, el cual es menor en aquellas zonas donde el movimiento es más restringido.

Actualmente, existen muy pocas técnicas que permitan medir estos cambios bioquímicos vinculados con el efecto de campo carcinogénico y la alteración de la dinámica celular, de hecho hasta el momento sólo PWS fue diseñada para hacerlo^{38,39} y se ha implementado para identificar alteraciones en ovarios, pulmón y colon, tomando muestras en sus órganos espejos el cuello uterino, la saliva y el recto, respectivamente⁴⁰. En el tejido mamario existe aún un desconocimiento de la relación que hay entre este efecto y la dinámica celular, por lo que se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Es posible identificar cambios bioquímicos vinculados con el efecto de campo carcinogénico en el tejido aparentemente normal usando la espectroscopia Raman?
2. ¿Se puede aprovechar el movimiento Browniano dentro de los tejidos para diferenciar entre las señales retro-dispersadas por los tejidos mamarios normal y anormal?
3. ¿La señal retro-dispersada por el tejido mamario contiene información relacionada con el efecto de campo carcinogénico?

³⁸ ALMASSALHA, Luay M., et al. Label-free imaging of the native, living cellular nanoarchitecture using partial-wave spectroscopic microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, vol. 113, no 42, p. E6372-E6381.

³⁹ ALMASSALHA, Luay M., et al. Macrogenomic engineering via modulation of the scaling of chromatin packing density. *Nature biomedical engineering*, 2017, vol. 1, no 11, p. 902.

⁴⁰ GLADSTEIN, Scott, et al. Correlating colorectal cancer risk with field carcinogenesis progression using partial wave spectroscopic microscopy. *Cancer medicine*, 2018, vol. 7, no 5, p. 2109-2120.

A partir de estas preguntas de investigación se propusieron las siguientes hipótesis:

- Primera hipótesis: El efecto de campo carcinogénico se puede interpretar como un efecto de amplificación de las anomalías bioquímicas debido a las células anormales o transformadas.
- Segunda hipótesis: Dado que las moléculas en medios acuosos describen movimientos Brownianos, por la temperatura y su interacción con el medio, en medidas de luz retro- dispersada, se puede estudiar el efecto de la dinámica de los centros dispersores del tejido, de la cual se espera observar las diferentes contribuciones espectrales entre tejidos normales y anormales, debido a las alteraciones bioquímicas presentes en los tejidos anormales.

La presente memoria de tesis doctoral se ha estructurado en cinco capítulos, de la siguiente manera:

Se presentó la introducción, en el primer capítulo se presenta el planteamiento del problema, en el segundo capítulo los objetivos, en el tercer capítulo se presentan las generalidades, este contiene las alteraciones biofísicoquímicas relacionadas con el cáncer de mamas, la definición del efecto de campo carcinogénico, la forma en que puede realizarse detección de anomalías con este efecto, se presenta la hipótesis 1 que está relacionada con la generalidad del efecto de campo carcinogénico y por último la hipótesis 2 que describe como se relaciona la dinámica del tejido mamario con cambios bioquímicos.

En el cuarto capítulo se abordó la detección del efecto de campo por espectroscopia Raman, en este se condensa el fundamento teórico de la técnica, los antecedentes, la metodología, la identificación de las bandas Raman del tejido y de los compuestos usados en la preservación de las muestras, así como los resultados del mapeo

espacial de dos muestras de tejido mamario, para finalizar se presenta la relación entre los espectros Raman y el efecto de campo carcinogénico.

En el quinto capítulo se exhibe el estudio del tejido mamario normal y anormal con el sistema experimental que se ha diseñado en esta investigación denominado FED-SA, se presenta el fundamento teórico, los antecedentes, la detección mediante esta técnica, el protocolo de medidas, la minimización del ruido y cálculo de la potencia espectral, la potencia espectral medida para partículas en suspensión de diferentes tamaños, los resultados de potencia espectral para el tejido mamario normal y anormal y su comparación por bandas espectrales y finalmente, la relación entre los parámetros espectrales y el efecto de campo carcinogénico.

En el sexto capítulo se exponen las principales conclusiones alcanzadas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para estudiar el efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario se implementaron dos técnicas: La primera es la técnica de espectroscopia Raman, esta es de especial interés porque permite el estudio de tejido tanto in-vitro como montado en parafina⁴¹. Los cambios bioquímicos en el tejido mamario debidos al efecto de campo carcinogénico no son del todo conocidos, pese que el efecto fue sugerido desde 1953^{42, 43}. Este desconocimiento de las alteraciones bioquímicas en tejido humano asociadas al efecto de campo carcinogénico y la evidencia experimental del cambio de los espectros Raman por anomalías asociadas a tejido neoplásico⁴⁴ sugirieron la posibilidad de identificar por medio de micro-Raman las anomalías bioquímicas presentes en las zonas normales y cancerígenas de las muestras estudiadas.

Sin embargo, la necesidad de realizar detección temprana del cáncer de mamas implica el estudio de nuevas técnicas diagnósticas, que puedan ser implementadas en zonas urbanas y rurales en nuestro país. En este sentido, es posible por sus características pensar en fomentar el uso de la microscopia Raman, pese a ello, el costo de los equipos y la adecuación de las instalaciones para realizar los estudios clínicos basados en esta tecnología hacen de dicha alternativa una solución poco económica y de baja aplicabilidad en las zonas remotas.

⁴¹ TFAYLI, Ali, et al. Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies. *Applied spectroscopy*, 2009, vol. 63, no 5, p. 564-570.

⁴² HEAPHY, Christopher M.; GRIFFITH, Jeffrey K.; BISOFFI, Marco. Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. *Breast cancer research and treatment*, 2009, vol. 118, no 2, p. 229-239.

⁴³ CURTIUS, Kit; WRIGHT, Nicholas A.; and GRAHAM, Trevor. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer*, 2018, vol. 18, no 1, p. 19.

⁴⁴ HAKA, Abigail S., et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *Journal of biomedical optics*, 2009, vol. 14, no 5, p. 054023.

En vista de las limitaciones económicas para implementar Raman como un método de tamizado, se propuso una nueva técnica experimental llamada detección de efecto de campo carcinogénico por análisis espectral (FED-SA por su acrónimo en inglés: *field effect detection by spectral analysis*). Para probar la validez de la técnica propuesta se realizó una prueba de concepto, con el aval del comité de ética de la UIS, que consistió en: medir la luz retro-dispersada por el tejido mamario, la medida de esta luz en función del tiempo permite obtener información acerca de la dinámica de las moléculas en los compartimientos intra y extracelulares del tejido (Movimiento Browniano)^{45,46,47}, dado que estos son en gran proporción agua, los diferentes organismos vivos tendrán un movimiento relativo a su tamaño, esta relación se estudió a través de la potencia espectral en función de la frecuencia, calculada a partir de la medición de la luz retro-dispersada en el tiempo.

⁴⁵ ABRAMOVA, E. A., et al. Dynamics of Backscattering of Human Tissue on Exposure to a Low-Intensity Optical Radiation. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2003, vol. 70, no 4, p. 644-647.

⁴⁶ BOUSTANY, Nada; BOPPART, Stephen; and BACKMAN, Vadim. Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light. *Annual review of biomedical engineering*, 2010, vol. 12, p. 285-314.

⁴⁷ BRUNEL, Benjamin, et al. Structure and dynamics of multicellular assemblies measured by coherent light scattering. *New Journal of Physics*, 2017, vol. 19, no 7, p. 073033.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta investigación fue estudiar el efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario por espectroscopia Raman e Infrarrojo Cercano (NIR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la distribución espacial de alteraciones celulares de tejido mamario embebido en parafina por espectroscopia Raman en once muestras.
- Implementar un montaje experimental en el infrarrojo cercano NIR para estudiar la dinámica celular en tejido mamario normal y cancerígeno.
- Desarrollar un protocolo para realizar las medidas NIR en tejido mamario in-vivo.
- Estudiar cambios en la dinámica celular de tejido mamario por medio del análisis de la señal de intensidad de la radiación electromagnética NIR retro- dispersada por tejido mamario.

3. GENERALIDADES

3.1 ALTERACIONES BIOFISICOQUÍMICAS ASOCIADAS AL CÁNCER DE MAMAS

El tejido mamario cubre las costillas y los músculos del tórax, está compuesto por el epitelio glandular (lóbulos y ductos) que es el productor de leche en el seno de una mujer y está contenido en el tejido adiposo, ver figura 2.1.1. Un seno consiste en 15 a 20 lóbulos epiteliales y cada uno desarrolla numerosos lóbulillos productores de leche durante el embarazo (recuadro azul). Cada lóbulo está conectado al pezón a través de ductos (recuadro gris) que transportan la leche. Los lóbulillos y los ductos están compuestos por un epitelio de dos capas que comprende una capa interna de células epiteliales lumbinales y una capa externa de mioepitelio que se contrae para generar flujo de leche⁴⁸.

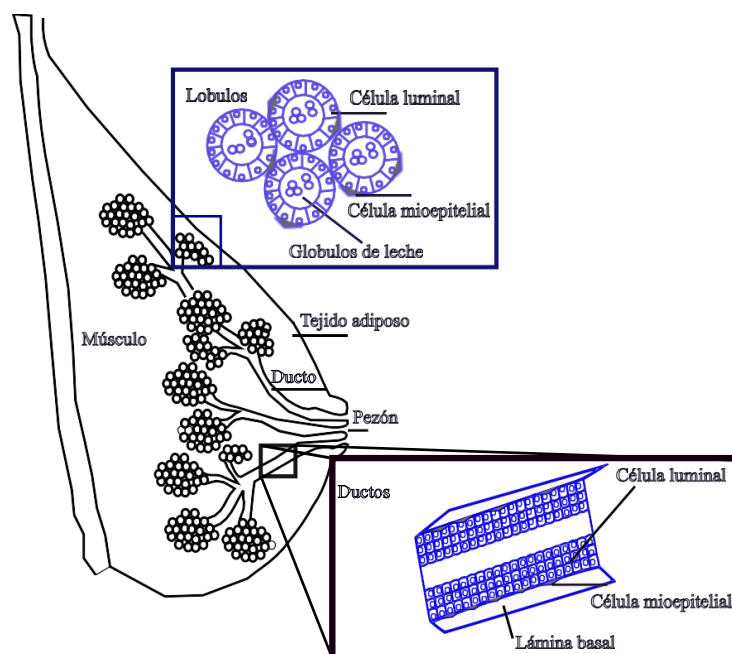
El tejido epitelial actúa como una barrera que separa el cuerpo del exterior y en el interior puede ser una línea fina que separa órganos internos. Estudiar las alteraciones relacionadas con este tejido es de gran importancia porque casi el 90 % de todos los tipos de cáncer en humanos se originan en el epitelio, entre ellos el cáncer de mamas. Las anormalidades en el tejido mamario que se inician en el epitelio de las células lumbinales en los lóbulillos o en los ductos, se conocen como carcinomas de tipo lobulillar (CL) y ductal (CD). Estos dos tipos pueden ser de tipo *in-situ* o invasivo, es decir células alteradas que no han invadido (CLIS, CDIS) o que han invadido la membrana basal (CLI, CDI)⁴⁹.

⁴⁸ NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION. Breast anatomy and how cancer starts. What are breasts made of? [Online]. National Breast Cancer Foundation. 19 of December of 2012. Disable: <https://nbcf.org.au/about-national-breast-cancer-foundation/about-%20breast-cancer/what-you-need-to-know/breast-anatomy-cancer-starts/>

⁴⁹ BREASTCANCER.ORG. Types of Breast Cancer. [Online]. BREASTCANCER.ORG. Last modified on October 16, 2018. Disable: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types>.

Como las transformaciones en el tejido se van dando paso a paso, y pueden ser de tipo genéticas o epigenéticas, existen además otros subtipos de cáncer de mamas divididos con base en la positividad para el receptor de estrógeno en dos grandes grupos; primero neoplasias de bajo grado con expresión de estrógeno (RE) y progesterona (RP), estos son conocidos como: Luminal A, Luminal B y HER2/neu; segundo neoplasias de alto grado que no presentan RE y RP pero con una sobre expresión de HER25, conocidos como: Similar a basal, HER2/neu, y similar a normal. Los tipo Similar a basal, son definidos por la expresión de genes en las queratinas k5 y k17 (filamentos intermedios del citoplasma), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) y alteración de las proteínas p53 y pRB; los de tipo Luminal A muestran altos niveles de expresión de genes de ER y bajos niveles de proliferación^{50,51}.

Figura 1. Representación esquemática de la glándula mamaria



Fuente: REJON, Carlis; MCCAFFREY, Luke. Cell polarity in mammary gland morphogenesis and breast cancer. En Cell Polarity 2. Springer, Cham, 2015. pp. 187-207.

⁵⁰ ALLISON, Kimberly. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. American journal of clinical pathology. 2012, vol. 138, no 6, p. 770-780.

⁵¹ SHUBBAR, Emman. Analysis of Novel Biomarkers for Unfavorable Breast Cancer Prognosis. 2012.

Los de tipo Luminal B presentan la misma expresión génica que el Luminal A y exhiben mutación del gen p53. Los tumores de tipo HER2/neu tiene una sobre expresión de este gen receptor. Las transformaciones debido a cambios epigenéticos, se asocian con alteraciones en la metilación que incluye, la hipometilación e hipermetilación en el ADN. Estos cambios epigenéticos inactivan genes que están involucrados con el control en el ciclo celular como el P16INK4a, con receptores de hormonas esteroideas (ER α ; PR; RAR β 2) y genes asociados con metástasis del cáncer (E-cadherin; TIMP-3)^{52, 53}.

En cuanto a cambios en las células y la arquitectura del tejido epitelial durante la transformación a una carcinogénesis, Lindsay Hinck y Inke Näthke sugieren cuatro transformaciones claves; pérdida de polaridad en las células, migración celular colectiva, invasión del estroma subyacente al someterse a una transición epitelial mesenquimal (EMT) e interacción de las células con el estroma por medio de la matriz extracelular (MEC)⁵⁴.

Las células epiteliales están polarizadas en la mayoría de los casos, es decir, tienen un polo luminal o apical cuya superficie está en contacto con el exterior del cuerpo o con la luz del ducto o cavidad, y un polo basal cuya superficie está en contacto y paralela a la lámina basal sobre la que se apoya la célula. Esta polaridad en la célula luminal se mantiene por tres grupos de proteínas, el primer grupo actúa sobre las membranas basolaterales y está conformado por Scrib (the Scribble), Lgl (lethal giant larvae), Dlg (discs large), el segundo grupo Crumbs, PALS, PATJ mantiene y regula la membrana apical y el tercer grupo (Par3), Par6, aPKC (atypical protein

⁵² PODLAHA, Ondrej; RIESTER, Markus; DE, Subhajyoti; and MICHOR, Franziska. Evolution of the cancer genome. Trends in Genetics. 2012, vol. 28, no 4, p. 155-163.

⁵³ DWORKIN, Amy M.; HUANG, Tim H.-M.; TOLAND, Amanda Ewart. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. En Seminars in cancer biology. Academic Press, 2009. p. 165-171.

⁵⁴ HINCK, Lindsay; NÄTHKE, Inke. Changes in cell and tissue organization in cancer of the breast and colon. Current opinion in cell biology, 2014, vol. 26, p. 87-95.

kinase C) regula la membrana apical basal. La inhibición de Par3 ha sido vinculada a la pérdida de adhesión e incremento en la invasión celular y metástasis^{55, 56}.

La migración colectiva de las células alteradas es uno de los problemas más desafiante en la parte clínica, porque una vez estas han salido de los ductos o lobulillos hacia el tejido adiposo pueden viajar hasta el torrente sanguíneo. Algunos estudios muestran que estos grupos de células ya no son epiteliales, si no que han estado bajo la transición de epitelial a mesenquimal, EMT. No es claro, si es un grupo de células que fue transformado o si fue una única que célula que se transformó y se dividió. Por lo tanto, para lograr con éxito el proceso de diseminación de las células transformadas, que es intrínsecamente difícil e ineficiente en solitario, los datos actuales indican que las células tumorales usan múltiples estrategias y consecuentemente invaden a células individuales y en grupos, con y sin haberse sometido a EMT^{57, 58}.

Una idea que viene cobrando fuerza, es que las células alteradas invasivas no entran a un entorno celular normal si no que este ya ha sido profundamente remodelado por el carcinoma en desarrollo. En la mama, estos cambios a nivel extracelular se pueden observar en el estadio CDIS, Lisa M. Coussens y colaboradores muestran como la señalización en las células epiteliales da como resultado la secreción de quimioquinas que atraen leucocitos, fibroblastos, células endoteliales y otras⁵⁹. Estas células merodeadoras se acumulan en el estroma que rodea los conductos y los lóbulos, allí re modelan la matriz extracelular y promueven

⁵⁵ MACARA, Ian G.; MCCAFFREY, Luke. Cell polarity in morphogenesis and metastasis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, vol. 368, no 1629, p. 20130012.

⁵⁶ REJON, Carlis; MCCAFFREY, Luke. Cell polarity in mammary gland morphogenesis and breast cancer. En Cell Polarity 2. Springer, Cham, 2015. pp. 187-207.

⁵⁷ TOMASKOVIC-CROOK, Eva; THOMPSON, Erik W.; THIERY, Jean Paul. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. Breast cancer research, 2009, vol. 11, no 6, p. 213.

⁵⁸ YU, Min, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. Science, 2013, vol. 339, no 6119, p. 580-584.

⁵⁹ COUSSENS, Lisa M.; ZITVOGEL, Laurence; PALUCKA, A. Karolina. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? Science, 2013, vol. 339, no 6117, p. 286-291.

el crecimiento del tumor, por medio de ciclos en bucles que generan una señalización recíproca, por ejemplo cuando el factor de transcripción GATA 3 es inhibido, se interrumpe la señalización con miR-29⁶⁰. La función de GATA 3 es promover la diferenciación de las células luminales a través de miR-29, el cual suprime genes que codifican proteínas como VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A), LOX (Lysyl Oxidase) y MMP9, de tal forma que la supresión de GATA 3 activa canales de señalización de todas estas proteínas, las cuales promueven la metástasis hacia el pulmón⁶¹.

La interacción de las células alteradas que se disocian del tumor emplean una serie de herramientas para navegar a través del EMC para entrar y salir de los vasos sanguíneos o linfáticos y llegar a sitios distantes. Además de las modificaciones bioquímicas, las propiedades mecánicas de la célula tumoral y su entorno juegan un rol crucial, pues estas células podrán moverse dependiendo del tamaño de poro del ECM, de modo que las células con núcleos más flexibles podrán emigrar a través de poros más pequeños⁶². Por eso el hallazgo de que las células se vuelven más blandas (más fácilmente deformables) a medida que se vuelven más metastásicas es consistente con la idea de que estas células transformadas migran más fácilmente a través de la densa EMC⁶³.

Conocer todos estos cambios que surgen en tejido mamario en el proceso que conlleva al cáncer es de vital importancia para su detección temprana, esta es la razón principal por la que se estudió el efecto de campo carcinogénico en el tejido

⁶⁰ CHOU, Jonathan, et al. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nature cell biology*, 2013, vol. 15, no 2, p. 201.

⁶¹ MCCLESKEY, Brandi C., et al. GATA3 expression in advanced breast cancer: prognostic value and organ-specific relapse. *American journal of clinical pathology*, 2015, vol. 144, no 5, p. 756-763.

⁶² [56] WOLF, Katarina, et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*, 2013, vol. 201, no 7, p. 1069-1084.

⁶³ KRAUSE, Marina; WOLF, Katarina. Cancer cell migration in 3D tissue: Negotiating space by proteolysis and nuclear deformability. *Cell adhesion & migration*, 2015, vol. 9, no 5, p. 357-366.

mamario, el cual se ha vinculado con transformaciones celulares del tejido en etapas tempranas. A continuación, se describirá cómo y porqué se postuló este efecto.

3.2 EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO (ECC)

Slaughter, Southwick y Smejkal, estudiaron 783 pacientes con presencia de tumores en los labios, cavidad oral y faringe. Este estudio histológico fue realizado con el objetivo de conocer el origen y la forma de propagación del carcinoma de células escamosas. Desde las observaciones realizadas encontraron un patrón de interés que les permitió concluir que el carcinoma epidermoide del epitelio escamoso oral es originado por un proceso de “Field Cancerization” o efecto de campo carcinogénico, en el cual un área del epitelio (aparentemente normal) ha sido pre-acondicionada por un agente cancerígeno desconocido. En el caso de la aplicación de algún agente externo, el intervalo de tiempo entre la aplicación del cancerígeno y el desarrollo del cáncer varía de acuerdo a la intensidad y al tiempo de exposición del mismo, es decir, esta exposición produce un cambio en las células o en un grupo de células que es irreversible⁶⁴.

Los autores en esta investigación van un poco más allá al proponer que este efecto de campo carcinogénico, puede desarrollarse en varios puntos del tejido por otros mecanismos en parches o grupos de células. Estos focos pueden estar relacionados microscópicamente o macroscópicamente con llevando a la producción de múltiples tumores en el epitelio y extenderse a lo largo del mismo hasta invadir el tejido. Dado este concepto, proponen que el carcinoma epidermoide surge desde áreas multifocales con cambios pre-cancerosos y no de una única célula alterada que se convierte en maligna. Un aspecto interesante sobre este concepto de campo

⁶⁴ SLAUGHTER, Danely; SOUTHWICK, Harry; and SMEJKAL, Walter. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. Cancer, 1953, vol. 6, no 5, p. 963-968

carcinogénico es su uso para explicar la recurrencia del cáncer oral, pues quirúrgicamente rara vez se va más allá del epitelio anormal, lo que los lleva a concluir que la recurrencia puede ser debido al epitelio benigno pre-acondicionado “*Field Cancerization*” que conducirá a un cáncer⁶⁵.

Actualmente, la biología celular y los estudios genéticos moleculares sugieren que este efecto no está limitado a estructuras contiguas expuestas a agentes cancerígenos, este puede estar presente en todo el órgano o partes del mismo (Próstata) así como en órganos pareados (Senos)⁶⁶ y en sistemas como el hematológico y el nervioso⁶⁷. Posiblemente, todo el cuerpo puede ser expuesto al desarrollo del cáncer como resultado de defectos genéticos heredados o adquiridos durante la embriogénesis (por ejemplo, síndrome de Li-Fraumeni)⁶⁸. Gabriel D. Dakubo propone como perspectiva actual del efecto de campo, ampliar los agentes causales incluyendo una amplia gama de factores tanto exógenos como endógenos. Los agentes exógenos son químicos como el humo del tabaco, agentes físicos como la radiación ultravioleta y agentes infecciosos como *Helicobacter pylori*, virus del papiloma humano y la hepatitis B. Secreciones endocrinas (por ejemplo, estrógenos, testosterona), secreciones exocrinas (por ejemplo, ácido gástrico) e incluso las mutaciones cancerosas heredadas (BRCA 1,2) constituyen los factores causales endógenos del efecto de campo⁶⁹.

⁶⁵ Ibíd.

⁶⁶ HA, Patrick K.; and CALIFANO, Joseph. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2003, vol. 14, no 5, pp. 363-369.

⁶⁷ DAKUBO, Gabriel D., et al. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer cell international*, 2007, vol. 7, no 1, p. 2.

⁶⁸ HANSON, Derek R.; and ATLAS, Mark. Chapter 23: Central Nervous System Malignancies. In Philip Lanzkowsky, Jeffrey M. Lipton, and Jonathan D. Fish, editors, *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology* (Sixth Edition). Academic Press, San Diego, sixth edition, 2016. pp. 453 – 472.

⁶⁹ DAKUBO, G.; DANELY, P. Slaughters field cancerization concept of carcinogenesis: the path forward to early cancer detection and chemoprevention, *Cell Dev. Biol*, 2015, vol. 4, p. 158.

Si bien este efecto es bien conocido por los científicos y oncólogos, el mecanismo exacto de su desarrollo no es claro⁷⁰. Es probable que existan múltiples mecanismos que operen de manera diferente en varios órganos y tejidos. Para esta época es claro que el cáncer es una enfermedad genética iniciada a menudo por alteraciones epigenéticas, mutaciones somáticas inducidas por carcinógenos, así como mutaciones hereditarias en genes de susceptibilidad al cáncer^{71,72}. Sin embargo, esta enfermedad es diferente al resfriado común que de repente ataca. Se requieren varias décadas para que una célula o grupo de células acumule suficientes alteraciones genéticas para transformarse en células histológicamente malignas. De hecho, las células alteradas crecen a través de cientos de generaciones, adquiriendo mutaciones posibilitadoras durante décadas⁷³. Esta amplia ventana ofrece un enorme potencial para la prevención primaria, la detección temprana, el diagnóstico y el tratamiento. Una posible ruta que ayudaría a lograrlo es descubrir, validar y estandarizar biomarcadores vinculados con el efecto de campo para detección del cáncer.

3.3 DETECCIÓN DE ANORMALIDADES EN TEJIDO AL USAR ECC

La identificación de alteraciones bioquímicas en cada etapa del cáncer es un aspecto importante para la detección, porque estas permiten crear estrategias para el tratamiento y la prevención del mismo. Entre las nuevas oportunidades para la detección temprana de estas alteraciones esta la relación que existe entre el efecto de campo carcinogénico y las alteraciones asociadas al cáncer, de hecho, Vadim Backman y colaboradores reportaron una nueva tecnología óptica PWS (Partial

⁷⁰ TALUKDAR, S., et al. Evolving strategies for therapeutically targeting cancer stem cells. En *Advances in cancer research*. Academic Press, 2016. p. 159-191.

⁷¹ FEARON, Eric. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 1997, vol. 278, no 5340, pp. 1043-1050.

⁷² VISVADER, Jane E. Cells of origin in cancer. *Nature*, 2011, vol. 469, no 7330, p. 314.

⁷³ BLANPAIN, Cédric. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature cell biology*, 2013, vol. 15, no 2, p. 126-134.

Wave Spectroscopy) que estudia los cambios estructurales nanométricos midiendo un parámetro de desorden en el tejido. PWS se ha enfocado en detectar el efecto de campo carcinogénico en tres tipos de órganos de muy difícil acceso los pulmones, ovarios y el colón, las mediciones son realizadas partiendo de la hipótesis del órgano espejo (ECC), es decir, se detectan anomalías en órganos externos, estudiando muestras de la mucosa bucal para vincular anomalías en los pulmones, en la mucosa al final del recto para el colón y usando la prueba de la citología para ovarios^{74, 75, 76}.

El entendimiento de este efecto, así como su propagación a través del tejido representa una poderosa herramienta para prevenir la recurrencia del cáncer, por ejemplo, en el cáncer de mamas las pacientes que han estado bajo una lupectomía, en el cáncer oral abre la posibilidad de administrar terapias quimio-preventivas y en el cáncer de próstata mitigar los daños de un mal diagnóstico. Tradicionalmente el examen histopatológico ayuda a identificar alteraciones en una determinada área, pero no es posible definir una zona límite de las anomalías celulares y generalmente esta responsabilidad es afrontada en los procesos clínicos en donde se decide el límite de corte, el cual es indispensable para evitar la recurrencia del cáncer⁷⁷.

⁷⁴ ROY, Hemant K.; HENSING, Thomas; BACKMAN, Vadim. Nanocytology for field carcinogenesis detection: novel paradigm for lung cancer risk stratification. *Future oncology*, 2011, vol. 7, no 1, pp. 1-3.

⁷⁵ DAMANIA, Dhwanil, et al. Nanocytology of rectal colonocytes to assess risk of colon cancer based on field cancerization. *Cancer research*, 2012, vol. 72, no 11, p. 2720-2727.

⁷⁶ DAMANIA, Dhwanil, et al. Insights into the field carcinogenesis of ovarian cancer based on the nanocytology of endocervical and endometrial epithelial cells. *International journal of cancer*, 2013, vol. 133, no 5, p. 1143-1152.

⁷⁷ FOO, Jasmine; LEDER, Kevin; RYSER, Marc D. Multifocality and recurrence risk: a quantitative model of field cancerization. *Journal of theoretical biology*, 2014, vol. 355, pp. 170-184.

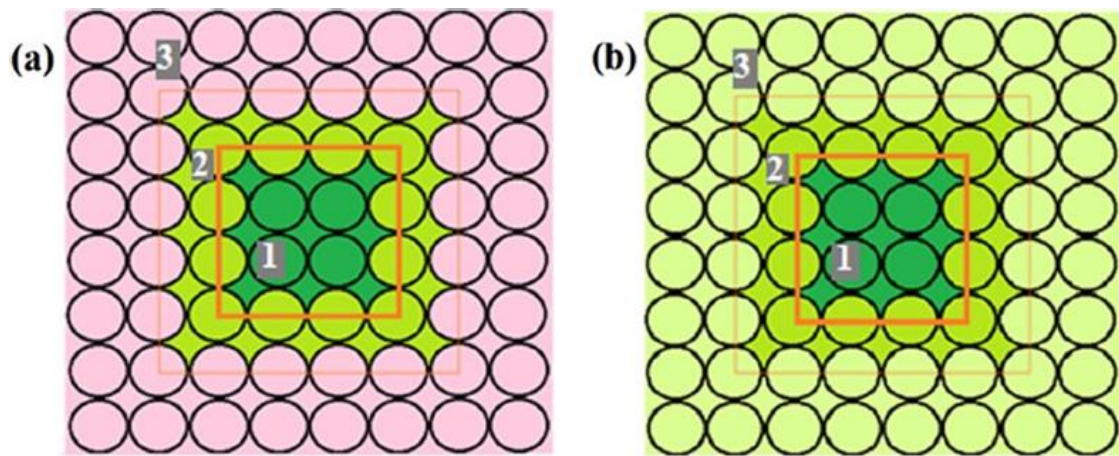
3.4 HIPÓTESIS 1

En este estudio se ha propuesto al efecto de campo carcinogénico como un efecto amplificador de las anomalías bioquímicas en las células normales debido a las células transformadas (ya sea en la primera etapa que da paso de la normalidad a anormal, o en la segunda etapa de anormal a cancerosa), esta hipótesis implica que las alteraciones presentes en cualquier tejido u órgano pueden ser medidas en zonas alejadas de las anomalías⁷⁸.

Para describir la hipótesis de investigación se han introducido algunas representaciones gráficas, en las que se muestra al tejido mamario observado por dos tecnologías diferentes: a) una tecnología no compatible con ECC y b) una tecnología compatible con ECC como por ejemplo PWS. Si se supone un tejido con un único tipo de anormalidades entonces en la Figura 2.4.1a, para tecnologías no compatibles con ECC, hay tres zonas: la primera es la zona con células transformadas, color verde oliva, la segunda es la zona con anormalidades relacionadas con las células transformadas, color verde y la tercera zona las células normales, color rosado.

⁷⁸ FERNÁNDEZ, Janeth, et al. Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells? Medical hypotheses, 2016, vol. 97, p. 107-111.

Figura 2. Representación esquemática del tejido mamario en tres zonas (a) Con una tecnología no compatible con ECC (ejemplo, Examen histopatológico tradicional): 1) Zona con alteraciones detectables (color verde oliva), 2) Zona alrededor con los mismas alteraciones (color verde), 3) tejido normal (color rosa), y (b) Con una tecnología compatible con ECC (ejemplo, PWS), las células aparentemente normales en 3) amplifican la comunicación celular ayudando a las células transformadas, color verde claro

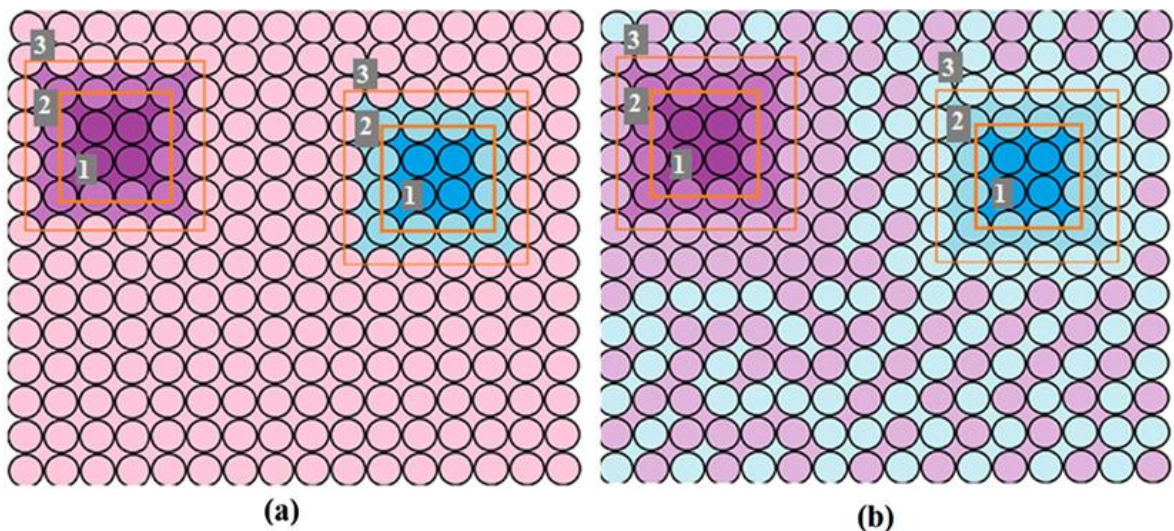


Fuente: KOONTONGKAEW, Sittichai. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*, 2013, vol. 4, no 1, p. 66.

En la figura 2.4.1b, para tecnologías compatibles con ECC se considera la tercera zona como una contenedora de alteraciones a nivel de señalización celular inducidas por las células transformadas hacia las células normales, esta alteración en la proteómica puede incluirse entre las anomalías bioquímicas del cáncer. Bajo esta representación, es posible formular que esta alteración a nivel de señalización celular ocurre antes que los cambios estructurales en la células normales, es decir, ECC podría iniciar con los cambios en la comunicación a nivel celular y posteriormente ocurrir los cambios nanoestructurales, estos cambios ya son

medidos por PWS y no pueden ser detectados a través de un microscopio convencional⁷⁹.

Figura 3. Representación de alteraciones multifocales en un órgano, purpura y azul con alteraciones bioquímicas (a) visto desde una tecnología no compatible con ECC (b) vista del tejido con una tecnología compatible con ECC, la comunicación celular hacia todo el tejido desde las células transformadas es amplificada por las células aparentemente normales ayudando al crecimiento de las células transformadas.



Fuente: KOONTONGKAEW, Sittichai. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. Journal of Cancer, 2013, vol. 4, no 1, p. 66.

La existencia de múltiples tumores en un mismo órgano fue explicada por Slaughter, esta existencia puede visualizarse también utilizando ECC como un efecto amplificador de anomalías, es decir, si se toma un órgano con dos anomalías, como se ilustra en la figura 2.4.2a en púrpura y azul, el análisis histopatológico depende de la zona en donde se toman las muestras. Si las muestras son tomadas en la

⁷⁹ BAUER, Greta M., et al. The transformation of the nuclear nanoarchitecture in human field carcinogenesis. Future science OA, 2017, vol. 3, no 3, p. FSO206.

tercera zona, el examen mostrará células normales, ya que ECC no es detectable a nivel celular con esta técnica. Sin embargo, si se utiliza una tecnología compatible con ECC, es posible detectar cambios a nivel celular porque ECC esta amplificado las anormalidades. En la figura 2.4.2b los colores púrpura y azul claro representan las células normales con una comunicación proteica alterada por las células transformadas; estas células aparentemente normales amplifican la señalización proteica ayudando al crecimiento del tumor y bloqueando la respuesta del sistema inmune^{80, 81, 82}.

Esta hipótesis está sustentada en resultados experimentales en los que se ha verificado que las células transformadas modifican el microambiente para aumentar paulatinamente el oxígeno y por ende la formación de vasos sanguíneos, este proceso de vascularización en el microambiente es al parecer liderado por señalización celular que activa factores de crecimiento como el VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), este factor se ha encontrado sobre expresado en células cancerígenas y fue relacionado con un proceso de micro-vascularización por Backman, quien uso este resultado para crear la técnica PWS, la cual se fundamenta en la detección de ECC por medio de instrumentación óptica^{83, 84, 85}.

Recientemente Kang-Ling formuló un modelo basado en los resultados encontrados para células de plasmocitoma, que muestra como estas células cancerígenas crean un ciclo cerrado que estimula la secreción principalmente de cuatro citoquinas M-

⁸⁰ HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no 5, p. 646-674.

⁸¹ KOONTONGKAEW, Sittichai. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*, 2013, vol. 4, no 1, p. 66.

⁸² CASEY, Stephanie C., et al. The effect of environmental chemicals on the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*, 2015, vol. 36, no Suppl_1, p. S160-S183.

⁸³ TAE, Kyung, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clinical cancer research*, 2000, vol. 6, no 7, pp. 2821-2828.

⁸⁴ WALI, R. K., et al. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. *Gut*, 2005, vol. 54, no 5, p. 654-660.

⁸⁵ ROY, Hemant K., et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) mediates the early increase of blood supply (EIBS) in colon carcinogenesis. *FEBS letters*, 2007, vol. 581, no 20, p. 3857-3862.

CSF, IL-35, TGF-beta y VEGF. M-CSF promueve la diferenciación de las células supresoras de mieloide (MDSCs), las cuales son también atraídas por quimiotaxis. Muchos tumores primarios secretan M-CSF. Este grupo de células usa MDSCs para inhibir el sistema inmune y secretar IL-35 para promover la producción de VEGF, es decir todo el sistema funciona para que las células endoteliales normales se dirijan hacia el conjunto anormal de células e induzcan la angiogénesis mientras el sistema inmune es bloqueado^{86,87}.

3.5 HIPÓTESIS 2

Referente a la dinámica en los tejidos, se sugiere que el tejido mamario anormal o cancerígeno tiene una dinámica diferente al tejido normal.

La dinámica en los tejidos comprende el movimiento de las diferentes organelas celulares, fluidos, microestructuras del tejido y la supresión o sobre expresión de proteínas en los medios intra y extracelular, entre otros. El movimiento celular es una de las funciones necesarias en los organismos, pues esta capacidad de moverse implica el crecimiento celular, la división y la migración a áreas donde estas se necesitan. Esto se hace posible debido al citoesqueleto, el cual está formado por una red de fibras que se encuentran extendidas por todo el citoplasma de la célula⁸⁸.

El movimiento celular es necesario cuando: Surgen infecciones o lesiones, los glóbulos blancos y los macrófagos migran hacia los sitios afectados para combatir

⁸⁶ LIAO, Kang-Ling; BAI, Xue-Feng; FRIEDMAN, Avner. Mathematical modeling of interleukin-27 induction of anti-tumor T cells response. PLoS One, 2014, vol. 9, no 3, p. e91844.

⁸⁷ Ibid.

⁸⁸ BAILEY, Regina. How and why cells move. [Online]. Science, Tech, Math. February 25, 2019. Disable: <https://www.thoughtco.com/how-and-why-cells-move-373377>

bacterias o gérmenes⁸⁹; En la construcción de tejidos, órganos y la generación de forma⁹⁰; Reparación de heridas, las células del tejido conectivo viajan al sitio de la lesión a reparar el tejido dañado⁹¹; En el ciclo celular, para que se dé el proceso de división en la formación de dos células hijas y; La presencia de células cancerígenas, pues éstas alcanzan la capacidad de hacer metástasis diseminándose a otros lugares al moverse a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos^{92, 93}.

Actualmente, se conoce que el movimiento de las células dentro de los tejidos se debe a señales químicas o físicas que son detectadas por las proteínas que se encuentran en las membranas celulares. Cuando estas señales son detectadas la célula comienza a moverse en tres fases: Primero, se desprende de la matriz extracelular hacia adelante, segundo la parte separada se mueve hacia adelante y se vuelve a unir en una posición posterior, la parte posterior también se separa y tercero, la célula se empuja hacia adelante a una nueva posición por la proteína misiona, esta utiliza energía derivada de ATP para moverse a lo largo de los filamentos de actina, haciendo que las fibras del citoesqueleto se deslicen. La célula se mueve en la dirección de la señal detectada, la cual en caso de ser una señal química se moverá en la dirección de más alta concentración de las moléculas que están enviando la señal (quimiotaxis)⁹⁴.

⁸⁹ GERMAIN, Ronald N.; ROBEY, Ellen A.; and CAHALAN, Michael. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science*, 2012, vol. 336, no 6089, p. 1676-1681.

⁹⁰ BRYANT, David M.; MOSTOV, Keith E. From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008, vol. 9, no 11, p. 887.

⁹¹ LI, Li; YONG, He; MIN, Zhao, and JIANXIN, Jiang. Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. *Burns & trauma*, 2013, vol. 1, no 1, p. 21.

⁹² [84] KURIYAMA, Sei, et al. In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. *J Cell Biol*, 2014, vol. 206, no 1, p. 113-127.

⁹³ [85] KRAKHMAL, Nadezhda V., et al. Cancer invasion: patterns and mechanisms. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 2015, vol. 7, no 2 (25).

⁹⁴ [86] NATURE EDUCATION. Cell adhesion and cell communication. [Online]. *Nature*. 2014. Disponible: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-adhesion-and-cell-communication-14050486>

Dentro de los tejidos las células se encuentran en contacto con otras células o con la matriz extracelular por medio de moléculas de adhesión, una clase de estas moléculas son las integrinas que forman enlaces mecánicos para transmitir señales celulares que implican la detección del entorno, el control de la forma y la motilidad. Estas integrinas enlazan el citoesqueleto por medio de la actina a varias estructuras externas, además de estas moléculas algunas células requieren otras proteínas de adhesión para mantener contacto físico con el medio extracelular⁹⁵. Por ejemplo, las células epiteliales que recubren todas las superficies externas e internas del cuerpo humano, en sus uniones de lado a lado tienen proteínas de diversas composiciones y funciones.

La muerte celular programa de una cierta proporción de células o el crecimiento celular se realiza mediante señales a nivel extracelular e intracelular^{96,97}. De esta forma, cuando las células vecinas reciben estas señales de sus alrededores, esta señal se comparte hacia todas las células para elegir un curso de acción, un ejemplo de ello es la señalización de ausencia de nutrientes o la presencia de toxinas, lo que conduce la muerte celular del grupo de células. Un hecho relevante en este punto, es la evidencia experimental de la alteración de la señalización celular en el proceso que conduce al cáncer en los tejidos⁹⁸.

Desde un punto de vista físico, el movimiento de todos los componentes celulares dentro del tejido es aleatorio y su velocidad dependerá del tamaño de las estructuras, células, moléculas, proteínas e iones presentes⁹⁹. Dado que los tejidos

⁹⁵ MITCHISON, T.; and CRAMER, L. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 1996, vol. 84, no 3, p. 371-379.

⁹⁶ DALEY, William P.; PETERS, Sarah B.; and LARSEN, Melinda. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science*, 2008, vol. 121, no 3, p. 255-264.

⁹⁷ GRANADOS, Alejandro A., et al. Distributed and dynamic intracellular organization of extracellular information. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, no 23, pp. 6088-6093.

⁹⁸ VAN ZIJL, Franziska; KRUPITZA, Georg; MIKULITS, Wolfgang. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2011, vol. 728, no 1-2, pp. 23-34.

⁹⁹ HALL, John E. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences, 2015.

se componen mayoritariamente de agua, se puede sugerir que el movimiento de estos elementos dentro del mismo podría interpretarse como la suspensión de partículas de diferentes tamaños en agua¹⁰⁰. Generalmente, la información contenida en un medio es obtenida al interactuar con el mismo, físicamente esta interacción puede lograrse haciendo incidir luz infrarroja para no alterar el tejido, cuando se estudia la luz retro-dispersada por los tejidos, la luz detectada podría contener información acerca de: células de grasa (15-250 μm), fibras de colágeno (1-50 μm), altura de las células epiteliales (25 μm), microtubulos (10-25 μm), diámetro de las células epiteliales (10-20 μm), diámetro de leucocitos (8-22 μm), diámetro del núcleo de la célula (5-10 μm), diámetro de las fibras de colágeno (0.5-12 μm), diámetro de las fibras de elastina (2-3 μm), mitocondrias y lisosomas (1-2 μm), longitud del tropocolágeno (300nm), diámetro de fibrillas y microtubulos (5-400nm) y mitocondrias pequeñas (100-200nm)^{101, 102}.

¹⁰⁰ LU, Renfu. Light scattering technology for food property, quality and safety assessment. Crc Press, 2016.

¹⁰¹ WANG, Lihong V.; WU, Hsin-i. Biomedical optics: principles and imaging. John Wiley & Sons, 2012.

¹⁰² TUCHIN, Valery. Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. Journal of Biomedical Photonics & Engineering, 2015, vol. 1, no 2.

4. DISPERSIÓN RAMAN Y EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO

Diversos grupos de investigación en el mundo han demostrado que la espectroscopia Raman permite evidenciar las alteraciones bioquímicas vinculadas con el cáncer y otras enfermedades en los tejidos^{103, 104, 105}. Hasta el momento la detección del efecto de campo carcinogénico por esta técnica se ha realizado en muestras de tejido cervical, piel y cavidad oral^{106, 107, 108}. Para el tejido mamario se han reportado las líneas Raman características del tejido cancerígeno y normal¹⁰⁹, pero hasta la fecha no se encuentra reportado el efecto de campo carcinogénico en tejido mamario por espectroscopia Raman. En vista que este efecto puede interpretarse como un efecto amplificador de las anomalías bioquímicas en las células normales debido a las células transformadas, se muestra por espectroscopia Raman como la zona identificada por patología dentro del tejido mamario como normal, contiene alteraciones relacionadas con la zona cancerígena en las muestras estudiadas.

¹⁰³ REDD, Douglas, et al. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, p. 787-791.

¹⁰⁴ DOWNES, Andrew; and ELFICK, Alistair. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors*, 2010, vol. 10, no 3, p. 1871-1889.

¹⁰⁵ ABRAMCZYK, Halina, et al. The label-free Raman imaging of human breast cancer. *Journal of Molecular Liquids*, 2011, vol. 164, no 1-2, p. 123-131.

¹⁰⁶ HU, Yaogai; JIANG, Tao; ZHAO, Zhengyu. Discrimination of squamous cell carcinoma of the oral cavity using Raman spectroscopy and chemometric analysis. En *2008 First International Conference on Intelligent Networks and Intelligent Systems*. IEEE, 2008. p. 633-636.

¹⁰⁷ [LIEBER, Chad; NETHERCOTT, Hubert; and KABEER, Mustafa. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. *Biomedical optics express*, 2010, vol. 1, no 3, p. 975-982.

¹⁰⁸ MALIK, Akshat, et al. In vivo Raman spectroscopy-assisted early identification of potential second primary/recurrences in oral cancers: An exploratory study. *Head & neck*, 2017, vol. 39, no 11, p. 2216-2223.

¹⁰⁹ REDD, Douglas C., CHUAN, Zhe. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, pp. 787-791.

4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Las palabras usadas por el físico indio Chandrasekhara Raman el 6 de marzo de 1928 fueron: “Me he propuesto hablarles esta noche sobre una nueva clase de radiación o luz emitida por átomos y moléculas”, este fue su descubrimiento titulado difracción molecular de la luz, que junto con otra serie de investigaciones le permitió formular el efecto Raman o dispersión inelástica de la luz. En su primer reporte en Nature titulado “un nuevo tipo de radiación secundaria”, Raman estudio 60 líquidos diferentes que mostraron el mismo resultado, la luz dispersada tenía un color diferente a la luz incidente¹¹⁰. Estas publicaciones fueron tan completas que fortalecieron la investigación de este efecto, el cual también había sido expuesto teóricamente por Smekal en 1923¹¹¹.

Actualmente, este maravilloso fenómeno físico se utiliza para obtener información acerca del espectro vibracional, rotacional o vibrorotacional de muestras líquidas o sólidas. Este proceso se realiza mediante la técnica de espectroscopia Raman, la cual obtiene los espectros Raman al irradiar una muestra con una fuente potente de luz monocromática en el infrarrojo (NIR), en el visible o en ultra violeta UV. Durante el proceso se mide la respuesta de la muestra a esta interacción al recolectar la luz dispersada con un espectrómetro apropiado¹¹².

La dispersión Raman se evidencia a través de corrimientos frecuenciales conocidos como Raman Stokes $\nu_0 - \nu_i$ y Raman Anti-Stokes $\nu_0 + \nu_i$, que se interpretan como fotones dispersados a menor o mayor frecuencia que la del haz incidente. Estos desplazamientos en frecuencia ν_i están relacionados con

¹¹⁰ RAMAN, Chandrasekhara Venkata. A new radiation. Indian Journal of physics, 1928, vol. 2, p. 387-398.

¹¹¹ SMEKAL, Adolf. Zur quantentheorie der dispersion. Naturwissenschaften, 1923, vol. 11, no 43, p. 873-875.

¹¹² REQUENA RODRÍGUEZ, Alberto y ZÚÑIGA ROMÁN, José. Espectroscopia. Madrid: Pearson/Prentice Hall, 2004.

movimientos vibracionales, rotacionales o vibrorotacionales moleculares generados por la interacción con los fotones incidentes.

4.1.1 Descripción clásica del efecto Raman. Esta interacción puede estudiarse en un marco semi-clásico a través del dipolo eléctrico inducido μ en la muestra, el cual dependerá de la polarizabilidad de las moléculas α y el campo eléctrico $\mathbf{E}$ de los fotones incidentes con frecuencia ν_0 . Este dipolo matemáticamente expresado en la ecuación 3.1.1, mide la capacidad que tiene el campo eléctrico de perturbar el sistema y producir una distorsión en la nube electrónica que rodea la molécula.

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E} \quad (4.1.1)$$

Sí se asume que la magnitud campo eléctrico de los fotones incidentes tiene la forma:

$$E = E_o \cos[2\pi\nu_o t] \quad (4.1.2)$$

$$E = \alpha E_o \cos[2\pi\nu_o t] \quad (4.1.3)$$

Para el efecto Raman vibrónico, la polarizabilidad α está definida en función de los modos normales de vibración Q_i de las moléculas, siendo $Q_i = Q_o \cos[2\pi\nu_i t]$, la amplitud de uno de sus modos normales de vibración con frecuencia ν_i y amplitud máxima Q_o . Al variar Q_i y el tiempo la polarizabilidad se puede aproximar mediante un desarrollo en series de Taylor de primer orden alrededor de la posición de equilibrio de la molécula Q_o a:

$$\alpha \approx \alpha_o + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{Q_o} \cdot Q_i \quad (4.1.4)$$

$$\alpha = \alpha_o + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{Q_o} \cdot Q_o \cos[2\pi\nu_o t] \quad (4.1.5)$$

En esta expresión α_0 es la polarizabilidad eléctrica en el equilibrio. Bajo esta aproximación se obtiene una expresión resultante para el dipolo eléctrico inducido que puede resumirse de la siguiente manera:

$$\mu = \mu(v_o) + \mu(v_o - v_i) + \mu(v_o + v_i) \quad (4.1.6)$$

donde

$$\mu = \mu(v_o) = \alpha_o E_o \cos[2\pi v_o t] \quad (4.1.7)$$

$$\mu(v_o - v_i) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{Q_o} \cdot Q_o \cos[2\pi(v_o - v_i)t], \quad (4.1.8)$$

$$\mu(v_o + v_i) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_{Q_o} \cdot Q_o \cos[2\pi(v_o + v_i)t], \quad (4.1.9)$$

La expresión 4.1.6, puede ser interpretada como el momento dipolar inducido en las moléculas oscilando a tres frecuencias v_o , $v_o - v_i$ y $v_o + v_i$, la proveniente de la dispersión Rayleigh, la dispersión Raman Stokes y anti-Stokes respectivamente. Con esta interpretación, se observa que la dispersión Raman está directamente involucrada en una variación de la polarizabilidad $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)$ durante la vibración, así como la frecuencia externa v_o es modulada por la frecuencia vibracional del enlace v_i .

En términos de la frecuencia, la información en el espectro Raman Stokes y Anti-Stokes esta duplicada, en cuanto que las intensidades de las líneas son muy diferentes y están en relación con las poblaciones de los niveles implicados en el tránsito, tal como se expresa en la ecuación 4.1.10. Esta proporcionalidad depende de las moléculas que se encuentran en un nivel excitado N_m respecto al número de moléculas en un estado inferior N_n . Si se considera la temperatura ambiente o cerca

de ella y se define a ΔE como la energía de tránsito, se observa que la transición Stokes inicia desde el estado N_n y finaliza en un estado vibracional N_m , mientras que la transición Anti-Stokes se inicia en N_m y finaliza en N_n . Por consiguiente las bandas Raman Stokes tienen mayor probabilidad de ocurrencia y por lo tanto serán más intensas, razón por la que solamente se utilizan las líneas Sctokes para estudiar los espectros Raman¹¹³.

$$\frac{N_m}{N_n} = \frac{g_m}{g_n} e^{-\frac{\Delta E}{kt}} \quad (4.1.10)$$

En la expresión 4.1.6, g_m y g_n son las posibles degeneraciones de los niveles de energía. Como la intensidad de la luz emitida es el cuadrado de la amplitud del campo eléctrico se da una dependencia con la cuarta potencia de la frecuencia en las intensidades Raman dispersadas, esta relación es dada por:

$$\frac{I_{Anti-Stokes}}{I_{Stokes}} = \frac{(v_o+v_i)^4}{(v_o-v_i)^4} \frac{g_{final}}{g_{inicial}} e^{\frac{\Delta E}{kt}} \quad (4.1.11)$$

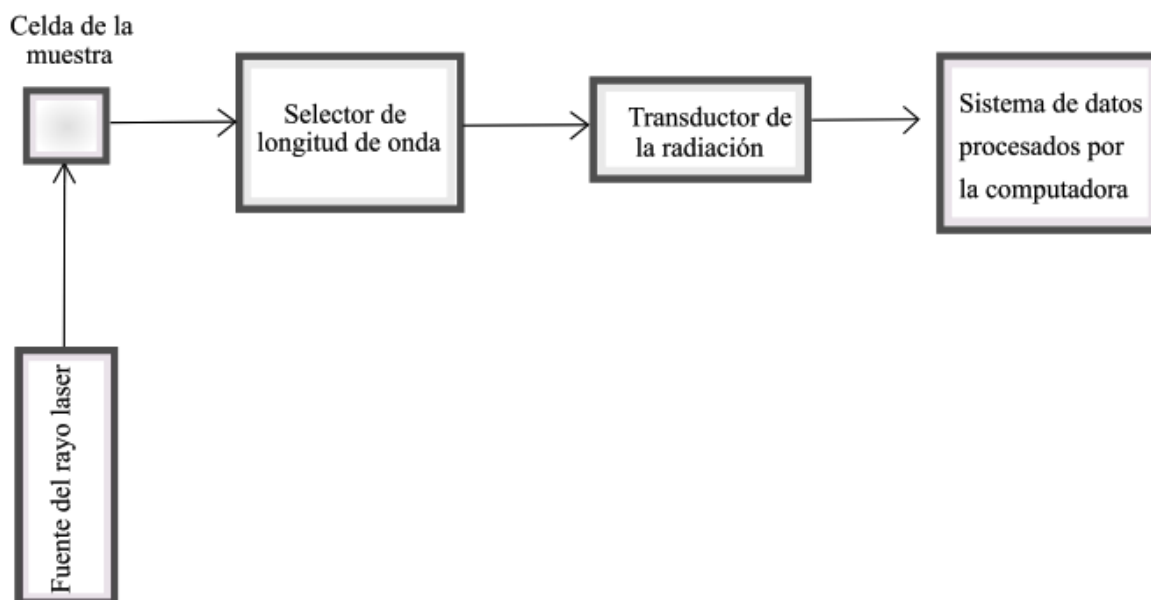
En esta expresión, v_o y v_i son las frecuencias incidente y dispersada, respectivamente.

De forma experimental, las intensidades representadas por la ecuación 4.1.11, son medidas utilizando una instrumentación que consta fundamentalmente de tres componentes: Una fuente de radiación de rayo láser (infrarrojo, en el visible o en ultra violeta) dirigida hacia la celda de la muestra, un selector de longitud de onda que aísla la región del espectro deseada, generalmente ubicado a 90 grados de la radiación incidente para evitar ver la fuente de radiación y un transductor que

¹¹³ Ibíd.

convierte la señal Raman en una señal eléctrica que es procesada mediante el sistema de datos de la computadora, este arreglo se representa en la figura 4.1.1.

Figura 4. Representación general de la instrumentación utilizada por la espectroscopia Raman.



Fuente: REQUENA RODRÍGUEZ, Alberto y ZÚÑIGA ROMÁN, José. Espectroscopia. Madrid: Pearson/Prentice Hall, 2004.

La representación gráfica que se obtiene en este experimento se presenta en la figura 4.1.2, en esta se esbozan las bandas Raman Stockes, AntiStockes relacionadas con el efecto Raman y la señal dispersada Rayleigh en el centro. Esta gráfica puede interpretarse como el número de fotones captados en el proceso de dispersión en función de la frecuencia (una magnitud conocida habitualmente como: cuentas), esta se conoce como espectro Raman¹¹⁴. Generalmente, esta medida de intensidad se presenta en función del número de onda normalizado en cm^{-1} , en vez

¹¹⁴ FERRER ESPINILLA, Perla. Una contribución a la investigación de la espectroscopia Raman en el análisis de pigmentos: resultados teóricos y experimentales. 2014. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

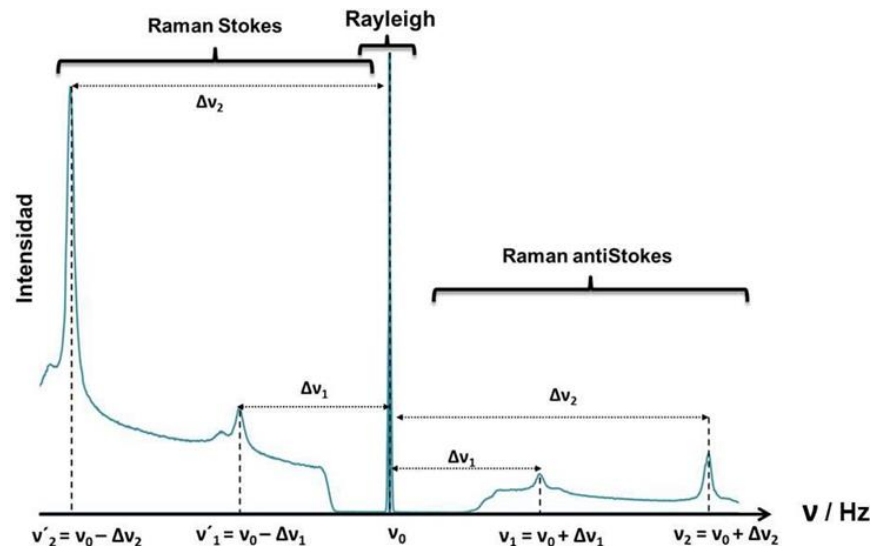
de la frecuencia Raman absoluta expresada en Hz. El número de onda normalizado para la región bespectral Stokes y AntiStokes viene definido como:

$$\hat{\nu}_{Stokes} = \frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda_o}, \quad (4.1.12)$$

$$\hat{\nu}_{AntiStokes} = \frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda_o}, \quad (4.1.13)$$

Donde λ_i y λ_o son las longitudes de onda de la luz incidente y de la luz dispersada Raman. Es importante resaltar que estos desplazamientos en número de onda son independientes de la onda incidente, por lo que la luz Rayleigh dispersada aparece como origen en las abscisas y se mostrará el valor obtenido por la diferencia en número de onda¹¹⁵.

Figura 5. Representación del espectro Raman Stokes y antiStokes.



Fuente: FERRER ESPINILLA, Perla. Una contribución a la investigación de la espectroscopia Raman en el análisis de pigmentos: resultados teóricos y experimentales. 2014. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

¹¹⁵ REQUENA RODRÍGUEZ, Alberto y ZÚÑIGA ROMÁN, José. Espectroscopia. Madrid: Pearson/Prentice Hall, 2004.

Ventajas y limitaciones experimentales

La técnica Raman tiene las siguientes ventajas: a) la luz láser en el infrarrojo no altera ni daña los tejidos (permite el control de la potencia del láser); b) un alto poder de especificidad molecular (como una huella digital del compuesto que se está analizando); c) una elevada reproducibilidad; d) estudiar muestras sólidas, líquidas y gaseosas; e) no necesita una preparación especial de la muestra; f) la luz láser y la luz dispersada Raman pueden transmitirse por fibras ópticas a largas distancias para un análisis remoto; y g) la combinación de la espectroscopia Raman con tecnologías ópticas como el microscopio, le permitió a esta técnica entrar en varios campos, como la medicina, electrónica, nanotecnología y análisis de obras de arte, entre otros^{116, 117, 118}.

Entre las desventajas podrían nombrarse: a) la baja intensidad del efecto Raman y la fluorescencia generada por algunos pigmentos colocados sobre las muestras; b) limitaciones instrumentales, por ejemplo, las aberraciones cromáticas, estas podrían bajar la sensibilidad del detector y provocar que bandas Raman de intensidad débil no se detecten, o que por la proximidad no se distingan; y c) el ruido, que comprende ruido shot que es inherente a la señal Raman debido a la naturaleza aleatoria de la luz (razón por la que se promedia un número elevado de espectros con el mismo tiempo de exposición), la corriente oscura que corresponde al número de electrones generados por los fotosensores que forman el detector CCD (controlado por refrigeración), el ruido térmico vinculado con los componentes electrónicos y el ruido

¹¹⁶ MANOHARAN, Ramasamy; WANG, Yang; FELD, Michael S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1996, vol. 52, no 2, p. 215-249.

¹¹⁷ BERKESI, Marta, et al. Detection of small amounts of H₂O in CO₂-rich fluid inclusions using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 2009, vol. 40, no 11, p. 1461-1463.

¹¹⁸ FOUCHER, Frédéric. Detection of Biosignatures Using Raman Spectroscopy. En *Biosignatures for Astrobiology*. Springer, Cham, 2019. p. 267-282.

cósmico (fácil de visualizar como picos con una anchura pequeña y una intensidad alta)^{119, 120, 121}.

4.2 ANTECEDENTES

La espectroscopia Raman fue empleada como una técnica analítica con la implementación del láser como fuente de excitación, esto sucedió aproximadamente entre 30 a 40 años después del descubrimiento del fenómeno Raman. Para 1970 usando luz láser en el visible, Lord y Yu midieron por primera vez cambios en el espectro Raman en las bandas de la lisozima y sus constituyentes, en el laboratorio de espectroscopia del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT)¹²². Posteriormente, para disminuir el efecto de la fluorescencia en las señales Raman sin dañar los tejidos se hizo más conveniente el uso del láser en el infrarrojo. Esto fortaleció la implementación de esta técnica para estudiar alteraciones vinculadas con el cáncer.

En el caso del cáncer de mamas se han realizado diversos estudios, entre ellos pueden mencionarse los realizados sobre tejido fijado y fresco, con clasificación normal, benigna y cáncer, en los que se identificaron diferencias en relación a las bandas Raman vinculadas con los lípidos, grasas, carotenoides, colágeno y algunas proteínas^{123, 124, 125} [95]. Se ha propuesto como una posible técnica con una sensibilidad del 88 % y especificidad del 93 %, para encontrar diferencias en la

¹¹⁹ MANOHARAN, Ramasamy; WANG, Yang; FELD, Michael S. Op. Cit.

¹²⁰ BERKESI, Marta, et al. Op. Cit.

¹²¹ FOUCHER, Frédéric. Op. Cit.

¹²² LORD, R.; YU, Nai-Teng. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: II. Native ribonuclease and α -chymotrypsin. *Journal of molecular biology*, 1970, vol. 51, no 2, pp. 203-213.

¹²³ REDD, Douglas, et al. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, p. 787-791.

¹²⁴ FRANK, Christopher J.; MCCREERY, Richard L.; REDD, Douglas CB. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Analytical chemistry*, 1995, vol. 67, no 5, p. 777-783.

¹²⁵ SMITH, J., et al. Raman spectral mapping in the assessment of axillary lymph nodes in breast cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2003, vol. 2, no 4, pp. 327-331.

estructura química de microcalcificaciones mamarias formadas dentro de los conductos, de tipo I (dihidrato de oxalato de calcio) benignas y tipo II (hidroxiapatita cálcica) benignas o malignas¹²⁶. Para hallar diferencias en los tejidos mamarios, Shafer propuso un ajuste lineal de señales Raman provenientes de las células del citoplasma, núcleo, grasa, betacarotenos, colágeno, dihidrato de oxalato de calcio, hidroxiapatita cálcica, colesterol y agua, los resultados evidenciaron que el tejido mamario normal es predominante en grasa, bajo en colágeno y en señales de las células del citoplasma¹²⁷, posteriormente un ajuste más sencillo basado en cambios en la grasa y el colágeno en el tejido mamario permitió estudiar 130 espectros con una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 96%¹²⁸.

Dentro de los resultados más sobresalientes está el presentado por Abigail Haka y colaboradores en 2006, en este trabajo midieron 31 espectros Raman in vivo en 9 mujeres con mastectomía parcial, estos permitieron la detección de un cáncer de mama extremadamente invisible que tras revisión patológica requirió una segunda intervención¹²⁹. Para el año 2007, los diversos grupos de espectroscopia Raman en el mundo lograron identificar las huellas moleculares del tejido normal, el trabajo de construir una posible base de datos fue realizado por Zayar, Shazza y Ihtesham¹³⁰.

¹²⁶ HAKA, Abigail S., et al. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer research*, 2002, vol. 62, no 18, p. 5375-5380.

¹²⁷ SHAFER-PELTIER, Karen E., et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2002, vol. 33, no 7, p. 552-563.

¹²⁸ HAKA, Abigail S., et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 35, p. 12371-12376.

¹²⁹ HAKA, Abigail S., et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer research*, 2006, vol. 66, no 6, pp. 3317-3322.

¹³⁰ MOVASAGHI, Zayar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, vol. 42, no 5, p. 493-541.

Estos resultados están en concordancia con las señales Raman medidas en el tejido mamario normal y sus respectivos cambios con el avance del cáncer^{131, 132, 133, 134, 135}.

Las bandas Raman de preferencia para observar cambios en los tejidos son en el intervalo de número de onda entre $(400 - 2000\text{cm}^{-1})$. En esta banda, las regiones de interés están dominadas por señales de carbohidratos $(470 - 1200\text{cm}^{-1})$, grupos fosfatos de ADN $(980, 1080, 1240\text{cm}^{-1})$ y vibraciones de enlace de proteínas $(1500 - 1700\text{cm}^{-1})$ ¹³⁶.

La espectroscopia Raman para proteínas ha asociado las bandas más características con el grupo *CONH* al que se le denominó amida A (para el estiramiento del grupo NH en aproximadamente 3500cm^{-1}), amida B (estiramiento del grupo NH cercano a 3100cm^{-1}) y amidas I hasta VII (I: $1600 - 1690\text{cm}^{-1}$, II: $1480 - 1580\text{cm}^{-1}$, III: $1230 - 1300\text{cm}^{-1}$, IV: $625 - 700\text{cm}^{-1}$, V: $640 - 800\text{cm}^{-1}$, VI: $540 - 600\text{cm}^{-1}$ y VII: 200cm^{-1}). De aquí se desprende la identificación de diferentes estructuras proteínicas: amida I (vibración por estiramiento de $\text{C}=\text{O}$), amida II y amida III (estiramiento del enlace $\text{C}-\text{N}$ y las vibraciones por doblamiento del enlace $\text{N}-\text{H}$), amida IV (doblamiento OCN), amida V (doblamiento fuera del plano de $\text{C}=\text{O}$) y amida VII (modo esquelético del péptido). De la estructura secundaria se encuentran las proteínas con estructura hélice- α y lámina- β , sus correspondientes bandas Raman son: $1662 - 1655$ y $1272 - 1264\text{cm}^{-1}$ (α), 1672

¹³¹ ELLIS, David I.; GOODACRE, Royston. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*, 2006, vol. 131, no 8, p. 875-885.

¹³² PICHARDO-MOLINA, J. L., et al. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers in medical science*, 2007, vol. 22, no 4, p. 229-236.

¹³³ HAKA, Abigail S., et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *Journal of biomedical optics*, 2009, vol. 14, no 5, pp. 54-23.

¹³⁴ ABRAMCZYK, Halina, et al. Raman 'optical biopsy' of human breast cancer. [Online]. *Progress in biophysics and molecular biology*, 2012, vol. 108, no 1-2, p. 74-81. Disable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610711001623>.

¹³⁵ BUTLER, John Alfred Valentine; NOBLE, D. (ed.). *Progress in biophysics and molecular biology*. Elsevier, 2014.

¹³⁶ LI, Qingbo; GAO, Qishuo; ZHANG, Guangjun. Classification for breast cancer diagnosis with Raman spectroscopy. *Biomedical optics express*, 2014, vol. 5, no 7, p. 2435-2445.

– 1674 y 1242 – 1227 cm^{-1} (β), respectivamente, para los modos de amida I y amida III¹³⁷.

Dado que las bandas Raman son una huella dactilar de los tejidos, se espera que las muestras obtenidas por el procedimiento convencional de histología contengan señales Raman de la parafina, hematoxilina y eosina. La presencia de la parafina fue abordada por Tfayli, quien propuso un método digital para eliminar las señales provenientes de este componente¹³⁸. Las bandas Raman correspondientes a la hematoxilina y eosina fueron medidas experimentalmente, verificando que estas no pueden considerarse como una combinación lineal del espectro Raman del tejido, pero que es posible con el conocimiento a priori de las mismas, identificar las señales correspondientes de la muestra biológica¹³⁹.

Estudiar muestras almacenadas en los bancos de tejidos con espectroscopia Raman es una oportunidad para explorar los cambios vinculados con cualquier tipo de cáncer, porque no altera ni daña las muestras biológicas, se conoce el diagnóstico histopatológico y no se involucran pacientes para toma de medidas. Un aspecto crucial en cuanto al análisis de los espectros Raman es el sustrato de preferencia para montar los tejidos, el cual por conveniencia económica y práctica siempre es montado en un porta-muestras de vidrio. Este material tiene una banda muy ancha alrededor de los $(1000 - 1800\text{cm}^{-1})$ ¹⁴⁰ [124], así que generalmente se opta por cambiar el sustrato a materiales que no contribuyan en señales Raman a la región de interés como el fluoruro de calcio CaF_2 o fluoruro de bario CaB_2 , estos en comparación con el vidrio no contribuyen a

¹³⁷ BUTLER, Holly J., et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. [Online]. Nature protocols, 2016, vol. 11, no 4, p. 664. Disable: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>.

¹³⁸ TFAYLI, Ali, et al. Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies. Applied spectroscopy, 2009, vol. 63, no 5, p. 564-570.

¹³⁹ ORTIZ DORSAL, Luis Carlos. Identificación no-invasiva de sustancias biológicas por medio de espectroscopia Raman. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2014.

¹⁴⁰ CINTA PINZARU, Simona y ANDRONIE, Luisa. Raman Spectroscopy of the Hematoxylin-Eosin Stained Tissue. Pro Environment / ProMediu. 2015. pp. 590-12.

la región de interés pero tienen un valor monetario bastante elevado y no son de uso común en los bancos de tejidos¹⁴¹.

Pocos estudios hasta el momento han medido el efecto de campo carcinogénico en el tejido intacto, entre ellos la técnica óptica propuesta por el grupo de Vadim Backman para medir alteraciones a más de 10cm de distancia del tumor primario¹⁴². En cuanto a la espectroscopia Raman está ha permitido detectar el efecto de campo carcinogénico en tejido cervical, piel y cavidad oral^{143, 144, 145}, pero no en tejido mamario, evidenciando la necesidad de estudiar el tejido normal circundante al tejido cancerígeno en el tiempo y de forma espacial, de hecho esta técnica se ha utilizado para seguir los cambios relacionados con la quimioterapia^{146, 147}.

Con base a todas las características de la espectroscopia Raman para identificar cambios en los tejidos, en esta parte de la investigación se estudiaron alteraciones espaciales en tejido mamario vinculadas con el efecto de campo carcinogénico, estas muestras estaban almacenadas en bancos de tejidos, montadas en porta muestras de vidrio, embebidas en parafina y con tinción de

¹⁴¹ KAMEMOTO, Lori E., et al. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. *Applied spectroscopy*, 2010, vol. 64, no 3, pp. 255-261.

¹⁴² FULLWOOD, Leanne M., et al. Effect of substrate choice and tissue type on tissue preparation for spectral histopathology by Raman microspectroscopy. [Online]. *Analyst*, 2014, vol. 139, no 2, p. 446-454. Disable: <http://dx.doi.org/10.1039/C3AN01832F>.

¹⁴³ ROY, Hemant K., et al. Spectroscopic microvascular blood detection from the endoscopically normal colonic mucosa: biomarker for neoplasia risk. [Online]. *Gastroenterology*, 2008, vol. 135, no 4, p. 1069-1078. Disable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508011001>.

¹⁴⁴ KELLER, Matthew D., et al. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. [Online]. *Disease markers*, 2008, vol. 25, no 6, p. 323-337. Disable: <http://europepmc.org/articles/PMC2756505>.

¹⁴⁵ LIEBER, Chad, NETHERCOTT, Hubert, y KABEER, Mustafa. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. [Online]. *Biomed. Opt. Ex- press*, 1(3):975–982, Oct 2010. Disable: <http://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-1-3-975>.

¹⁴⁶ ABRAMCZYK, Halina, et al. Raman 'optical biopsy' of human breast cancer. [Online]. *Progress in biophysics and molecular biology*, 2012, vol. 108, no 1-2, p. 74-81. Disable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610711001623>.

¹⁴⁷ SINGH, S, et al. In vivo Raman spectroscopy of oral buccal mucosa: a study on malignancy associated changes (MAC)/cancer field effects (CFE). *Analyst*, 138(14). 2013. pp. 4175– 4182.

hematoxilina y eosina. Esta etapa de la investigación buscó ampliar el conocimiento de este efecto en el cáncer de mamas, así que se propuso una metodología orientada primero a encontrar las condiciones experimentales para eliminar la señal predominante del vidrio, segundo a obtener todos los espectros Raman de los componentes usados en el método de parafinado de las muestras, así como el espectro de la parafina, hematoxilina y eosina, tercero a identificar las bandas Raman de las muestras y cuarto a estudiar alteraciones espaciales en dos muestras con condiciones específicas para comprobar el efecto de campo carcinogénico.

4.3 METODOLOGÍA

En esta parte de la investigación se propuso una metodología que permitió primero obtener los espectros Raman de tejido cancerígeno y tejido normal circundante al mismo y segundo vincular los cambios bioquímicos con el efecto de campo carcinogénico. Se usó el protocolo propuesto por Holly J Butler¹⁴⁸ [121], para estudiar muestras biológicas con espectroscopia Raman. Se utilizó microscopia Raman espontánea, se usaron tejidos fijados y montados en sustrato de vidrio, el modo de adquisición de los espectros fue puntual, esto implicó elegir unas condiciones experimentales para controlar parámetros como potencia del láser, tiempo de exposición y número de acumulaciones, sumado a estos se incluyó la eliminación del cubre objetos, se eligió un método de procesamiento de los datos que permitió eliminar la línea base y se realizó una normalización de los datos.

¹⁴⁸ Ibid.

Preparación de muestras

Las muestras de tejido mamario fueron adquiridas, procesadas y almacenadas en los departamentos de patología de la Universidad Autónoma de Bucaramanga y la Universidad Industrial de Santander, bajo la dirección de la médica Claudia Janeth Uribe Pérez y la doctora Olga Mercedes Álvarez Ojeda, respectivamente. El tejido mamario después de ser extraído fue sometido a un procedimiento estándar en el que utilizaron componentes químicos como el xilol, etanol, alcohol ácido (etanol en solución al 1% de ácido clorhídrico), n-propanol y parafina. En este proceso se deshidrata el tejido mediante alcoholes, luego se pasa a un medio miscible en el alcohol y en parafina y por último se incluye la parafina. Después de este proceso es cortado con micrótopo y ubicado sobre un porta muestra de vidrio, se realiza la tinción con eosina y hematoxilina y finalmente se cubre con una lámina de vidrio.

Figura 6. Demarcación histopatológica sobre las muestras de tejido mamario. Área encerrada en negro cáncer, en azul tejido circundante normal.



Tabla 1. Descripción patológica de las muestras para los pacientes P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7.

Paciente	Departamento de patología	Diagnóstico
P1	UNAB	Tejido mamario sin inflamación
P2	UNAB	Tejido mamario adiposo cancerígeno
P3	UNAB	Tejido mamario adiposo con inflamación
P4	UNAB	Tejido mamario conectivo inflamatorio
P5A	UIS	Tejido mamario (sin tipo específico), mama derecha A: Tejido mamario con lesión tumoral maligna
P6A2	UIS	Tejido mamario (sin tipo específico) mama derecha sub tipo carcinoma con características medulares. A2: tumor maligno de origen epitelial
P6D	UIS	D: Piel de pezón y areola
P7A1	UIS	Tejido mamario (mama derecha) sin tipo específico.
P7A2	UIS	A1-A3: viable en un 80-90 %, cambios de origen epitelial
P7A3	UIS	A1-A3: viable en un 80-90 %, cambios de origen epitelial
P7B	UIS	B: Borde de sección profundo ubicado a 1.2 mm de la lesión

Para este estudio se recibieron 11 muestras que corresponden a siete pacientes diferentes, la descripción y el diagnostico se encuentran en la tabla 3.1. Todas las muestras fueron examinadas y marcadas previamente por patología, en estas se ubicó en negro la zona cancerígena y en azul la zona normal, ver figura 3.3.1. Posteriormente, se retiró el cubre objetos de vidrio de un tamaño aproximado de 20µm de espesor y se verificó la demarcación de las zonas. Se prepararon las muestras de xilol, etanol, n-propanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina, eosina y vidrio. Las muestras sólidas fueron ubicadas en porta muestras de vidrio y se acondicionó un porta muestras de aluminio con concavidades para depositar los líquidos. Para la hematoxilina y eosina se esperó 24 horas de secado.

Condiciones experimentales

Se usó un micro-Raman Confocal Labram HR Evolution (Horiba Jobin Yvon), con un láser en el infrarrojo de 785nm , objetivo de enfoque de 100X y apertura numérica A.N de 0.9, con una resolución espacial de $1\mu\text{m}$ del instrumento de medición, una resolución instrumental de 1cm^{-1} , monocromador de 600lineas/mm , 10 acumulaciones para cada espectro y 90 segundos de tiempo de adquisición. La potencia nominal del láser utilizado en el experimento es de 25mW, que por su repetidas reflexiones en la fibra óptica que transmite la radiación hacia el cabezal del equipo, la potencia nominal se reduce a valores entre 2-4mW; esto implica una potencia media menor a 4 mW. Potencias medias menores a 50 mW se utilizan en fisioterapia para tratamientos, dado que a dichas potencias de radiación no se produce daño al tejido y se mantienen sus características^{149, 150} [131, 132]. Cuando el tejido está montado en parafina este valor de potencia puede ser un poco más alto, pero en cualquiera de los dos casos, la potencia con la cual se irradió la muestra es mucho menor a la que produce cambios en la misma. Se midieron los espectros en el rango de número de onda entre $200\text{-}1800\text{cm}^{-1}$. Para los componentes líquidos por su volatilidad se trabajó con 1 acumulación.

Toma de espectros Raman

Las condiciones experimentales mencionadas anteriormente fueron exploradas en el laboratorio, estas pueden cambiar dependiendo de la muestra biológica usada, en este caso todos los parámetros se mantuvieron constantes en la medición de los espectros Raman. En el caso de las muestras biológicas las mediciones se hicieron dentro de las zonas fijadas como cáncer y normal. Se utilizó el método de triplicado, midiendo en puntos muy cercanos. Para la identificación de bandas Raman

¹⁴⁹ DEPCIUCH, Joanna, et al. Application of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer. *Applied spectroscopy*, 2016, vol. 70, no 2, p. 251-263.

¹⁵⁰ FRANGIONI, John V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology*, 2003, vol. 7, no 5, p. 626-634.

vinculadas con cáncer y tejido normal circundante en total se midieron 66 espectros más 9 espectros de los componentes adicionales xilol, etanol, n-propanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina.

Para explorar las alteraciones bioquímicas vinculadas con el efecto de campo carcinogénico se eligieron dos muestras, la 5138-D y 3772-12A2, que corresponden a P6D y P7A2, respectivamente. Por diagnóstico histopatológico la primera exhibe una zona normal grande y una pequeña zona cancerígena, mientras que la segunda es mayoritariamente cáncer con una pequeña zona normal. Para la toma de datos por muestra se midieron 8 espectros en los puntos indicados en patología, en la línea que conduce de cáncer a normal, ver figura 3.3.2. Estos puntos se midieron cada $45\mu\text{m}$, distancia que es aproximadamente 40 veces mayor que la resolución espacial de $1\mu\text{m}$, lo que indica que los puntos elegidos no se superponen.

Procesamiento de datos

El software elegido para elaborar los códigos computacionales para el procesamiento de datos fue Python. La corrección de línea base se hizo con el método denominado suavizado de línea base por mínimos cuadrados asimétricos¹⁵¹, en este algoritmo se ajustan dos parámetros que se mantuvieron constantes para analizar todos los espectros medidos, posteriormente se realizó la normalización de los datos.

¹⁵¹ Ibid.

Figura 7. Muestras 5138-D y 3772-17A2 de tejido mamario. El mapeo espacial se hizo desde la zona de cáncer hacia la zona normal, los asteriscos en rojo indican los puntos en los que se adquirieron los espectros Raman.



4.4 IDENTIFICACIÓN DE PICOS RAMAN

Se planteó identificar diferencias o similitudes entre los espectros tomados en la zona cancerígena y la zona circundante normal, en las muestras de tejido. Para vincular los picos Raman concernientes al tejido mamario se midieron los espectros Raman de todos los posibles componentes que podrían solapar las señales del

mismo. Para estos espectros y los de tejido mamario se aplicó una corrección de línea base bajo los parámetros ($P = 0.001$ y $\lambda = 100$) estimados por el método de Paul y Hans [133], y se realizó una normalización vectorial a unidad del tipo $I - I_{min}/I_{max} - I_{min}$, así los espectros comparten el mismo rango de intensidades reduciendo la variabilidad de la intensidad con respecto a la fuente de excitación. Los espectros Raman en bruto y con la corrección de línea base para los componentes xilol, n-propanol, etanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina se adjuntan en el anexo 6.1, ver figuras 6.1.1 y 6.1.2.

Las líneas Raman más sobresalientes para estos compuestos se presentan en la tabla 3.2. Esta se encuentra organizada en doce bandas o picos Raman, dentro del intervalo de interés $600 - 1800\text{cm}^{-1}$. En la literatura científica las líneas Raman medidas para estos compuestos, se resumen en la tabla 3.3, esta fue organizada también por picos Raman.

Al comparar las tablas 3.2 y 3.3, se observa que la mayoría de los componentes contienen líneas Raman que están en concordancia con los reportados por otros autores, con excepción del n-propanol, el cual contiene picos Raman que distan a más de 6cm^{-1} ¹⁵². En cuanto al etanol y el alcohol ácido, los espectros Raman y las líneas Raman son similares y están en concordancia con los reportados por Hana Vavskova y Christos Pappas^{153, 154}. De todas las líneas Raman identificadas para el xilol (18 líneas), resina (15 líneas) y

¹⁵² EILERS, Paul HC; BOELEN, Hans FM. Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. Leiden University Medical Centre Report, 2005, vol. 1, no 1, p. 5.

¹⁵³ SOBOCINSKI, Raymond L.; PEMBERTON, Jeanne E. Determination of alcohol solvent orientation and bonding at silver electrodes using surface-enhanced Raman scattering: methanol, ethanol, 1-propanol, and 1-pentanol. Langmuir, 1992, vol. 8, no 8, pp. 2049-2063.

¹⁵⁴ VASKOVA, H. Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. Int. J. Biol. & Biomed. Eng, 2014, vol. 8, pp. 27-34.

eosina (12 líneas) se verificaron para xilol (14 líneas)^{155,156}, resina (6 líneas)¹⁵⁷ y eosina (6 líneas)¹⁵⁸. Los corrimientos encontrados de un autor a otro, podrían estar relacionados con la calibración del sistema de adquisición de datos. El espectro Raman de la hematoxilina bajo los parámetros de medición utilizados es dominado fuertemente por el fenómeno de fluorescencia, así que se seleccionaron cuatro líneas Raman que fueron comparadas con los espectros reportados por Cinta Pinzaru¹⁵⁹, quienes presentan el espectro pero no valores específicos. De allí se identificó notoriamente la banda 978 cm^{-1} , las demás quedan sujetas a verificación.

Tabla 2. Líneas Raman identificadas para el xilol, n-propanol, etanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina entre los rangos de picos Raman de $600 - 1800\text{cm}^{-1}$.

Picos Raman cm^{-1}	Xilol cm^{-1}	n-propanol cm^{-1}	Etanol cm^{-1}	Alcohol ácido cm^{-1}	Parafina cm^{-1}	Resina cm^{-1}	Hematoxilina cm^{-1}	Eosina cm^{-1}
(620-645)	620,13 644,46							643,43
(710-766)	723,75 733,30					726,11 765,962		710,41
(767-858)	767,82					807,46 827,388		778,09
(879-1022)	827,32 999,58	883,60	880,89	879,46	889,60		978,803	1021,40

¹⁵⁵ PAPPAS, Christos, et al. Evaluation of a Raman spectroscopic method for the determination of alcohol content in Greek spirit Tsipouro. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 2016, vol. 4, no Special Issue Nutrition in Conference October 2016, pp. 01-09.

¹⁵⁶ MIAN, Salman A., et al. Development of a dewaxing protocol for tissue-engineered models of the oral mucosa used for Raman spectroscopic analysis. Applied Spectroscopy Reviews, 2014, vol. 49, no 8, pp. 614-617.

¹⁵⁷ PUERTO, M.; and BALZARETTI, N. Raman and infrared vibrational modes of tricosane paraffin under high pressure. Vibrational Spectroscopy, 2014, vol. 75, p. 93-100.

¹⁵⁸ RUEDA, Mesa, et al. Caracterización de los monómeros DGEBA y TMAB, y seguimiento de la reacción de entrecruzamiento por espectroscopia Raman. Ingeniare. Revista chilena de ingeniería, 2013, vol. 21, no 3, pp. 414-423.

¹⁵⁹ ORTIZ DORSAL, Luis Carlos. Identificación no-invasiva de sustancias biológicas por medio de espectroscopia Raman. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2014.

Picos Raman cm^{-1}	Xilol cm^{-1}	n-propanol cm^{-1}	Etanol cm^{-1}	Alcohol ácido cm^{-1}	Parafina cm^{-1}	Resina cm^{-1}	Hematoxilina cm^{-1}	Eosina cm^{-1}
(1030-1059)	1030,44	1046,23	1047,63	1044,84		1031,59		1058,18
(1062-1093)	1051,37 1092	1095,93	1091,28	1083,68	1062,29			1091,56
(1095-1169)	1169,03				1132,92		1166,97	
(1171-1223)	1202,79 1222,77				1171,01	1172,73		1175,77
						1202,59		1207,47
(1247-1296)	1247,90 1283,01	1266,69 1292,31	1269,68	1269,02	1295,51	1249,08		1279,63
(1324-1394)	1376,61				1368,29	1375,25	1342,79	1338,19
(1417-1590)	1590,13	1450,60	1453,10/1482,91	1450,1	1417,27 1439,86 1463,27	1448,98	1437,95	1498
(1611-1660)	1611,32					1611,00 1660,80		1620,65

Tabla 3. Líneas Raman reportadas en la literatura para el xilol, n-propanol, etanol, alcohol ácido, parafina, resina, hematoxilina y eosina, entre los rangos de picos Raman de 600 – 1800 cm^{-1} .

Picos Raman cm^{-1}	Xilol cm^{-1} [123, 141]	n-propanol cm^{-1} [134]	Etanol cm^{-1} [135, 136]	Alcohol ácido cm^{-1} [135, 136]	Parafina cm^{-1} [137, 138]	Resina cm^{-1} [139]	Eosina cm^{-1} [140]
(620-645)	645						647
(710-766)	721 734						736
(767-858)	726 776					803 822 837 858	
(879-1022)	828 984 999	861 889 970	880 883 884	880 883	888	917	1013
(1030-1059)	1035 1051		1049 1052	1049 1052	1063		1070
(1062-1093)		1068 1072	1063 1089	1089			1093
(1095-1169)	1168	1105	1097	1097	1133		
(1171-1223)	1202				1172	1180	1177

Picos Raman cm^{-1}	Xilol cm^{-1} [123, 141]	n-propanol cm^{-1} [134]	Etanol cm^{-1} [135, 136]	Alcohol ácido cm^{-1} [135, 136]	Parafina cm^{-1} [137, 138]	Resina cm^{-1} [139]	Eosina cm^{-1} [140]
	1221						
(1247-1296)	1249	1275/1288	1277	1277	1296	1249	1281
	1283,01					1295	
(1324-1394)	1375					1393,72	1333
	1378						
	1382						
(1417-1590)	1450		1455	1455	1421		1509
	1579		1482	1482	1441		
					1464		
(1611-1660)	1604					1608	1617
	1614					1687,64	

Para las mediciones con las muestras biológicas se ubicó la zona delimitada por patología con clasificación normal o anormal usando el objetivo 10X, posteriormente fue ampliada paulatinamente cambiando el objetivo de observación hasta 100X. En la figura 3.4.1, se presentan los resultados en bruto para la paciente P1. En esta figura se muestran las mediciones obtenidas por triplicado, es decir, en tres puntos cercanos dentro de la zona de interés, en este caso dentro de las zonas normal y cáncer. También se presenta la línea base ajustada a los espectros (línea de color verde), la cual es removida para realizar la identificación de las líneas Raman.

El proceso descrito en la figura 3.4.1, fue aplicado a todos los espectros de las once muestras, el resultado final del espectro Raman en el rango de 600 1800 cm^{-1} para todas las muestras se presenta en las figuras 3.4.2 y 3.4.3, estos resultados no tienen ajustes de suavizado. Los espectros Raman de las zonas normales están en color azul y los de las zonas denominadas cáncer en color negro.

Figura 8. Espectros Raman sobre la muestra del paciente P1. Se visualizó con el objetivo 10X la zona demarcada por patología, sobre esta área se aumentó gradualmente la amplificación hasta llegar a 100X, en esta zona se midieron los espectros en tres puntos muy cercanos. Se realizaron mediciones sobre la zona normal y cancerígena. Las líneas en color verde representan la línea base que será sustraída.

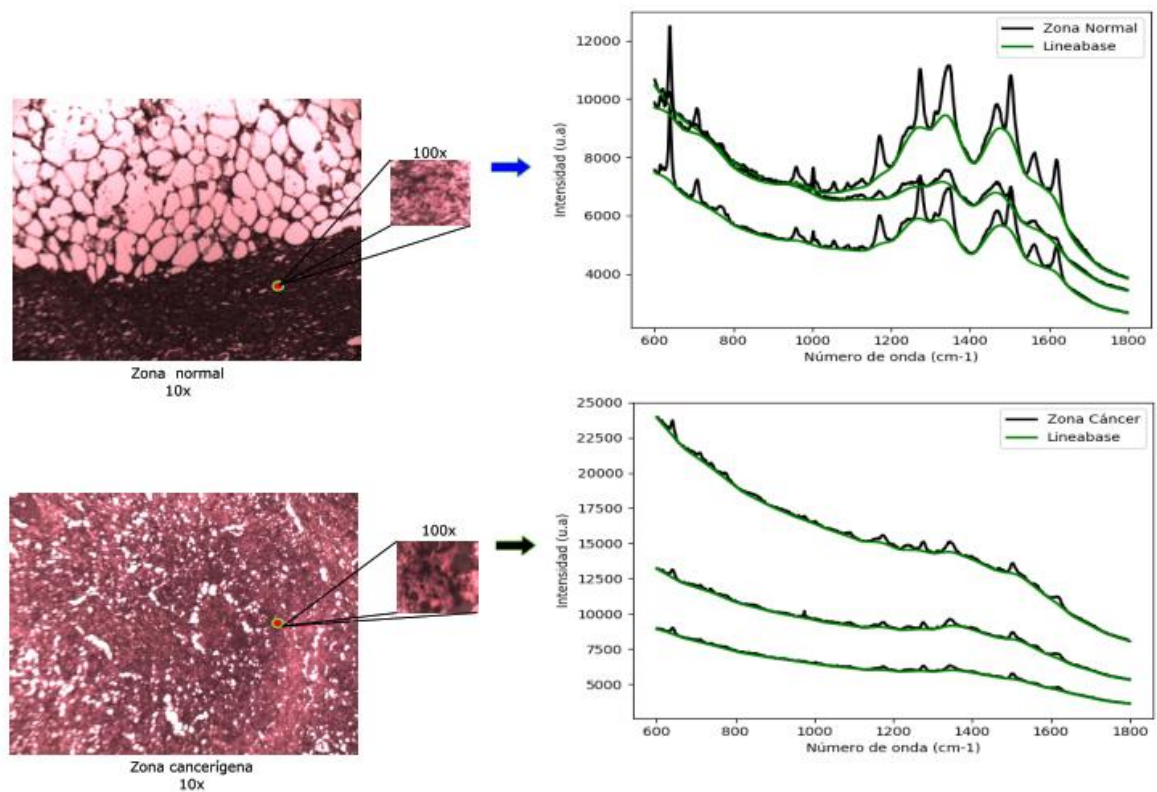


Figura 9. Espectros Raman resultantes para los pacientes: (a) P1, (b) P2, (c) P3, (d) P4, (e) P5 y (f) P6. Con clasificación cáncer (negro) y normal (azul).

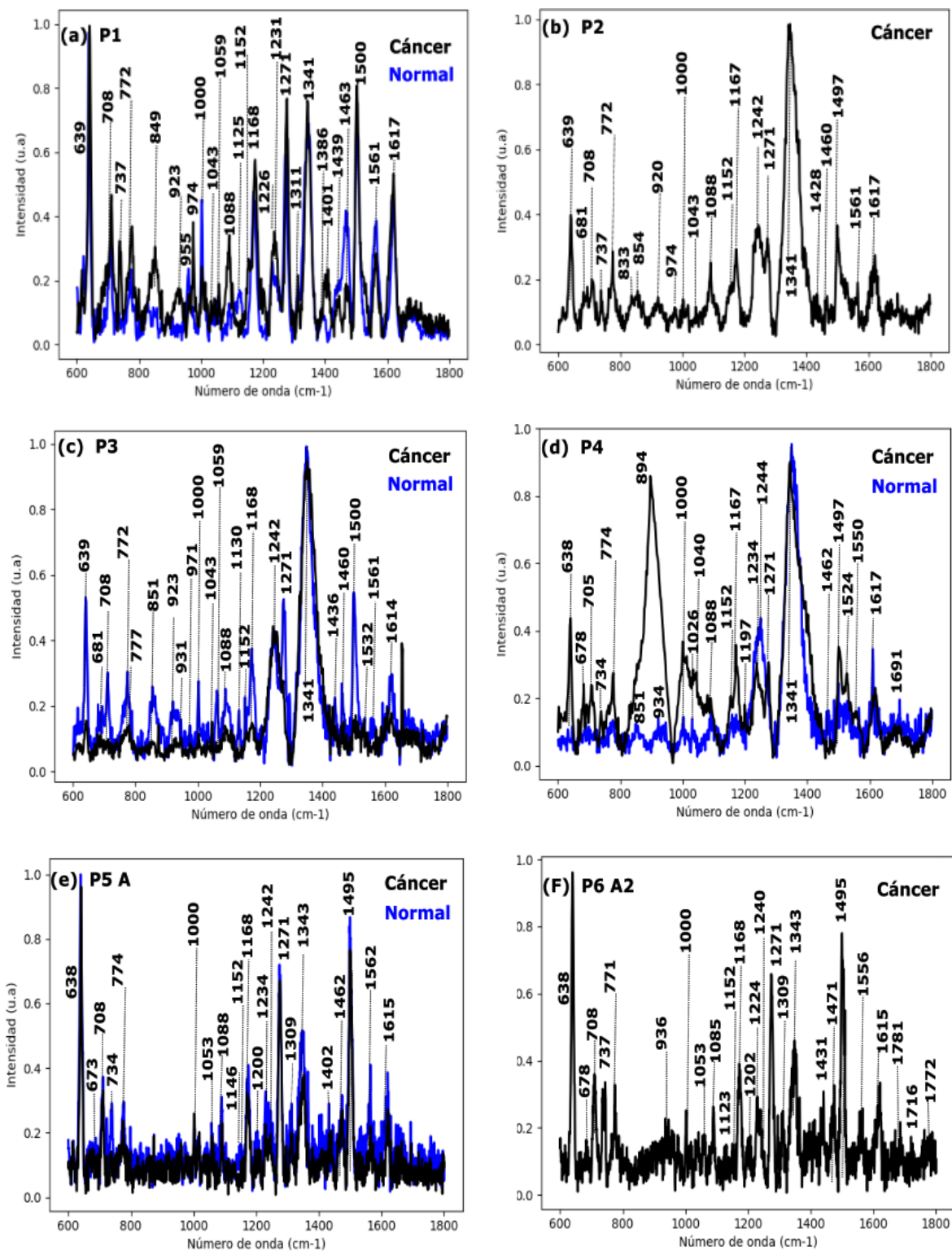
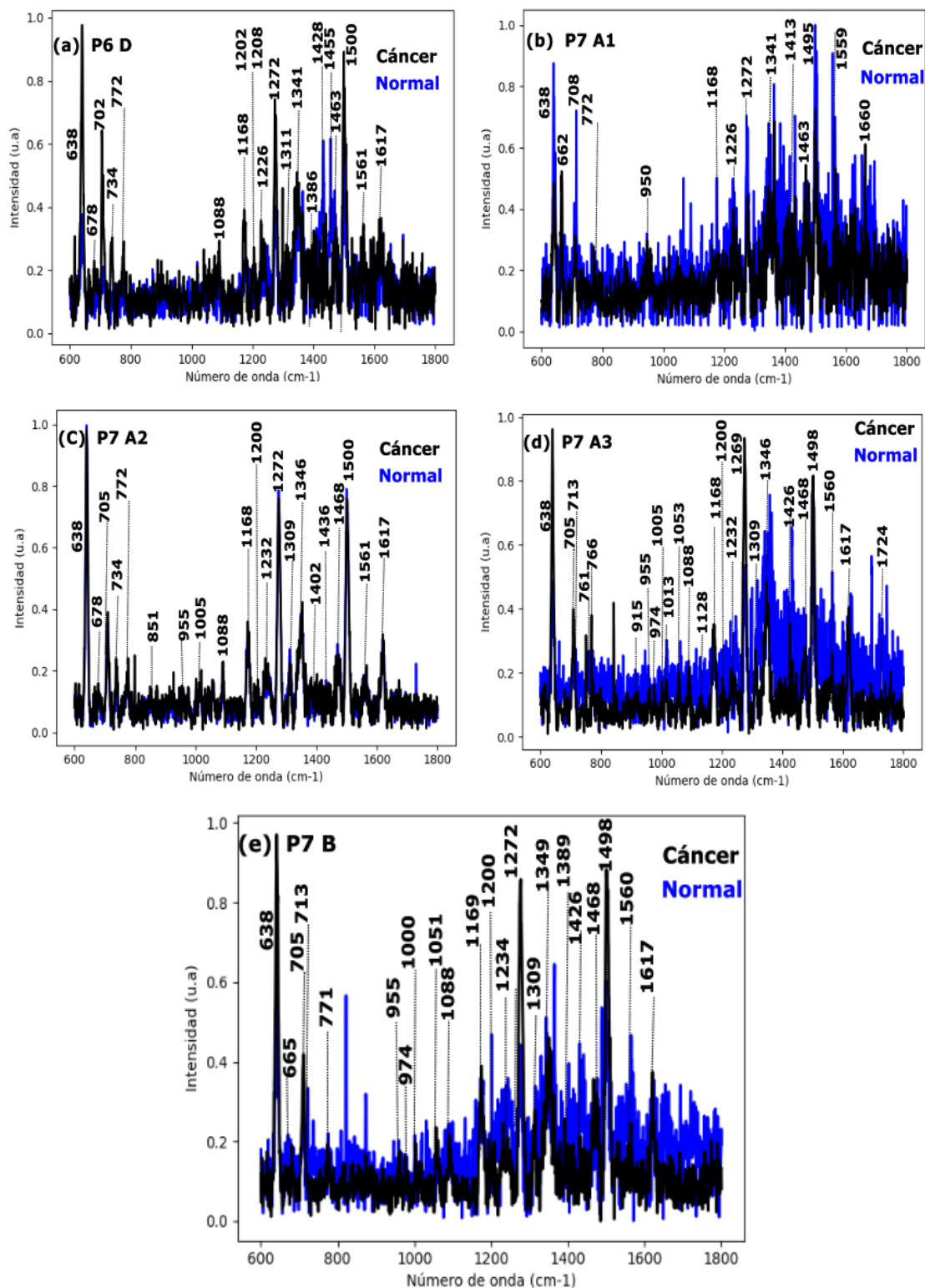


Figura 10. Espectros Raman para las muestras de tejidos: (a) P6D, (b) P7A1, (c) P7A2, (d) P7A3 y (e) P7 B. Zona cancerígena (color negro) y normal (color azul).



Para complementar los resultados obtenidos en esta investigación, se realizó una búsqueda de las bandas Raman que exhiben los tejidos mamarios normales, con Hiperplasia Ductal Atípica (HDA), Carcinoma Ductal in situ (CDIS), Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) y tejido cancerígeno^{160,161,162}, estas pueden resumirse como:

Tejido normal: 720, 727, 870, 971, 972 1064, 1066, 1079, 1119, 1125, 1265, 1300, 1303, 1441, 1654, 1656 y 1743 cm^{-1}

HDA: 719, 882, 975, 1004, 1064, 1082, 1129, 1159, 1267, 1301, 1447, 1579, 1660 y 1744 cm^{-1}

CDIS: 722, 872, 923, 970, 1007, 1086, 1125, 1156, 1266, 1301, 1439, 1526, 1656 y 1749 cm^{-1}

CDI: 722, 817, 870, 856, 876, 920, 922, 937, 972, 1004, 1007, 1043, 1064, 1081, 1124, 1125, 1159, 1167, 1206, 1247, 1267, 1301, 1303, 1343, 1441, 1450, 1526, 1554, 1656, 1657 y 1749 cm^{-1} .

Tejido cancerígeno: 640, 1524

Para los espectros presentados en las figuras 3.4.2 y 3.4.3, se identificaron las líneas Raman y se organizaron por los laboratorios de procedencia (UNAB, UIS). Aunque los datos fueron tomados de 200 – 2000 cm^{-1} , se seleccionaron los picos Raman en el rango de 600 – 1800 cm^{-1} . En esta banda se encuentran señales vinculadas con carbohidratos (600 – 1200 cm^{-1}), los grupos fosfatos de ADN (980,

¹⁶⁰ MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, vol. 42, no 5, p. 493-541.

¹⁶¹ SHARMA, Shiv K.; MISRA, Anupam K.; SHARMA, Bhavna. Portable remote Raman system for monitoring hydrocarbon, gas hydrates and explosives in the environment. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005, vol. 61, no 10, p. 2404-2412

¹⁶² FRANK, Christopher J.; MCCREERY, Richard L.; REDD, Douglas CB. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. Analytical chemistry, 1995, vol. 67, no 5, pp. 777-783

1080, 1240 cm^{-1}) y las vibraciones de enlace de proteínas (1500 – 1700 cm^{-1})¹⁶³. Las líneas Raman de todas las muestras se asignaron en concordancia con los picos espectrales de los tejidos biológicos asignados a estados normales, neoplásicos y cáncer, los compuestos implementados en la preservación de las muestras y las tintas para tinción, estas líneas Raman se organizaron en tablas 6.1, 6.2 y 6.3, del Anexo A.

Para la construcción de las tablas se usó como nomenclatura el número de la paciente acompañada de la clasificación cáncer (C) o Normal (N), de esta forma las muestras procesadas por el laboratorio de patología de la UNAB se etiquetaron como P1N, P1C, P2C, P3N, P3C, P4N y P4C, en cuanto a las muestras del laboratorio de patología de la UIS se antepuso a la clasificación una letra que está relacionada con la zona de extracción de la muestra en las pacientes de la siguiente forma: P5AN, P5AC, P6A2C, P6DN, P6DC, P7A1N, P7A1C, P5AN, P5AC, P6A2C, P6DN, P6DC, P7A1N y P7A1C.

Los resultados para los pacientes P1, P2, P3 y P4 con clasificación cáncer y normal exhiben cinco líneas Raman en común: la primera está entre 638 639 cm^{-1} , está podría estar vinculada con la banda 640 cm^{-1} relacionada con cáncer, estiramiento del enlace C – S y giro de C – C de la proteína tirosina; la segunda de 772–777 cm^{-1} , está entre 776 cm^{-1} fosfatidilinositol y 778 cm^{-1} eosina; la tercera de 1000 – 1003 cm^{-1} , cerca de este rango se encuentra en 998 cm^{-1} resina epoxi, 1002 cm^{-1} fenilalanina (colágeno), 1003 cm^{-1} fenilalanina C – C esqueleto y en 1004 cm^{-1} HDA y CDI; la cuarta banda en 1088 cm^{-1} , se ha relacionado con 1087 vinculada con CDIS, 1089 cm^{-1} etanol y de 1087– 90 cm^{-1} estiramiento de los enlaces C – C y PO_2 ; la quinta banda en 1341 cm^{-1} , cerca de esta banda se encuentra en 1340 cm^{-1} el ácido nucleico (este implica deferencias en contenido de colágeno) este modo

¹⁶³ LI, Qingbo; GAO, Qishuo; ZHANG, Guangjun. Classification for breast cancer diagnosis with Raman spectroscopy. Biomedical optics express, 2014, vol. 5, no 7, p. 2435-2445.

vibracional indica el contenido del mismo en el tejido, 1343 cm^{-1} CDI y en 1342 cm^{-1} hematoxilina^{164, 165, 166, 167, 168}.

Para las pacientes P5, P6 y P7 con clasificación cáncer y normal se exhiben cuatro bandas en común: la primera entre $638 - 639\text{ cm}^{-1}$ está en concordancia con los resultados del primer grupo de pacientes; la segunda banda está entre $1269 - 1272\text{ cm}^{-1}$, dentro de esta se puede vincular en 1269 cm^{-1} con CDI, 1270 cm^{-1} a los fosfolípidos, la amida III (Banda de proteínas), el estiramiento C – N de las proteínas en la hoja plegada beta, los C = C grupos en ácidos grasos insaturados y en 1272 cm^{-1} el balanceo de CH_α ; la tercera banda se da entre $1560 - 1562\text{ cm}^{-1}$, en este intervalo podría atribuirse en 1558 cm^{-1} la amida II (proteínas) y de $1560 - 70\text{ cm}^{-1}$ a la molécula C OO^{-1} ; la cuarta banda es 1617 cm^{-1} , esta puede estar relacionada con la tirosina 1614 cm^{-1} , el triptófano (proteínas) en 1618 cm^{-1} y un poco más alejada en 1620 cm^{-1} la eosina^{169, 170, 171, 172, 173}.

La cercanía de las bandas pertenecientes a los ocho compuestos implementados en el proceso de histología podrían estar interfiriendo en los espectros Raman del tejido, por lo tanto se excluyeron del análisis las bandas del tejido directamente relacionadas con estos componentes así que sólo se consideraron aquellas que disten en mínimo 4 cm^{-1} , esto en concordancia con los resultados

¹⁶⁴ SHARMA, Shiv K.; MISRA, Anupam K.; SHARMA, Bhavna. Portable remote Raman system for monitoring hydrocarbon, gas hydrates and explosives in the environment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, vol. 61, no 10, p. 2404-2412.

¹⁶⁵ FRANK, Christopher J.; MCCREERY, Richard L.; REDD, Douglas C. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Analytical chemistry*, 1995, vol. 67, no 5, pp. 777-783.

¹⁶⁶ KRISHNA, C. Murali, et al. Raman spectroscopy of breast tissues. *Expert review of molecular diagnostics*, 2008, vol. 8, no 2, pp. 149-166.

¹⁶⁷ SEKHAR TALARI, Abdullah Chandra, et al. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 2015, vol. 50, no 1, pp. 46-111.

¹⁶⁸ CHATURVEDI, Deepika, et al. Different phases of breast cancer cells: Raman study of immortalized, transformed, and invasive cells. *Biosensors*, 2016, vol. 6, no 4, pp. 57.

¹⁶⁹ SHARMA, Shiv K.; MISRA, Anupam K.; SHARMA, Bhavna. Op. Cit.

¹⁷⁰ FRANK, Christopher J.; MCCREERY, Richard L.; REDD, Douglas C. Op. Cit.

¹⁷¹ KRISHNA, C. Murali, et al. Op. Cit.

¹⁷² SEKHAR TALARI, Abdullah Chandra, et al. Op. Cit.

¹⁷³ CHATURVEDI, Deepika, et al. Op. Cit.

evidenciados para tejido normal e HDA reportados por otros autores, en los cuales las diferencias son del orden de $1 - 3 \text{ cm}^{-1}$ ^{174, 175}.

Con base a lo anterior, se identificaron las bandas Raman que pertenecen únicamente al tejido para todas las muestras de los pacientes, estas se resumieron en las tablas 3.4, 3.5 y 3.6. Dentro de este conjunto de datos se observa una gran contribución de proteínas, carotenoides y colágeno tanto en tejido cancerígeno como en el tejido normal circundante. En concordancia con los resultados presentados en estas tablas, se enlistan a continuación algunas de las características por paciente, al respecto de las zonas denominadas por patología como cancerígena (C) y normal (N):

Paciente P1: Para las zonas C y N, se hallaron dos líneas Raman en común en 639cm^{-1} y 974cm^{-1} , que se encuentran muy próximas a 640cm^{-1} y 975cm^{-1} vinculadas con cáncer y HDA, además la zona C tiene dos bandas en 923cm^{-1} y en 1439 cm^{-1} , relacionadas con CDIS y CDI, respectivamente. Se observa que los espectros Raman son dominados por los picos 639 , 1271 y 1561cm^{-1} . La zona N contiene señales Raman relacionadas con carotenoides (955cm^{-1}), amida III (hoja plegada beta), fosfolípidos y ácidos grasos (1271cm^{-1}), lípidos (1311cm^{-1}), CH_3 (1386cm^{-1}) y COO^- en 1561cm^{-1} . La zona C contiene proteínas, carotenoides (1152cm^{-1}) y colágeno (1401cm^{-1}).

Paciente P2: Esta muestra contiene sólo zona C con señales Raman en 639cm^{-1} , 920cm^{-1} y 974cm^{-1} relacionadas con cáncer (640cm^{-1}), CDI (920cm^{-1}) y HDA (975cm^{-1}). Este espectro Raman es dominado por picos 639cm^{-1} y 1271cm^{-1} .

¹⁷⁴ SHARMA, Shiv K.; MISRA, Anupam K.; SHARMA, Bhavna. Op. Cit.

¹⁷⁵ CHATURVEDI, Deepika, et al. Op. Cit.

Paciente P3: Para ambas zonas C y N, se encontraron las bandas 639cm^{-1} y 971cm^{-1} relacionadas con cáncer (640cm^{-1}) y CDI (971cm^{-1}). Los espectros Raman son dominados por los picos Raman 639cm^{-1} , 1242cm^{-1} y 1561cm^{-1} .

Paciente P4: Las zonas C y N, tienen bandas vinculadas con expresión proteica, glucógeno y lípidos. Ambas zonas tienen en común el pico 638cm^{-1} relacionado con cáncer. En 1271cm^{-1} contienen información sobre fosfolípidos y ácidos grasos. La zona C tiene a 1524cm^{-1} asociada a carotenoides y es característica de tejido cancerígeno. Los espectros son dominados por los picos 1026 , 1244cm^{-1} (N) y 1029 , 1234cm^{-1} (C).

Tabla 4. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras de los pacientes P1, P2, P3 y P4 entre los rangos $600\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ del espectro Raman.

P1N	P1C	P2C	P3N	P3C	P4N	P4C	Asignación de Bandas [116, 142, 143, 144, 145, 146]
639	639	639	639	639	638	638	640 estiramiento del enlace $C-S$ y giro $C-C$ de proteína tirosina, 640 Cáncer
		681	681		678	678	678 Modos de respiración de anillo en las bases de ADN
955	923	920	923		934		920 Estiramiento $C-C$ del anillo de prolina / glucosa / ácido láctico, 920 DCI, 923 DCIS 934 Columna vertebral de $C-C$ (colágeno), 954 Carotenoides
974	974	974	971	971			971 DCI , 971 movimiento $\nu(C-C)$, 973 ácido metil ester, 974 vibración de la ribosa , 975 HDA
					1026	1029	1025 Carbohidratos (Glucógeno)
	1152	1152		1152		1152	1152 $\nu(C-N)$, Proteínas, $\nu(C-C)$ Carotenoides
						1197	1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, Amida III (Proteínas)
1226	1231	1242	1242	1242		1234	1224 Amida III (Hoja plegada Beta), 1230 Amida III (Estiramiento $C-N$ y flexión de $N-H$), 1242 Amida III (Hoja plegada beta y bobina aleatoria)
1271	1271	1271	1271		1271	1271	1269 DCI , 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento $C-N$ de las proteínas en la hoja plegada beta, $C=C$ grupos en ácidos grasos insaturados
1311	1311						1309, Modo de torsión molécula CH_3CH_2 de colágeno / lípidos
1386							1386 CH_3
	1401						1401 Modos de flexión de grupos metilo (colágeno)
		1428			1428	1428	1420-50 CH deformación (DNA/RNA proteínas, lípidos y carbohidratos)
	1439		1436				1436 Tijera de CH_2 , 1439 DCI CH_2 , 1439 Lípidos
						1524	1524 Carotenoides (Ausencia en tejido normal)
						1550	1552 Triptófano (Proteínas)
1561	1563	1561	1561	1561			1560-70 COO^-
					1691	1691	1682 Estiramiento de las vibraciones de cortisona

Paciente P5: Las zonas C y N tienen en común la línea 638 que se encuentran muy próximas a 640cm^{-1} vinculada con cáncer. Estos espectros son dominados por los picos 638 y 1271cm^{-1} .

Paciente P6: Se tienen dos muestras A2 y D. Las zonas C y N tienen en común el pico 638, además A2 contiene las señales 936 y 1123 cm^{-1} , las cuales están relacionadas con 640 (cáncer), 937 (CDI) y 1124 (CDI). Las señales dominantes para A2 están en 638, 1271 y 1562 cm^{-1} , para D en 638 y 1272 cm^{-1} .

Tabla 5. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras de los pacientes P5, P6 y P7 entre los rangos $600\text{ }1800\text{cm}^{-1}$ del espectro Raman.

P5AN	P5AC	P6A2C	P6DN	P6DC	P7A1N	P7A1C	Asignación de Bandas [116, 142, 143, 144, 145, 146]
638	638	638	638	638	638	638	640 estiramiento del enlace $C-S$ y giro $C-C$ de proteína tirosina, 640 Cáncer
673	673	678		678	662	662	662 Colágeno tipo I, 678 Modos de respiración de anillo en las bases de ADN
774	774	771			772	772	776 Fosfatidilinositol
		936				950	936 Proteína, 937 CDI , 954 Carotenoides
		1123					1123 Proteínas $C-N$, estiramiento en lípidos y proteínas $C-C$, 1124 CDI
	1152	1152					1152 $\nu(C-N)$ Proteínas, $\nu(C-C)$ carotenoides
			1208				1208 Fenilalanina
	1129		1226	1226	1226	1226	1224 Amida III (Hoja plegada Beta)
1234	1234			1239			1235 amida III, 1239 Amida III
1242	1242	1240					1242 Amida III (Hoja plegada beta y bobina aleatoria)
1271	1271	1271	1272	1272	1272	1272	1269 DCI , 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento $C-N$ de las proteínas en la hoja plegada beta, $C=C$ grupos en ácidos grasos insaturados
		1309		1311			1309 Modo de torsión molécula CH_3-CH_2 de colágeno / lípidos
	1402		1386				1386 CH_3 , 1401 Modos de flexión de grupos metilo (colágeno)
		1431	1428	1428		1413	No tiene asignación
			1455				1455 Dexosirribosa
1562	1562	1556	1561	1561		1559	1558 Amida II (Proteínas), 1560-70 COO^-
1615	1615	1615					1614 Tirosina, 1618 Triptófano (Proteínas), 1620 Eosina
		1681					1682 Estiramiento de las vibraciones de cortisona
		1716					$C=O$
		1772					No tiene asignación

Tabla 6. Asignación de componentes moleculares respecto a las líneas Raman, para las muestras del paciente P7 entre los rangos de $600 - 1800\text{cm}^{-1}$.

P7A2N	P7A2C	P7A3N	P7A3C	P7BN	P7BC	Asignación de Bandas [116, 142, 143, 144, 145, 146]
638	638	638	638	638	638	640 estiramiento del enlace $C - S$ y giro $C - C$ de proteína tirosina, 640 Cáncer
678	678			665		662 Colágeno tipo I, 666 G,T (Modos de respiración en anillo ADN), Tirosina-G en RNA, 678 ADN
705	705		705	705	705	702 Colesterol, éster de colesterol
772	772	761	766	771	771	776 Fosfatidilinositol, 778 Eosina
851	851		915			851 anillo de respiración de tirosina, 915 Vibración Ribosa (RNA)
955			955	955	955	954 carotenoides (ausencia en tejidos normales)
			974	974	974	972 CDI , 974 vibración de la Ribosa, 975 HDA
1005	1005		1005			1004 HDA, CDI , 1005 Fenilalanina (Proteínas)
			1053	1051	1051	1052 $\nu(C - N)$ Proteínas, $\nu(C - C)$ Carotenoides 1053 Estiramiento $C - O$ y $C - N$ (Proteínas)
			1128			1128 Estiramiento $C - N$ (Proteínas), $C - O$ (Carbohidratos), 1129 HDA
1232	1232	1232	1232	1234	1234	1235-1239 Amida III
1272	1272	1269	1269	1272	1272	1269 DCI , 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento $C - N$ de las proteínas en la hoja plegada beta, $C = C$ grupos en ácidos grasos insaturados
1309	1309	1309	1309	1309	1309	1309 Modo de torsión molécula $CH_3 CH_2$ de colágeno / lípidos
1346	1346	1346	1346	1349	1349	1343 CDI
1402				1389	1389	1386 CH_3 , 1401 Modos de flexión de grupos metilo, (uno de los modos vibracionales de colágeno)
1436		1426	1426	1426	1426	1424 Desoxirribosa, 1436 Tijera CH_2
1468	1468	1468	1468	1468	1468	1465 Lípidos
1561	1561	1560	1560	1560	1560	1560-70 COO^-
1617	1617	1617	1617	1617	1617	1614 Tirosina, 1618 Triptófano (Proteínas),
		1724				1728 Grupo éster

Paciente P7: Se tienen cuatro muestras A1, A2, A3 y B. Las zonas C y N de todas estas muestras tienen en común el pico 638. La muestra A1, en las zonas N y C contiene líneas Raman relacionadas con amida III (1226 cm^{-1}) y fosfolípidos (1272 cm^{-1}), además la zona C incluye señales de la amida II en (1559 cm^{-1}). La muestra A2 exhibe señales Raman en 678, 851, 1005, 1232, 1272, 1309, 1346, 1468, 1561 y 1617 cm^{-1} , que corresponden a modos de respiración del anillo en las bases del ADN, tirosina, fenilalanina, amida III, fosfolípidos, colágeno/lípidos, sin asignación, lípidos, COO^- y triptófano, respectivamente. La zona C de las muestras A3 y B tienen en común la línea 974 cm^{-1} relacionada con 975 cm^{-1} (HDA). Para A3 y B tienen en común 1232, 1269 – 1272, 1309, 1346 – 1349, 1468 y 1560 cm^{-1} .

Dentro de este conjunto de muestras denominadas por patología como cáncer y normal, se evidencia que todas las zonas de tejido normal circundante al tejido cancerígeno están relacionadas con líneas Raman características de tejido mamario con alteraciones de algún tipo: HDA, CDIS y CDI. Esto evidencia la presencia del efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario normal circundante de las once muestras. A continuación, se presentará lo que se ha denominado mapeo espacial de tejido mamario desde la zona normal hacia la zona cancerígena de dos muestras, con el objetivo de estudiar la relación de las alteraciones en el tejido con el efecto de campo carcinogénico.

4.5 MAPEO ESPACIAL DE TEJIDO MAMARIO

Se planteó observar si existen cambios sobre el espectro Raman desde la zona cancerígena hacia la zona normal y encontrar si es el caso, cuales son las bandas Raman que aparecen o experimentan corrimientos y cuál es la relación con el efecto de campo carcinogénico. Con este propósito se eligieron dentro del conjunto de muestras únicamente dos; La primera muestra es de la paciente P6 con demarcación D y la segunda es de la paciente P7 con demarcación A2, la descripción patológica de las muestras se presentó en la tabla 3.1. Estas dos muestras tienen desde el punto de vista histopatológico dos zonas bien diferenciadas, la primera muestra es mayoritariamente normal y se identifica una pequeña zona cancerígena, mientras que la segunda es mayoritariamente cancerígena con una pequeña zona normal, ver figura 3.5.1.

Figura 11. Muestras de las pacientes P6 y P7, usadas para realizar el mapeo espacial con espectroscopia Raman. Área encerrada en negro cáncer, en azul tejido circundante normal.

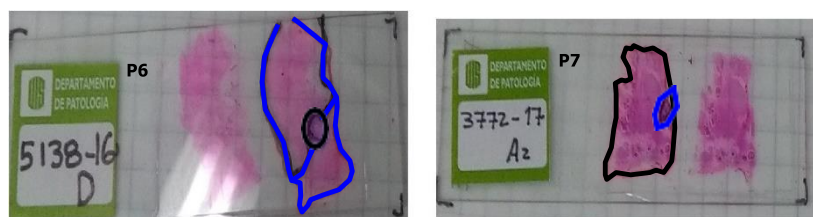
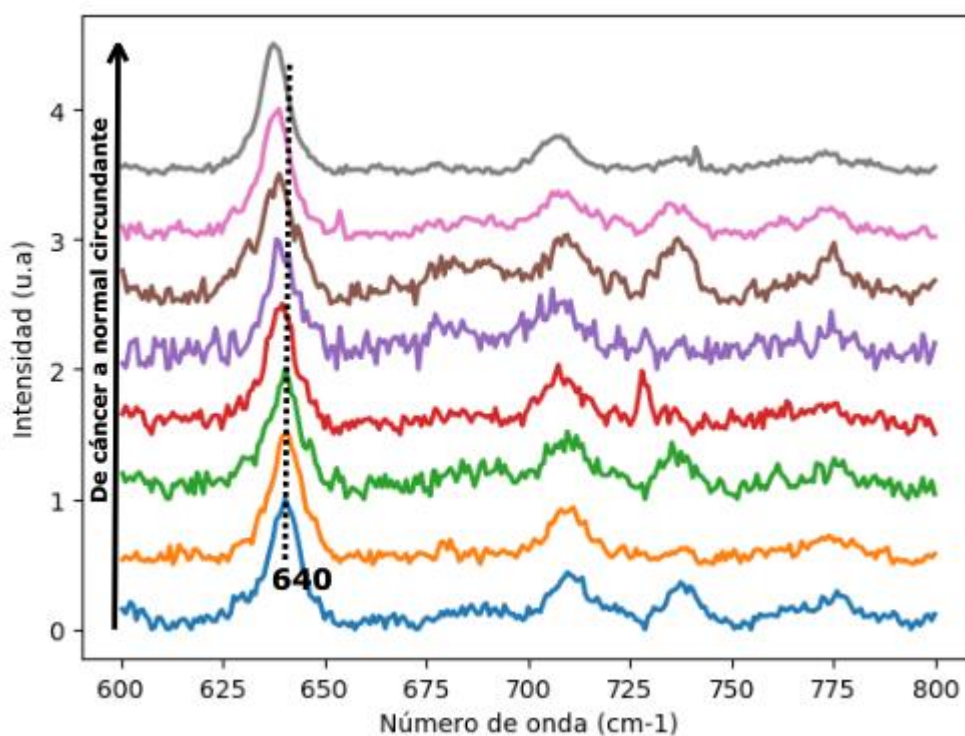


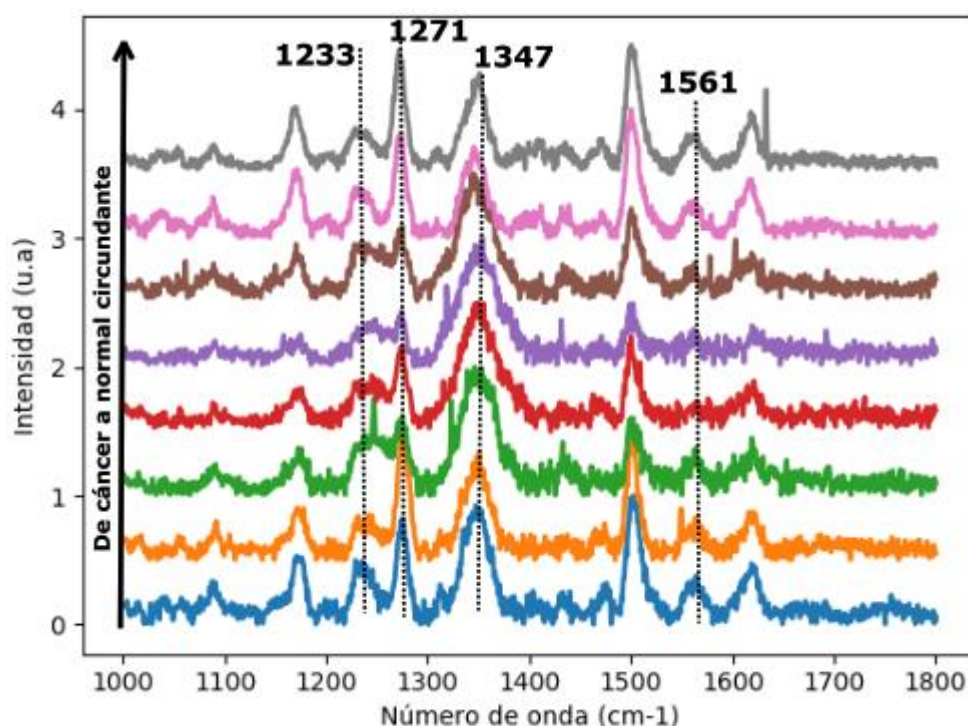
Figura 12. Espectro Raman de la paciente P6 D en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$



Las mediciones se realizaron en ocho puntos desde la zona cancerígena hacia la zona normal en las dos muestras, ver figura 3.3.2 y los espectros se obtuvieron entre $600-1800 \text{ cm}^{-1}$. Para estudiar estas muestras se utilizaron los resultados encontrados en la sección anterior por paciente. Para la paciente 6 se identificaron

las líneas Raman 640 y 1271 (CDI) que están directamente relacionadas con un estado neoplásico y se incluyeron los picos 1233, 1347 y 1561 cm^{-1} . Para observar si existe algún efecto sobre estas líneas Raman en el paso de la zona cancerígena a normal, el espectro Raman se dividió en dos rangos 600 – 800 cm^{-1} y de 1000 – 1800 cm^{-1} , los espectros Raman correspondientes se presentan en las figuras 3.5.2 y 3.5.3.

Figura 13. Espectro Raman de la paciente P6 D en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre 1000 – 1800 cm^{-1} .



En los espectros Raman de la paciente P6 se observó el desplazamiento de la línea ubicada en 640 cm^{-1} a un número de onda menor a medida que el espectro Raman fue medido desde la zona cancerígena hacia la zona normal, alcanzando el valor de 636 cm^{-1} . Este desplazamiento corresponde a 4 cm^{-1} . Para las otros picos Raman 1233, 1271, 1347 y 1561 cm^{-1} , se observan pequeños desplazamientos del orden de 1 cm^{-1} .

Figura 14. Espectro Raman de la paciente P7 A2 en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$.

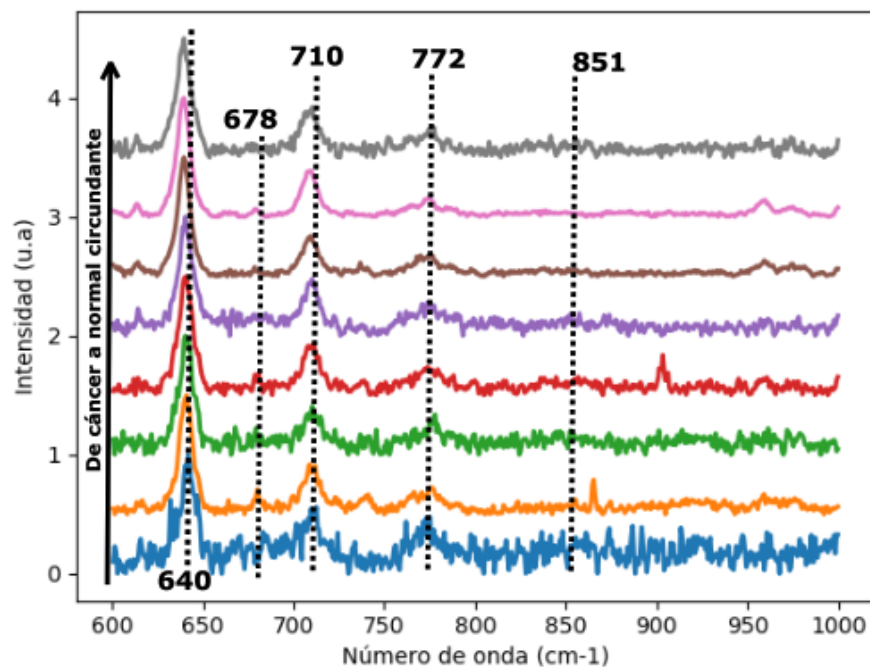
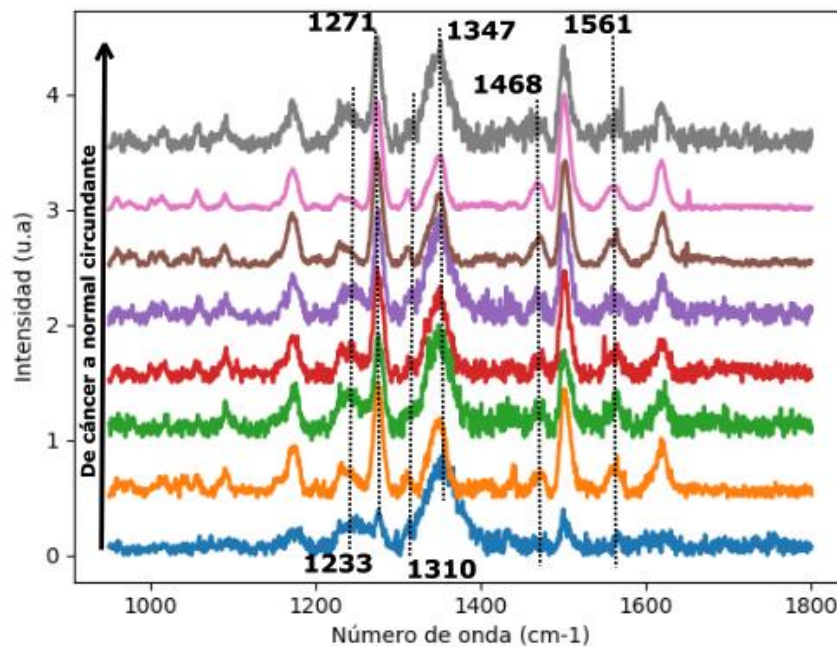


Figura 15. Espectro Raman de la paciente P7 A2 en ocho puntos desde la zona cancerígena a la zona normal, entre $1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$.



Para la paciente 7 se presentan los resultados obtenidos en las figuras 3.5.4 y 3.5.5, en estas se identificaron las líneas Raman 640, 705, 772, 851, 1233, 1271, 1308, 1347 y 1561 cm^{-1} . Para estos espectros se encontraron desplazamientos de 2,5, 2 y de 1 2 cm^{-1} , desde la zona cáncer a normal en las líneas Raman desde 640 (CDI), 1233, 1310 y 1347 hacia 638, 1228, 1310 y 1345 cm^{-1} , respectivamente. Al observar los espectros Raman presentados en esta figura, desde parte inferior hacia arriba, se puede inferir una disminución de las líneas 678, 772 cm^{-1} y ausencia de 851 cm^{-1} . Los picos Raman 1271 y 1468 cm^{-1} están presentes en todos los espectros sin desplazamientos en número de onda y presentan una disminución de la intensidad en la primera zona cancerígena.

Dado que el máximo error de medición asociado a la frecuencia para el instrumento utilizado en la medición de los espectros Raman es de 1 cm^{-1} , se puede utilizar este valor como referencia para descartar corrimientos cuando la variación es menor a 1 cm^{-1} .

4.6 RELACIÓN ENTRE ESPECTROS RAMAN Y EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENICO

El objetivo principal fue estudiar el efecto de campo carcinogénico o efecto de campo por medio de la espectroscopia Raman en muestras de tejido mamario, es decir, analizar si existen diferencias o similitudes en los espectros Raman de las zonas normales y cancerígenas examinadas por microscopio y observar cuales alteraciones en las zonas cancerígenas están presentes en las zonas denominadas normales.

Las muestras biológicas estudiadas se encontraban en bancos de tejidos con unas condiciones experimentales previas en las que se procesaron con sustancias químicas para preservar el estado bioquímico de las mismas. La ventaja de estudiar

estas muestras almacenadas radica principalmente en aprovechar toda la información biológica y química que contiene todo este material biológico sobre los diferentes tipos de cáncer.

Todos los tejidos en su mayoría están compuestos principalmente de agua, entonces para que la parafina líquida pueda entrar en el tejido se usa un solvente orgánico para sustituir el agua, generalmente se usa etanol de concentración creciente para lograr deshidratar el tejido, posteriormente el tejido es colocado en una sustancia que sea miscible tanto al alcohol como a la parafina, generalmente se usa el xilol o xileno, esta sustancia es normalmente aclarante por lo que la translucidez del resultado final indica la penetración de la sustancia en el tejido, por último se pasa a parafina previamente licuada, en este proceso el xilol se desprenderá y se evaporará mientras la parafina se incrusta en la muestra¹⁷⁶. Dada la volatilidad de los alcoholes y el xilol se esperaba que estos no alteraran considerablemente la composición química de la muestra.

Sin embargo, investigaciones previas han mostrado que las bandas Raman del xilol, parafina y resina epoxi (material usado para la fijación del tejido en el vidrio) pueden alterar algunas bandas en las muestras de tejido que han sido sometidas a este tipo de procedimientos. En esta investigación se han identificado dentro de las muestras de tejido estudiadas posibles señales relacionadas con: 734, 999, 1051, 1169, 1202, 1247 y 1611 cm^{-1} del xilol, 736, 998 y 1172 cm^{-1} resina epoxi, 778, 1058, 1498 y 1620 cm^{-1} eosina, 854 cm^{-1} n-propanol, 1089 cm^{-1} etanol y 1044 cm^{-1} alcohol ácido.

Definidas estas bandas de interacción del tejido con estos componentes externos, se limitó este estudio al conjunto de picos que podrían pertenecer únicamente a las muestras de tejido, por lo tanto, en la sección de identificación de bandas se realizó

¹⁷⁶ HAN, Bing, et al. Differences and relationships between normal and atypical ductal hyperplasia, ductal carcinoma in situ, and invasive ductal carcinoma tissues in the breast based on Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 2017, vol. 71, no 2, pp. 300-307.

un consolidado de todas las posibles señales Raman presentes en las once muestras estudiadas y su correspondiente asignación molecular, ver tablas 3.4, 3.5 y 3.6.

En la literatura se encuentran reportadas algunas líneas Raman de interés para evaluar el estado normal o anormal de muestras de tejidos, entre ellas pueden mencionarse: 1300, 1440, 1656 y 1754 cm^{-1} relacionadas con los contenidos lipídicos y la estructura química de los tejidos y 1004, 1100 – 1375, 1450 y 1656 cm^{-1} con los contenidos proteicos^{177, 178, 179, 180}. De las muestras estudiadas, todas las zonas identificadas como normales por patología exhiben la ausencia de tres picos Raman relacionados con el contenido lipídico 1300, 1656 y 1754 cm^{-1} , en algunas está la presencia cercana a la línea 1440 cm^{-1} . Con respecto al contenido proteico, todas las zonas determinadas por patología como normales contienen la línea 1269 1272 cm^{-1} reportada en la literatura en 1269 – 1270 cm^{-1} como CDI, además a excepción de la muestra P3C todas las muestras etiquetadas como cancerígenas expresan esta banda en sus espectros, también la zona normal de las muestras P3 y P7 contienen los picos 1242 cm^{-1} , A2 (1232, 1309 y 1346 cm^{-1}) y B (1232, 1309 y 1346 – 1349 cm^{-1}), respectivamente.

Al comparar los resultados entregados de las biopsias por los laboratorios de la UNAB y la UIS, sintetizados en la tabla 3.1 y las zonas identificadas como cáncer

¹⁷⁷ GAZI, Ehsan; GARDNER, Peter. Preparation of tissues and cells for infrared and Raman spectroscopy and imaging. *Vibrational Spectroscopic Imaging for Biomedical Applications*. New York: McGraw-Hill, 2010, pp. 59-98.

¹⁷⁸ REDD, Douglas, et al. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, pp. 787-791.

¹⁷⁹ MAHADEVAN-JANSEN, Anita; and RICHARDS-KORTUM, Rebecca. Raman spectroscopy for cancer detection: a review. En *Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 'Magnificent Milestones and Emerging Opportunities in Medical Engineering'* (Cat. No. 97CH36136). IEEE, 1997. pp. 2722-2728.

¹⁸⁰ REHMAN, Shazza, et al. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 2007, vol. 38, no 10, pp. 1345-1351.

(anormal) y normal por las medicas vinculadas a esta investigación, se evidencia por espectroscopia Raman que todas las zonas normales contienen la línea Raman 638 o 639 cm^{-1} , la cual para tejido que no se encuentra en volumen sino cortado muy delgado está asignada a CDI, además, desde el estudio de las bandas Raman para tejidos biológicos el rango entre $630 - 670\text{ cm}^{-1}$ se ha relacionado con proteínas conformadas por el aminoácido azufrado conocido como metionina (C -S)¹⁸¹, este rango también se encuentra dentro de la amida IV ($625 - 700\text{ cm}^{-1}$).

La metionina es uno de los ocho aminoácidos esenciales en la dieta humana y es el único que contiene azufre, este es necesario para la proliferación celular y síntesis del RNA. También está la cisteína que se puede formar a partir del anterior. La metionina tiene además otra función como el sustrato S-adenosil metionina (SAME), el cual actúa como un donante de metilo esencial para numerosas moléculas dentro las células, incluida la metilación del ADN, hipometilación global (metilación reducida en todo el geoma), se relaciona con inestabilidad cromosómica y está vinculado a varios tipos de cáncer. Estos cambios epigenéticos están influenciados por el micro-entorno del tumor, incluida la disponibilidad de grupos metilo del ciclo de metionina en la carcinogénesis¹⁸². La metionina también es necesaria para la producción de poliaminas, que están involucradas en la división celular y se encuentran en una mayor concentración en los tumores pues estas disminuyen la apoptosis y aumentan la proliferación celular^{183, 184, 185}.

¹⁸¹ DOWNES, Andrew; and ELFICK, Alistair. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors*, 2010, vol. 10, no 3, pp. 1871-1889.

¹⁸² CHATURVEDI, Deepika, et al. Different phases of breast cancer cells: Raman study of immortalized, transformed, and invasive cells. *Biosensors*, 2016, vol. 6, no 4, p. 57.

¹⁸³ CAVUOTO, Paul; FENECH, Michael F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews*, 2012, vol. 38, no 6, p. 726-736.

¹⁸⁴ KINGSNORTH, A.; WALLACE, H.; BUNDRED, N.; and DIXON, J. Polyamines in breast cancer. *British journal of surgery*, 1984, vol. 71, no 5, pp. 352-356.

¹⁸⁵ NISHIOKA, Kenji. Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches. Landes Bioscience, 1996.

Dentro de los resultados obtenidos se pueden relacionar las muestras con estados neoplásicos y tumorales de la siguiente manera: HDA (P1N, P1C, P2C, P3N, P3C, P7A3N, P7A3C, P7BN y P7BC), CDIS (P1C) y todas las muestras en las zonas normales o cancerígenas con CDI.

Con respecto al mapeo espacial de las dos muestras de tejido P6D y P7A2, se evidencia en los espectros Raman medidos en 8 puntos que van desde la zona cancerígena hacia la zona normal un corrimiento de 640 hacia 636cm^{-1} y de 1233 hacia 1228cm^{-1} en la primera y segunda muestra respectivamente, corrimientos en número de onda que se consideraron significativos en concordancia con el error de medición de 1cm^{-1} asociado a la frecuencia del instrumento. Mientras que el pico en $1269 - 1271\text{cm}^{-1}$ se mantiene en todos los espectros. Es importante resaltar como las características del tejido revisadas por microscopio determinan que la muestra P6D tiene una área mayoritariamente normal, en cuanto que los espectros Raman muestran relación directa de estas zonas normales con las dos bandas relacionadas con CDI (640 y 1271), en cuanto a la segunda muestra P7A2 es mayoritariamente anormal (cáncer) y una pequeña zona normal según el análisis a microscopio, estas dos líneas Raman se mantienen dentro del rango de ($638\text{-}640\text{ cm}^{-1}$ y $1269\text{-}1271\text{ cm}^{-1}$), es decir el espectro Raman de la zona normal no muestra diferencias significativas respecto al cancerígeno.

Con respecto a la hipótesis: *"El efecto de campo carcinogénico se puede interpretar como un efecto de amplificación de las anomalías bioquímicas debido a las células anormales o transformadas"*. El mapeo espacial para las dos muestras desde la zona cancerígena hacia la zona normal permitió examinar dos líneas Raman características del CDI. En la muestra con una zona mayoritariamente cancerígena, el paso zona cancerígena a zona normal no exhibe diferencias significativas en los espectros Raman dada la existencia de ECC. En cuanto que la muestra con una zona mayoritariamente normal, con una pequeña zona alterada, exhibe líneas Raman características de la zona cancerígena, es decir, la zona patológicamente

normal contiene alteraciones moleculares características relacionadas con la pequeña zona anormal. Esta última muestra fue extraída de la areola del pezón ($5.5 \times 4\text{cm}^2$) de una mama que medía $22 \times 19 \times 7\text{cm}^3$, con una lesión de tamaño $8 \times 7.5 \times 4.5\text{cm}^3$ ubicada en los cuadrantes internos a 0.2cm del borde profundo (músculo pectoral), la lesión principal se encuentra a más de 10cm del lugar en el que fue tomada la muestra. Es decir, la amplificación de las alteraciones moleculares alcanza zonas alejadas a más de 10cm de distancia de la alteración principal.

5. RETRODISPERSIÓN DE LUZ POR TEJIDO MAMARIO Y SU RELACIÓN CON EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENÉTICO

El efecto de campo carcinogénico ha sido medido en el tejido localizado en el recto, cérvix y saliva^{186, 187, 188, 189}. Esta medida ha permitido detectar alteraciones del orden nanoscopico relacionadas con cáncer de colon, ovario y pulmones, por medio de imágenes obtenidas por la técnica PWS¹⁹⁰. En cuanto a la implementación de luz NIR, otras técnicas ópticas como la tomografía óptica difusa han logrado diferenciar tejido mamario normal del cancerígeno¹⁹¹. Dada la importancia en la detección temprana del cáncer de mamas y como el efecto de campo carcinogénico es una medida de alteraciones tempranas en los tejidos, se ha propuesto un diseño experimental y una metodología para estudiar el efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario. El tejido se estudió como un sistema de moléculas de diferentes tamaños inmersas en un medio acuoso (agua), a una temperatura constante e interactuando con el medio (intra y extracelular), con el movimiento de estas moléculas como aleatorio (Browniano). Al iluminar el tejido y medir la luz (NIR) retrodispersada, esta contiene información acerca de la dinámica de los principales centros dispersores (células y mitocondrias). La información obtenida por retrodispersion se estudió a través del espectro de potencia de 24 pacientes. Los parámetros

¹⁸⁶ BACKMAN, Vadim; and ROY, Hemant. Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification. *Journal of Cancer*, 2013, vol. 4, no 3, p. 251.

¹⁸⁷ GLADSTEIN, Scott, et al. Correlating colorectal cancer risk with field carcinogenesis progression using partial wave spectroscopic microscopy. *Cancer medicine*, 2018, vol. 7, no 5, p. 2109-2120.

¹⁸⁸ ROY, Hemant K.; HENSING, Thomas; BACKMAN, Vadim. Nanocytology for field carcinogenesis detection: novel paradigm for lung cancer risk stratification. *Future oncology*, 2011, vol. 7, no 1, pp. 1-3.

¹⁸⁹ FULLWOOD, Leanne M., et al. Effect of substrate choice and tissue type on tissue preparation for spectral histopathology by Raman microspectroscopy. [Online]. *Analyst*, 2014, vol. 139, no 2, pp. 446-454. Disable: <http://dx.doi.org/10.1039/C3AN01832F>

¹⁹⁰ GERNER, Eugene W.; MEYSKENS JR, Frank L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 2004, vol. 4, no 10, p. 781.

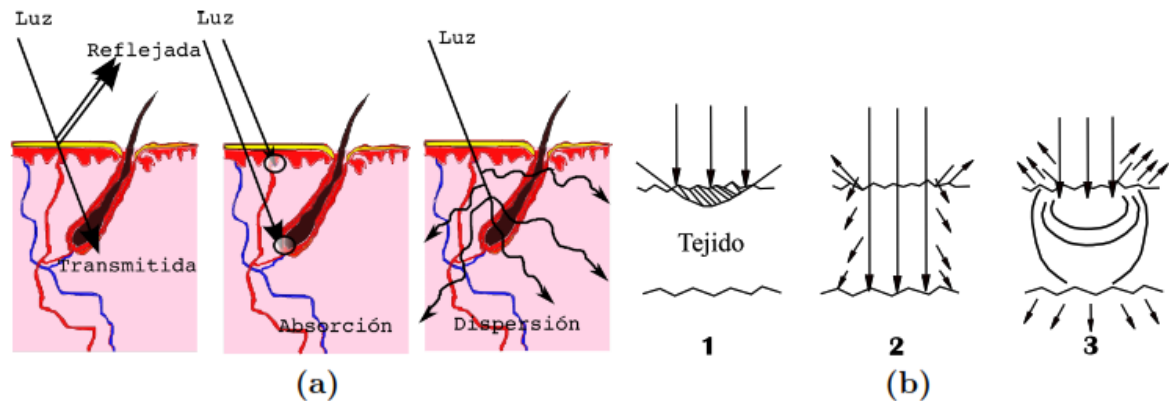
¹⁹¹ SUBRAMANIAN, Hariharan, et al. Partial-wave microscopic spectroscopy detects subwavelength refractive index fluctuations: an application to cancer diagnosis. *Optics letters*, 2009, vol. 34, no 4, pp. 518-520.

espectrales elegidos muestran relación con el efecto de campo carcinogénico diferenciando tejidos normales y anormales.

5.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

La interacción de la luz con los tejidos permite obtener información acerca de sus propiedades químicas y físicas, a través de los fenómenos de absorción y dispersión. Los tejidos biológicos pueden considerarse como un medio dieléctrico con un índice de refracción mayor al aire, que al interactuar con la radiación de la luz gran parte de la misma penetra al tejido y una porción muy pequeña es reflejada, en concordancia con la teoría de reflexión de Fresnel, ver figura 4.1.1a. Esta radiación de luz que penetra el tejido se conoce físicamente como transmisión o refracción y se caracteriza por la relación de los índices de refracción de los dos medios $n_{tejido} > n_{aire}$. Parte de la luz que penetra da el paso a dos fenómenos conocidos como absorción y dispersión.

Figura 16. Interacción de la luz con los tejidos: a. Fenómenos de reflexión, absorción y dispersión. b. Absorción y dispersión: 1 La absorción prevalece, esto es típico en el uso de luz UV o Infrarrojo medio (MIR) o lejano (FIR); 2 La absorción y la dispersión son aproximadamente iguales entre sí, esto puede ocurrir en algún rango en el NIR, el haz de luz se propaga bien con cierta cantidad de radiación dispersada; 3 Prevalece la dispersión, es típico en el visible y NIR, una ampliación significativa del haz de luz con irradiación difusiva en el volumen del tejido.



Fuente: FUKSIS, Rihards, et al. Infrared imaging system for analysis of blood vessel structure. Elektronika ir Elektrotehnika, 2010, vol. 97, no 1, pp. 45-48.

5.1.1 Absorción. La mayor parte de los tejidos son medios turbios con múltiples capas de absorción e interfaces rugosas. En el tejido, el fenómeno de absorción puede estudiarse considerando la existencia de varios centros absorbentes que pueden ser moléculas o partículas que absorben la luz, la presencia de estos centros caracterizan al tejido con un coeficiente de absorción, tal que la cantidad de luz que puede penetrar en el tejido depende de la naturaleza de la radiación de luz utilizada (λ longitud de onda) y del coeficiente de absorción $\mu_{\text{absorción}}(\lambda)$. La relación entre la intensidad de la luz absorbida sobre la intensidad total, se conoce en la espectroscopia como absorbancia, esta es una cantidad sin dimensiones de la cual se puede formar el espectro de absorción del tejido o sustancia en función de la longitud de onda.

La definición de absorbancia es aplicable a medios homogéneos con interfaces planas entre ellos, por lo que su uso está limitada a un número de tejidos tales como córnea, lente, y cuerpo vítreo sano. Cuando se utiliza luz en el visible o en el infrarrojo los principales centros absorbentes en los tejidos son: el agua, lípidos, la hemoglobina oxigenada y desoxigenada, la bilirrubina, carotenoides y porfirinas. Las longitudes de onda entre 600 *nm* a 1000 *nm* son ideales para aplicaciones médicas (terapia y diagnóstico) porque la absorción en el tejido ya no es determinada esencialmente por el agua, conduciendo a una mayor longitud de penetración¹⁹², ver figura 4.1.2.

Las bandas de absorción más fuertes son 415, 542 y 577 *nm* para la hemoglobina oxigenada y en 430 y 555 *nm* para la desoxigenada, en 330 y 460 *nm* para la bilirrubina, en 400 *nm* porfirina y desde 450 a 700 *nm* para diferentes hemoproteínas¹⁹³. En los tejidos los procesos de absorción y dispersión múltiples son responsables de la disminución de la intensidad de luz a medida que viaja a través del tejido¹⁹⁴. La dispersión múltiple es una de las causas más importantes para que se dé la radiación por retro-dispersión, o dispersión hacia atrás (referente a la dirección de propagación del haz de luz), este proceso de dispersión depende de la naturaleza del haz de luz utilizado¹⁹⁵, ver figura 4.1.1b

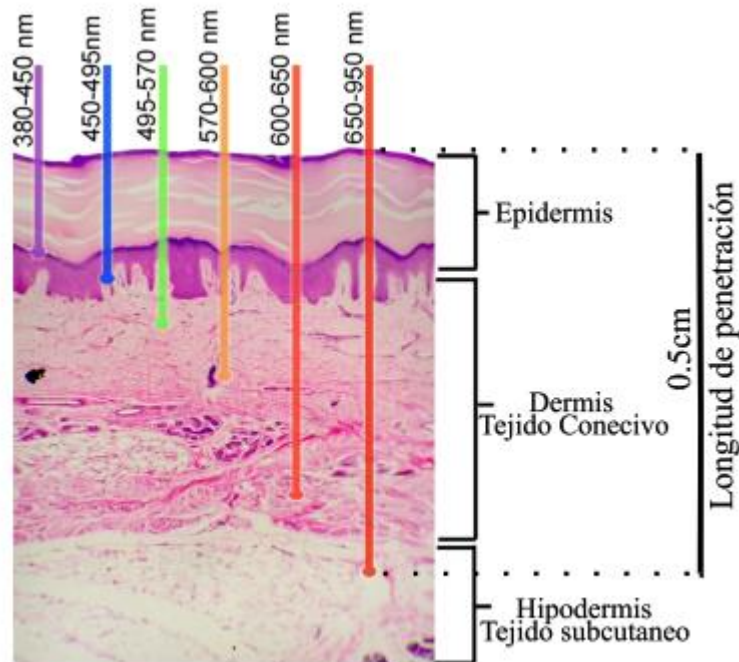
¹⁹² MCCLATCHY III; and DAVID M. Development and Translation of Light Scatter Imaging and micro-Computed Tomography to Improve the Surgical Resection of Breast Cancer. 2018. Tesis Doctoral. Dartmouth College Hanover, New Hampshire.

¹⁹³ BAROLET, Daniel. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. En *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. No longer published by Elsevier, 2008. pp. 227-238.

¹⁹⁴ FUKSIS, Rihards, et al. Infrared imaging system for analysis of blood vessel structure. *Elektronika ir Elektrotehnika*, 2010, vol. 97, no 1, pp. 45-48.

¹⁹⁵ BASHKATOV, Alexey N.; GENINA, Elina A.; TUCHIN, Valery V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2011, vol. 4, no 01, pp. 9-38.

Figura 17. Longitud de penetración de la luz infrarroja (NIR).



Fuente: SUBRAMANIAN, Hariharan, et al. Partial-wave microscopic spectroscopy detects subwavelength refractive index fluctuations: an application to cancer diagnosis. Optics letters, 2009, vol. 34, no 4, pp. 518-520.

5.1.2 Dispersión. El proceso de dispersión en los tejidos se ha intentado estudiar teóricamente a través de modelos ópticos de propagación de la luz en la muestra biológica, el modelo teórico más sencillo interpreta el tejido como un sistema de partículas esféricas homogéneas que no interactúan, esto basados en la forma geométrica esférica o elipsoide que tienen las células, organelos celulares y macromoléculas biológicas. Las teorías de Rayleigh y Mie o una combinación de las dos permiten, estudiar y calcular la dispersión dentro del tejido de una forma más completa. Específicamente la teoría de Mie describe la dispersión elástica de la luz por una partícula esférica¹⁹⁶. Para el tejido conectivo que es más fibroso, las estructuras se representan como cilindros largos, para este modelo la luz que se

¹⁹⁶ TUCHIN, Valery V. Handbook of photonics for biomedical science. CRC Press, 2010.

propaga por un medio de cilindros homogéneos o multicapas ya ha sido entendido¹⁹⁷.

Dentro del tejido, las estructuras pequeñas o de tamaño comparado con la longitud de la onda que se propaga se denominan dispersores, estos cambian la dirección de propagación de la luz. El proceso de dispersión es caracterizado por la función de fase de dispersión $p(\theta, \phi)$, la cual describe las propiedades de dispersión del medio, esta también representa la función de densidad de probabilidad que tiene un fotón que viaja en alguna dirección de ser dispersado en una nueva dirección¹⁹⁸.

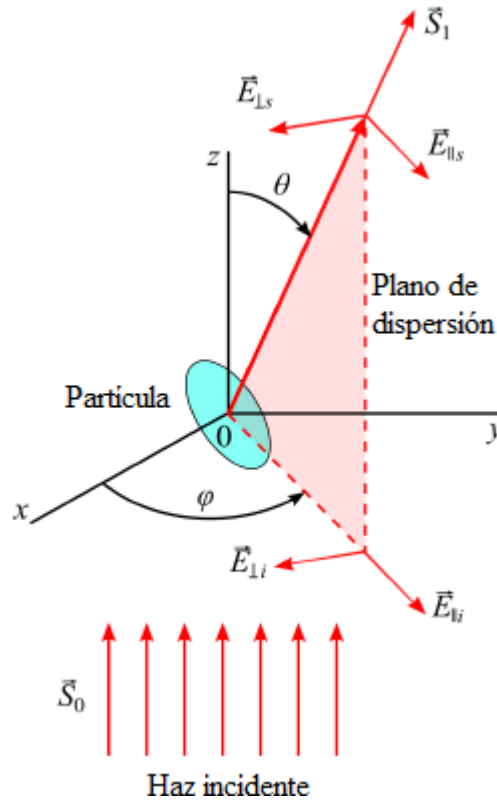
En la figura 4.1.3, se representa una onda incidente $\vec{s}_0$ que viaja paralela al eje z, y choca contra una partícula ubicada en el origen de coordenadas. Para observar la onda dispersora se ubicó un detector a una distancia r en la dirección del vector $\vec{s}_1$, siendo $\vec{E}_{\parallel s}$ y $\vec{E}_{\perp s}$ las componentes del haz en dirección paralela y perpendicular al plano de dispersión, θ y ϕ el ángulo de dispersión en el plano de dispersión y el ángulo azimutal de dispersión en el plano perpendicular a la trayectoria de los fotones dispersados, respectivamente¹⁹⁹.

¹⁹⁷ ISHIMARU, Akira. Wave propagation and scattering in random media. New York: Academic press, 1978.

¹⁹⁸ HULST, Hendrik Christoffel; VAN DE HULST, Hendrik C. Light scattering by small particles. Courier Corporation, 1981.

¹⁹⁹ Ibid.

Figura 18. Descripción geométrica de la dispersión de la luz por una partícula. El haz de luz incide paralelo ($\vec{S}_0$) al eje z, θ y ϕ son los ángulos de dispersión en el plano y perpendicular al plano dispersor, respectivamente. El detector es localizado a una distancia r a lo largo del vector ($\vec{S}_1$), con $\vec{E}_{\parallel s}$ y $\vec{E}_{\perp s}$ las dos componentes del haz de luz que llega al detector.



Fuente: WAX, Adam and BACKMAN, Vadim. Biomedical applications of light scattering. McGraw Hill Professional, 2009.

En relación a $p(\theta, \phi)$ se define el factor de anisotropía g :

$$g = \int_0^\pi p(\theta) \cos\theta 2\pi \sin\theta d\theta, \quad (5.1.1)$$

De esta expresión se infiere que g puede tomar tres valores que corresponden a: $g = 0$ dispersión isotrópica (Rayleigh), $g = 1$ dispersión total hacia adelante (dispersión de Mie para partículas grandes) y $g = -1$ dispersión total hacia atrás

(retro-dispersión). Sí se combina el coeficiente de dispersión μ_s y el factor de anisotropía g , se obtiene el coeficiente de dispersión reducido dado por:

$$\mu'_s = (1 - g) \mu_s \quad (5.1.2)$$

La dispersión de la luz en el tejido es causada por falta de homogeneidad, debido a un desajuste del índice de refracción con respecto a los límites entre dos medios o estructuras, por ejemplo, entre el fluido extracelular y la membrana celular. En general, cualquier tipo de célula tiene tres componentes principales: citoesqueleto, núcleo y citoplasma, cada uno de estos componentes y otros no mencionados contribuyen a la dispersión promedio del tejido. Bajo esta idea, Mourant y colaboradores²⁰⁰, realizaron un estudio para determinar los centros de dispersión dominantes en el tejido, utilizando células de mamíferos, encontrando que la dispersión observada, podría ser atribuida a partículas con distribución de tamaños equivalente a esferas con diámetros entre 0.2 y $1\mu m$. En este rango, la dispersión en tejidos es dominada por el núcleo y la mitocondria, cuyos tamaños son de aproximadamente entre $0.5\mu m$ y $1\mu m$, respectivamente.

5.1.3 Dispersión Rayleigh. En concordancia con el parámetro de anisotropía g , el tamaño de las partículas involucradas en la dispersión tiene una implicación con respecto a la dirección predominante en este fenómeno físico. La teoría de dispersión de Rayleigh fue formulada para partículas que cumplen con la condición $m(2\pi a/\lambda) \ll 1$, en esta expresión m corresponde a la relación entre el índice de las partículas dispersoras n_s y el medio externo n_o , a el radio de las partículas y λ la longitud de onda incidente.

²⁰⁰ MOURANT, Judith R., et al. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. Applied optics, 1998, vol. 37, no 16, pp. 3586-3593.

La intensidad dispersada Rayleigh para N partículas distribuidas al azar con una distancia media entre partículas mayor que λ , tiene una dependencia angular dada por la siguiente expresión:

$$I(r, \theta) = (2\pi)^4 \frac{a^6}{\lambda^4 r^2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 N \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} = I_0 \quad (5.1.3)$$

Siendo r la distancia de ubicación del detector y I_0 la intensidad de la onda incidente no polarizada. La onda incidente casi siempre esta polarizada, así que la onda dispersada tendrá dos componentes ortogonales entre sí, una componente paralela $\vec{E}_{\parallel s}$ y otra perpendicular $\vec{E}_{\perp s}$ al plano de dispersión²⁰¹, ver figura 4.1.1b.

Cuando se utiliza luz NIR, los dispersores biológicos en los que la teoría de Rayleigh sigue siendo válida son de un radio máximo aproximado de $12 - 14 \text{ nm}$ los cuales tiene un valor del parámetro m entre $1.05 - 1.10$. La teoría de Rayleigh-Gans o Rayleigh-Debye aborda el cálculo de la dispersión para una clase especial de partículas con formas arbitrarias, con las condiciones $|m - 1| \ll 1$ y $\frac{2\pi a}{\lambda} |m - 1| \ll 1$ donde a es la dimensión más grande de la partícula^{202, 203}. Estas condiciones significan que el campo eléctrico incidente entra en la partícula e interactúa con sus componentes, interpretándose como una colección de dipolos independientes en donde todos están expuestos al mismo campo incidente. Las células podrían modelarse como una esfera de citoplasma con un índice de refracción $n_c = 1.370$ más alto que el medio intersticial circundante $n_i = 1.350$ con $m = 1.015$, entonces está teoría sería válida para una partícula con una dimensión hasta un rango

²⁰¹ HULST, Hendrik Christoffel; VAN DE HULST, Hendrik C. Light scattering by small particles. Courier Corporation, 1981.

²⁰² BOHREN, Craig F.; HUFFMAN, Donald R. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley & Sons, 2008.

²⁰³ TUCHIN, Valery V. Laser light scattering in biomedical diagnostics and therapy. Journal of laser applications, 1993, vol. 5, no 2, pp. 43-60.

máximo de $a = 850 - 950 \text{ nm}$. Con esta aproximación se han realizado cálculos de dispersión de la luz de bacterias en suspensión²⁰⁴.

5.1.4 Dispersión Mie. Para partículas esféricas cuyo diámetro no es muy superior a la longitud de onda incidente, Mie formuló una expresión matemática para estudiar la dispersión de este tipo de esferas utilizando las ecuaciones de Maxwell. La intensidad dispersada por un ensamble de N partículas distribuidas con una distancia media entre ellas más grande que la longitud de onda incidente λ es descrita según la teoría de Mie por la siguiente expresión:

$$I(\theta) p^{mie}(\theta) N I_0, \quad (5.1.4)$$

Siendo I_0 la intensidad inicial no polarizada y $p^{mie}(\theta)$ la función de fase de Mie dada por:

$$p^{Mie}(\theta) = \frac{\lambda_0^2}{2\pi n_0^2 \sigma_s^{Mie}} (|S_1|^2 + |S_2|^2), \quad (5.1.5)$$

Con σ_s^{Mie} la sección eficaz de dispersión bajo la solución de Mie, n_0 el índice del material y S_1 y S_2 las funciones de dispersión en función del ángulo polar. Toda la solución se propone suponiendo un índice de refracción complejo, en el cual la parte imaginaria es asociado con pérdidas por absorción. Todas las expresiones matemáticas y cálculos sobre la dispersión de Rayleigh y Mie pueden seguirse de la referencia²⁰⁵.

De la teoría de Mie se infirió que las partículas esféricas del tamaño de $1\mu\text{m}$ producen una mayor dispersión si la longitud de onda incidente es del orden de su tamaño, además el coeficiente de dispersión aumenta si m el índice de refracción

²⁰⁴ TUCHIN, Valery V. Polarized light interaction with tissues. Journal of biomedical optics, 2016, vol. 21, no 7, p. 071114.

²⁰⁵ HULST, Hendrik Christoffel; VAN DE HULST, Hendrik C. Light scattering by small particles. Courier Corporation, 1981.

relativo aumenta, por el contrario si los índices de refracción de los dispersores y del medio son muy parejos el coeficiente de dispersión se reduce a cero y la absorción es predominante.

En el caso de la aplicación de luz NIR la longitud de onda incidente λ es menor al radio a de las partículas $\lambda \ll 2a$, así que la teoría de Mie puede implementarse a través de la aproximación de Van Hulst, en la cual la sección eficaz de dispersión varía periódicamente con el inverso de la longitud de onda incidente y da lugar a un componente periódico en la reflectancia óptica del tejido. Dado que la frecuencia de esta variación (en el espacio de longitud de onda inversa) es proporcional al tamaño de partícula, la distribución del tamaño nuclear se puede obtener a partir de la transformada de Fourier del componente periódico²⁰⁶.

Estos modelos de partículas mono-dispersoras distantes con una única dispersión son buenas aproximaciones para estudiar muestras delgadas de tejidos, pero para los estudios de muestras *in vivo* como el tejido mamario el fenómeno de dispersión es más complejo, pues este se compone de partículas de diferentes tamaños e irregulares que producirán una gran dispersión anisotrópica y por ende ocurrirán múltiples eventos dispersores.

5.1.5 Teoría de transporte radiativo. Un modelo teórico que considera un gran número de interacciones es el caso de la teoría de transporte radiativo (Radiative Transport Equation RTE) la cual, básicamente describe la propagación de la radiación electromagnética en un medio, donde ésta puede ser emitida, dispersada y absorbida^{207, 208}. La ecuación básica de esta teoría que describe los fenómenos antes mencionados, es llamada la ecuación de transporte. Dicha ecuación es deducida heurísticamente utilizando el principio de conservación de energía, lo que

²⁰⁶ Ibid.

²⁰⁷ CHANDRASEKHAR, Subrahmanyam. Radiative transfer. Courier Corporation. 2013.

²⁰⁸ CASE, Kenneth M.; ZWEIFEL, Paul Frederick. Linear transport theory. 1967.

produce que la teoría del transporte radiativo también lo sea. A pesar de esto, es una teoría muy versátil, pues ha sido utilizada para describir la propagación de la radiación proveniente de estrellas, galaxias e incluso para modelar la propagación de la radiación en el tejido biológico, ver ecuación 4.1.6.

$$\frac{\partial L(\vec{r}, \hat{s}', t)/c}{\partial t} = -\hat{s} \cdot \nabla L(\vec{r}, \hat{s}, t) - \mu_t L(\vec{r}, \hat{s}, t) + \mu_s \int_{4\pi} L(\vec{r}, \hat{s}'t) p(\hat{s}, \hat{s}') dw' + S(\vec{r}, \hat{s}'t), \quad (5.1.6)$$

en esta expresión $L(\vec{r}, \hat{s}, t)$ es la radiancia o densidad de flujo radiante propagándose en una dirección específica, por unidad de área, por unidad de tiempo y de ángulo sólido, la cantidad $S(\vec{r}, \hat{s}, t)$ es la fuente, $\hat{s}$ un vector unitario en la dirección inicial de haz de luz, $\hat{s}'$ un vector unitario en la dirección de dispersión, μ_t el coeficiente de atenuación total que considera absorción y dispersión y $p(\hat{s}, \hat{s}')$ la función de fase.

Para solucionar esta ecuación integro diferencial se utilizan soluciones numéricas que requieren un gasto computacional debido a su dependencia en la posición, ángulos y el tiempo²⁰⁹, esto implica plantear diferentes aproximaciones para su solución. Probablemente la aproximación más usada es la ecuación de difusión, ver ecuación 4.1.7, que es válida en medios ópticos densos $\mu_s l \ll 1$ y $\mu_a \ll \mu_s$ siendo l la longitud característica del medio, siempre que el punto de observación este lejos de la fuente de luz y las interfaces.

$$\frac{\partial \Phi(\vec{r}, t)/c}{\partial t} \mu_a \Phi(\vec{r}, t) - \nabla \cdot D \nabla \Phi(\vec{r}, t) = S(\vec{r}, t), \quad (5.1.7)$$

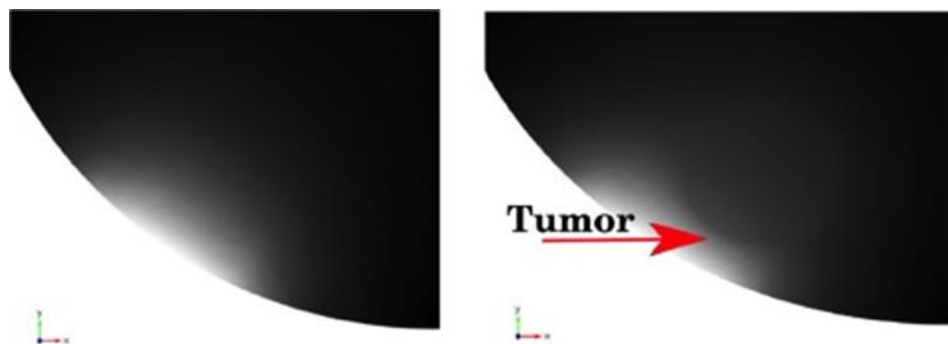
en esta aproximación $\Phi(\vec{r}, t)$ es la tasa de fluencia o intensidad, que se define como la potencia por unidad de tiempo que incide sobre una esfera infinitesimal,

²⁰⁹ WANG, Lihong V.; WU, Hsin-i. Biomedical optics: principles and imaging. John Wiley & Sons, 2012.

independientemente de la dirección del flujo y D es el coeficiente de difusión. La ecuación de difusión se utiliza en técnicas ópticas para reconstrucción de imágenes de mamas como la DOT²¹⁰.

Para mostrar la forma en como la técnica DOT funciona se presenta un modelo teórico de una mama a partir de datos clínicos reportados en el año 2007 por el Dr. Alper Corlu y colaboradores²¹¹ [170], se considera la mama como semiesfera de radio $r = 7\text{cm}$, con coeficiente de absorción y dispersión reducida dados por $\mu_a(786\text{nm}) = 0.041\text{cm}^{-1}$ y $\mu_s(786\text{nm}) = 8.5\text{cm}^{-1}$; estos son valores reportados para mamas sanas²¹² [171]. Dentro de la mama a una distancia del centro de la esfera, se localiza el tumor de 1cm de diámetro y coeficientes de absorción $\mu_a\text{ICG} = 0.1\text{cm}^{-1}$ y dispersión reducida $\mu_s(786\text{nm}) = 1.5\text{cm}^{-1}$, con medio de contraste ICG; el medio de contraste sólo está en el tumor. A partir de la expresión de la ecuación de difusión (4.1.7) para fuentes de luz monocromática, se calcula la intensidad o tasa de fluencia dentro de la mama para los coeficientes antes reportados. En la figura 4.1.4, se presenta un corte en el plano xy , del sistema mama tumor sin agente (izquierda) y con agente ICG (derecha).

Figura 19. Corte en el plano XY, del sistema mama tumor antes (Izquierda) y después del agente de contraste ICG (Derecha). Imagen obtenida con COMSOL.



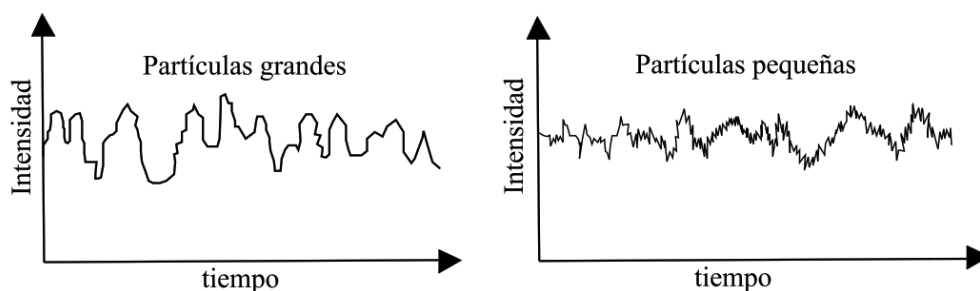
²¹⁰ Ibíd.

²¹¹ CORLU, Alper, et al. Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans. Optics express, 2007, vol. 15, no 11, pp. 6696-6716.

²¹² CHOE, Regine. Diffuse optical tomography and spectroscopy of breast cancer and fetal brain. University of Pennsylvania, 2005.

5.1.6 Cuantificación del movimiento de partículas en solución. La luz NIR retro-dispersada puede emplearse para obtener información cuantitativa acerca del movimiento de las partículas que se encuentran en suspensión en el medio con el que interactúa la onda de luz. En el tejido, el desplazamiento de las partículas dentro del medio, es aleatorio y puede modelarse como un movimiento Browniano. Este movimiento es aleatorio debido al bombardeo de las partículas del disolvente que las rodea, movimiento que está relacionado con el tamaño de las partículas, de tal forma que cuanto mayor sea la partícula menor será el movimiento Browniano y viceversa, figura 4.1.5; entonces si se sigue este movimiento a intervalos de tiempo cortos, puede obtenerse información de cuánto se ha movido la partícula y relacionarlo así con su tamaño y distribución. La velocidad del movimiento Browniano de las partículas se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión de traslación D y se relaciona con el tamaño de la partícula por medio de la ecuación de Stokes-Einstein: $d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$, donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D el coeficiente de difusión traslacional (m^2s^{-1}), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} N m K^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad (Nsm^{-2})²¹³.

Figura 20. Fluctuaciones en la intensidad dispersada de acuerdo al tamaño de partículas que se difunden en un movimiento Browniano



Fuente: PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. The Journal of Chemical Physics, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

²¹³ EINSTEIN, Albert. On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the molecular-kinetic theory of heat (English translation, 1956). Investigations on the theory of the Brownian movement, 1905.

Este desplazamiento Browniano de las partículas fue estudiado por Clark y colaboradores realizando un análisis de la intensidad dispersada por el medio [30]. En su trabajo midieron la intensidad de la luz dispersada por una superposición instantánea de las fases de las ondas dispersadas por cada una de las partículas difusoras y las fluctuaciones temporales de la intensidad debido al movimiento de las partículas. Esta intensidad de luz dispersada es proporcional al cuadrado del campo eléctrico dispersado, dada por la siguiente expresión:

$$I(t) = \beta \left| \sum_{j=1}^N E'_0 e^{i\Phi_j(t) - i\omega_0 t} \right|^2 \quad (5.1.8)$$

En esta ecuación, β es una constante de proporcionalidad, E'_0 es la amplitud del campo eléctrico dispersado por cada una de las partículas independientemente de la posición de las mismas, dado por:

$$E'_0 = E_0 \left[e^{i\vec{K}_s \cdot \vec{R}} / R \right] (w_0/c)^2 (\alpha - \alpha_0) V \sin(\Phi) \quad (5.1.9)$$

En donde $\vec{K}_s$ es el vector de la onda dispersada, Φ el ángulo entre la dirección de polarización E_0 y la dirección $\vec{K}_s$ de la onda dispersada, $(\alpha - \alpha_0)$ es la diferencia entre la polarizabilidad del dipolo de la partícula y el solvente, V el volumen de la partícula dispersada, j el factor fase de la j esima partícula y w_0 la frecuencia del campo eléctrico incidente. Dado que la difusión de las partículas es aleatoria, el campo eléctrico dispersado y la intensidad dispersada se cuantifican como variables aleatorias, a través de la intensidad promedio $\langle I(t) \rangle, \langle E(t) \rangle$ y las funciones de correlación $\langle I(t) \rangle I(t + \tau)$ y $\langle E^*(t) E(t + \tau) \rangle$, en donde τ es el tiempo en el que la partícula se ha desplazado $r(t + \tau)$. Estas funciones de correlación son medidas al construir ensambles de sistemas con características similares, para luego medir $\langle I(t) \rangle$ y $\langle I(t + \tau) \rangle$ y ensambles similares para realizar el producto de estas dos. Cuando las variaciones temporales de $\langle I(t) \rangle$ son una constante,

entonces $\langle I(t) I(t + \tau) \rangle$ es independiente del tiempo de inicio, dependiendo solo de la diferencia τ . De esta manera, Clark calculó el espectro del campo eléctrico dispersado y la intensidad dispersada por las partículas, los cuales están dados por las siguientes expresiones:

$$S_E(w) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{iwt} \langle E^*(t) E(t + \tau) \rangle d\tau \quad (5.1.10)$$

$$S_I(w) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{iwt} \langle I(t) I(t + \tau) \rangle d\tau \quad (5.1.11)$$

Al utilizar estas funciones de correlación y la transformada de Fourier, Clark encuentra el espectro de la foto-corriente asociada a la intensidad dispersada por las partículas dada por:

$$S_I(w) = \langle i \rangle^2 \left(2\pi\delta(w) + 2(2DK^2) / (w^2 + 2(2DK^2)) \right) + Ge\langle i \rangle, \quad (5.1.12)$$

Esta expresión contiene tres sub-expresiones, la primera está vinculada con la componente dc $2\pi\delta(w)$, la segunda con las fluctuaciones en la intensidad del espectro y el espectro del ruido que produce la foto-corriente y el tercer término Ge es la ganancia del fotomultiplicador. Esta última expresión permite calcular las variaciones asociadas a las partículas de interés en el medio de estudio. Siendo $\langle i \rangle$ el promedio de la foto-corriente y K la magnitud de la diferencia entre los vectores de las ondas incidente y dispersada.

A partir de la medición del movimiento de las partículas en un fluido se puede determinar su tamaño si se conocen la temperatura y la viscosidad. La medida óptica del movimiento Browniano de partículas en suspensión se conoce como la técnica dispersión dinámica de la luz (Dynamic light scattering, DLS), propuesta por Dubin

y Pecora en 1967²¹⁴, ²¹⁵, quienes fundamentaron sus medidas experimentales en el método propuesto por Clark.

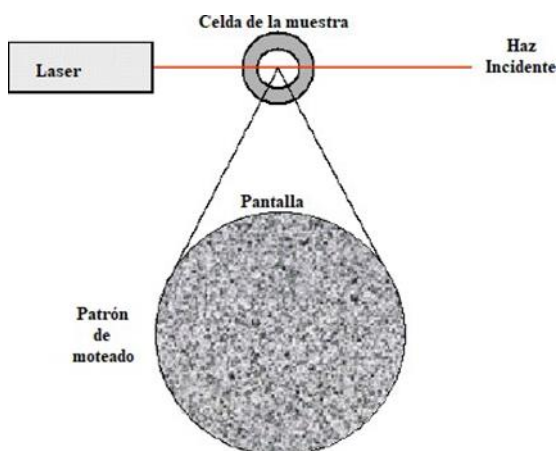
5.1.7 Técnica DLS. Esta técnica mide la velocidad a la que fluctúa la intensidad de la luz dispersada por partículas en suspensión que se difunden debido a un movimiento Browniano. Para explicar cómo surgen estas fluctuaciones en la intensidad dispersada, se supone un experimento mental en el que una cubeta de vidrio contiene partículas suspendidas sin movimiento dentro de un líquido. Cuando este sistema es iluminado con luz láser y se utiliza una pantalla de vidrio esmerilado u opacado para observar la luz dispersada, se verá un patrón de moteado (Speckle) estacionario, producto de la interferencia constructiva (zonas brillantes) o destructiva (zonas oscuras) de la luz dispersada, ver figura 4.1.6. En un experimento real las partículas en suspensión experimentan un movimiento aleatorio o Browniano, en el que se observa un patrón moteado que cambia constantemente debido al cambio en la posición de cada mota dentro del patrón. Esto ocurre porque la luz dispersada por cada partícula varía en el tiempo, lo que ocasiona que la adición o sustracción de la fase de origen a un nuevo patrón de moteado²¹⁶.

²¹⁴ DUBIN, Stuart B.; LUNACEK, Joseph H.; BENEDEK, George B. Observation of the spectrum of light scattered by solutions of biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1967, vol. 57, no 5, p. 1164.

²¹⁵ PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. *The Journal of Chemical Physics*, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

²¹⁶ INSTRUMENTS, Malvern. *Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes*. Technical Note Malvern, MRK656-01, 2012, vol. 1.

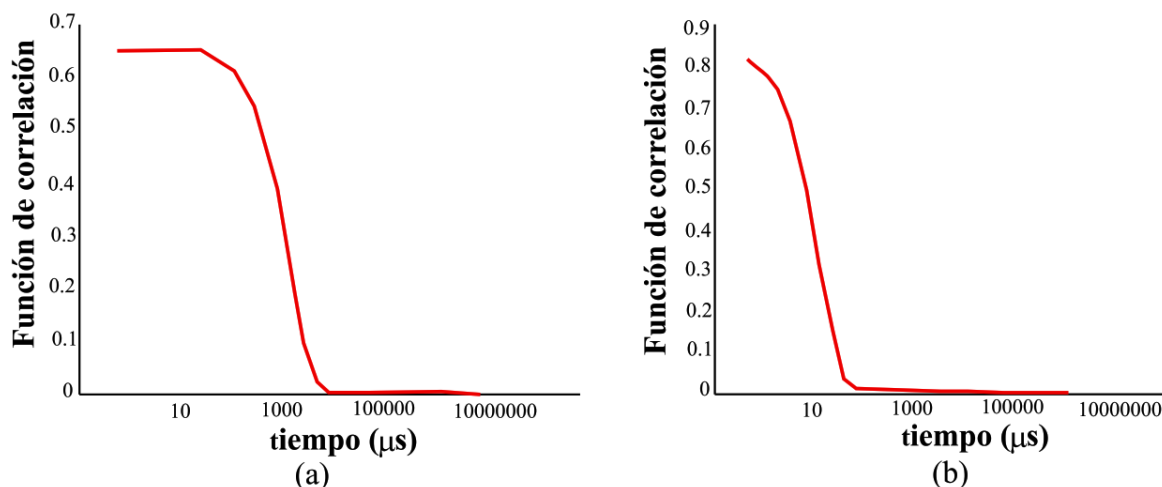
Figura 21. Representación esquemática del patrón de moteado (Speckel) debido a la luz dispersada por partículas estacionarias suspendidas en una cubeta.



Fuente: PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. The Journal of Chemical Physics, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

Para determinar el tamaño de las partículas en suspensión que describen este movimiento Browniano se utiliza la señal guardada de luz dispersada en función del tiempo, este cálculo se realiza mediante una función de correlación. Esta función fue diseñada para medir los grados de similitud entre dos señales o una señal consigo misma en intervalos de tiempo variables. Cuando la señal se compara consigo misma en un momento determinado y uno mucho más tarde, esta señal fluctuante al azar no tendrá correlación, sin embargo, si la intensidad de la señal en un tiempo t se compara con un tiempo $(t + \delta t)$ siendo δt un tiempo muy pequeño denominado tiempo de muestreo o el correlacionador, habrá una fuerte correlación. Usualmente δt es del orden de nanosegundos o microsegundos, en cuanto que el tiempo total de la señal es del orden de milisegundos. La función de correlación de la señal tomará valores entre 1 y 0 para indicar si hay o no correlación (similitud) respectivamente, el tiempo en el cual la correlación comienza a decaer significativamente es un indicador del tamaño medio de la muestra, según el cual, a mayor tiempo mayor tamaño, figura 4.1.7a y viceversa para partículas pequeñas, figura 4.1.7b. Entre más inclinada sea la línea de la función de correlación más monodispersa y cuanto más extendida mayor es la polidispersidad.

Figura 22. Representación esquemática de la función de correlación con respecto al tamaño partículas grandes (a) y pequeñas (b).



Fuente: PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. The Journal of Chemical Physics, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

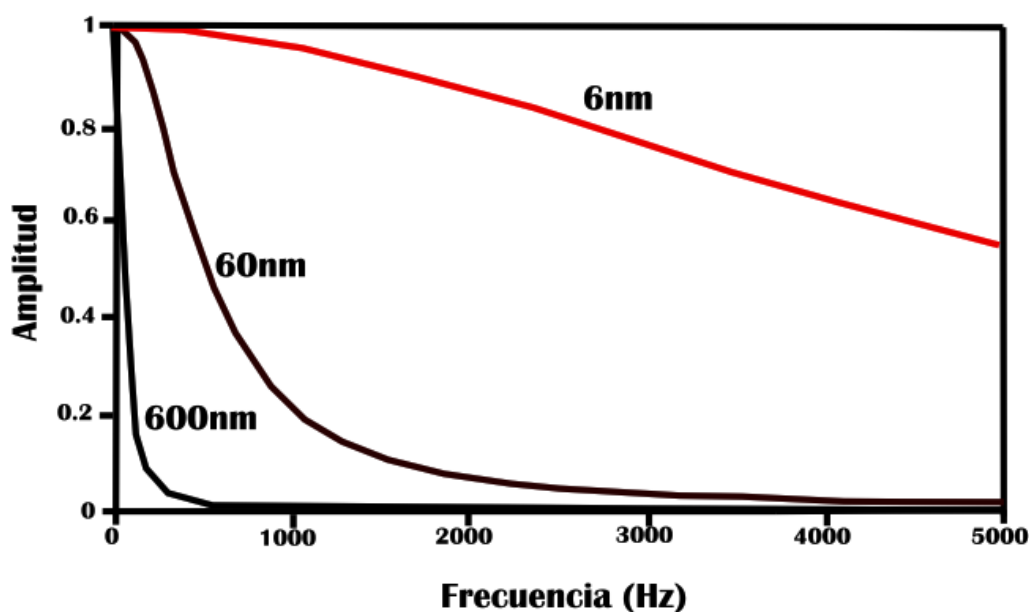
Experimentalmente la técnica DLS tiene seis componentes principales: Luz láser, un atenuador, una cubeta contenedora de las partículas, un detector que puede estar a 173° o 90°, un correlador y una computadora. Inicialmente la luz láser proporciona una fuente para iluminar la muestra contenida en la celda, esta luz puede pasar a través de la muestra cuando tiene una concentración diluida, pero en algunas ocasiones hay luz dispersada en diferentes direcciones, por lo que el detector puede estar a 173° o 90° grados con respecto a la dirección inicial del haz. Si se detecta demasiada luz el detector se satura, entonces se utiliza el atenuador que puede aumentar o disminuir el paso de luz. La señal detectada pasa a un tablero digital o correlador, el cual procesa la intensidad dispersada con una función de correlación que le permite determinar la velocidad a la que la intensidad varía, esta información va a una computadora que analiza los datos y obtiene información del tamaño de las partículas.

El movimiento aleatorio de las partículas suspendidas medido en función del tiempo, figura 4.1.5, forma en el espacio de frecuencias una distribución correspondiente a

una frecuencia que es inversamente proporcional al tamaño de la partícula, el cual se calcula a partir de la función de auto-correlación.

De la potencia espectral (de la intensidad dispersada) en función de la frecuencia es posible también observar como el tamaño de las partículas tiene una relación inversa con la frecuencia, ver figura 4.1.8. Esta potencia espectral de una señal en el tiempo permite ver en cuales frecuencias de la señal está contenida la potencia²¹⁷. En esta figura se observa como las partículas de 600nm tiene una fuerte contribución de las frecuencias menores a 0.5kHz, las de 60nm menores a 5kHz y las de 6nm aproximadamente menores a 50kHz.

Figura 23. Potencia espectral para diferentes tamaños de partículas colocados en suspensión y medidos a través del principio de la técnica DLS.



Fuente: PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. The Journal of Chemical Physics, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

²¹⁷ FREUD, Paul J. Nanoparticle Sizing: Dynamic Light Scattering Analysis in the Frequency Spectrum Mode. Application Note: Microtrach Inc, 2007.

5.1.8 Movimiento Browniano en tejidos. La migración celular y el movimiento de los diferentes organismos dentro del tejido son usualmente descritos como un movimiento Browniano²¹⁸. El movimiento celular puede ser atribuido como una respuesta a una señal externa proveniente de su entorno. Esta señal puede tener un origen físico o químico que es detectado por las proteínas receptoras ubicadas en la membrana celular, que a su vez transmiten esta señal a través de cascadas de señalización hacia el interior de la célula²¹⁹. Este movimiento es crítico en algunas enfermedades como el desarrollo tumoral y el proceso de metástasis, donde las células desde un tumor primario, se mueven hacia otras partes del cuerpo.

Varios estudios han propuesto modelos teóricos con la aproximación de difusión y el movimiento Browniano para estudiar los procesos que ocurren dentro la célula y/o alrededor de la misma, también para entender por medio de imágenes la interacción del tejido con agentes químicos para rastrear los procesos de crecimiento tumoral y respuesta al tratamiento de quimioterapia^{220, 221}.

5.2 ANTECEDENTES

Para prevenir la aparición del cáncer es fundamental la detección temprana de la enfermedad. En el tejido mamario, el auto examen de seno y la mamografía son los métodos de detección más usados en Colombia y en varios países a nivel mundial. El primero permite distinguir masas, protuberancias, dolor o cambios físicos visibles, el segundo visualizar por medio de una interacción del tejido con radiación ionizante

²¹⁸ TSEKOV, Roumen; LENSEN, Marga C. Brownian Motion and the Temperament of Living Cells. Chinese Physics Letters, 2013, vol. 30, no 7, p. 070501.

²¹⁹ ANANTHAKRISHNAN, Revathi; EHRLICHER, Allen. The forces behind cell movement. International journal of biological sciences, 2007, vol. 3, no 5, p. 303.

²²⁰ YANKEELOV, Thomas E., et al. Clinically relevant modeling of tumor growth and treatment response. Science translational medicine, 2013, vol. 5, no 187, p. 187ps9-187ps9.

²²¹ BLOCK, Stephan. Brownian Motion at Lipid Membranes: A Comparison of Hydrodynamic Models Describing and Experiments Quantifying Diffusion within Lipid Bilayers. Biomolecules, 2018, vol. 8, no 2, p. 30.

la ubicación y el tamaño de las masas, pero ninguno de los dos métodos puede verificar si son benignas o malignas sin invadir el tejido, ni identificar neoplasias no palpables, ni cambios en el tejido que conduzcan al cáncer²²².

Por su naturaleza física la luz ionizante (rayos X) implementada por la mamografía limita la implementación de este método para mujeres menores de 40 años y es recomendada una o dos veces al año después de esta edad, dependiendo de la historia clínica del paciente²²³.

Conforme el avance de la detección de cáncer aumenta, se plantea la necesidad de contar con tecnologías para la detección temprana del mismo, es decir, detección de neoplasias conducentes a cáncer de mamas, que sea de bajo costo, fácil implementación en poblaciones grandes y de alto riesgo, además de ser compatible con programas de prevención y promoción de esta enfermedad²²⁴.

En el ámbito internacional hay determinados avances que es importante describir. Algunos centros de investigación se han dedicado a la caracterización óptica del contraste asociado al cáncer de mama y a identificar los índices ópticos que se correlacionan con la presencia de cáncer^{225, 226}, mediante la medición de cambios en las propiedades ópticas de mama relacionadas con el envejecimiento, la actividad

²²² PERRY, F.; et al. Guía de Práctica Clínica para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del Cáncer de Mama. Instituto Nacional de Cancerología ESE; Instituto Nacional de Cancerología; Ministerio de Salud y Protección Social; y Colciencias. 2012.

²²³ DÍAZ, Sandra; PIÑEROS, Marion; y SÁNCHEZ, Oswaldo. Detección temprana del cáncer de mama: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. Revista Colombiana Cancerología. 2005. Vol. 9(3): pp. 93–105.

²²⁴ DE CHARRY, Ligia Constanza; CARRASQUILLA, Gabriel y ROCA, Sandra. Equidad en la detección del cáncer de seno en Colombia. Revista de Salud Pública. pp. 10: 571–582, 2008.

²²⁵ SHAH, Natasha, et al. Noninvasive functional optical spectroscopy of human breast tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, vol. 98, no 8, p. 4420-4425.

²²⁶ PATEL, Nimit, et al. Relative capacities of time-gated versus continuous-wave imaging to localize tissue embedded vessels with increasing depth. Journal of biomedical optics, 2010, vol. 15, no 1, p. 016015.

hormonal y el ciclo menstrual^{227, 228}. Dichos estudios han sido realizados, sobre el tejido de mama *in-vitro*^{229, 230, 231}, *in-vivo*^{232, 233, 234}, y los tumores de mama *in-vivo*^{235, 236}. Un resultado importante de todos los estudios realizados hasta el momento es que la imagen obtenida con infrarrojo cercano (Near Infrared NIR) es muy sensible a la concentración de oxihemoglobina presente en la sangre, un indicador funcional que no se mide directamente con otras modalidades existentes de diagnóstico de imágenes mamarias²³⁷.

Otras técnicas experimentales surgen bajo este principio, conocidas como espectroscopia funcional de infrarrojo cercano (fNIR) y termografía (imagen infrarroja). La fNIR permite obtener información del tejido por medio del envío de radiación infrarroja a través de los tejidos y la posterior detección de la radiación transmitida, reflejada o dispersada, para determinar el grado de oxigenación de la

²²⁷ CUBEDDU, Rinaldo, et al. Effects of the Menstrual Cycle on the Red and Near-infrared Optical Properties of the Human Breast. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 72, no 3, pp. 383-391.

²²⁸ CERUSSI, Albert E., et al. Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography. *Academic radiology*, 2001, vol. 8, no 3, p. 211-218.

²²⁹ PETERS, Victor George, et al. Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. *Physics in Medicine & Biology*, 1990, vol. 35, no 9, p. 1317.

²³⁰ KEY, H., et al. Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths. *Physics in medicine & biology*, 1991, vol. 36, no 5, p. 579.

²³¹ DURDURAN, Turgut, et al. Bulk optical properties of healthy female breast tissue. *Physics in Medicine & Biology*, 2002, vol. 47, no 16, p. 2847.

²³² SUZUKI, Kazunori, et al. Quantitative measurement of optical parameters in normal breasts using time-resolved spectroscopy: in vivo results of 30 Japanese women. *Journal of biomedical optics*, 1996, vol. 1, no 3, p. 330-335.

²³³ HEUSMANN, Hans, et al. Spectral transillumination of human breast tissue. En *Optical Tomography, Photon Migration, and Spectroscopy of Tissue and Model Media: Theory, Human Studies, and Instrumentation*. International Society for Optics and Photonics, 1995. p. 798-808.

²³⁴ FRANGIONI, John V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology*, 2003, vol. 7, no 5, pp. 626-634.

²³⁵ TARONI, Paola, et al. Do shorter wavelengths improve contrast in optical mammography? *Physics in Medicine & Biology*, 49(7): 2004. p. 1203.

²³⁶ VAN VEEN, R. L. P., et al. Intraoperatively assessed optical properties of malignant and healthy breast tissue used to determine the optimum wavelength of contrast for optical mammography. *Journal of biomedical optics*, 2004, vol. 9, no 6, p. 1129-1137.

²³⁷ DRAVIDA, Swethasri, et al. Comparison of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin signal reliability with and without global mean removal for digit manipulation motor tasks. *Neurophotronics*, 2017, vol. 5, no 1, p. 011006.

sangre en un momento determinado²³⁸. Por su parte, la termografía mamaria, implementando una cámara infrarroja detecta patrones inusuales de calor en el tejido mamario²³⁹.

La implementación de la espectroscopia NRI como herramienta para la detección del cáncer esta soportada en: primero, los tejidos biológicos presentan una ventana óptica, es decir, son relativamente transparentes, a la radiación NIR 600-900 nm y segundo, en los tejidos biológicos existen sustancias cromóforas (moléculas capaz de absorber luz), con un gran coeficiente de absorción en el infrarrojo cercano. En otras palabras, con la espectroscopia NIR es posible estudiar la angiogénesis de un tejido estudiando la absorción óptica de la hemoglobina^{240, 241, 242}.

Con respecto a los métodos que usan la luz retro-dispersada NIR por el tejido, hay diversos estudios teóricos y experimentales que evidencian diferencias en el tejido normal y cancerígeno^{243, 244}. Entre las técnicas que miden luz retro-dispersada esta PWS, esta técnica genera una onda casi plana de luz blanca que ilumina las células. Con esta interacción se construye una imagen que permite extraer el espectro asociado a cada pixel, este espectro contiene las múltiples interferencias de las ondas de luz que viajan aproximadamente en una trayectoria unidimensional

²³⁸ SOLIMAN, Hany, et al. Functional imaging using diffuse optical spectroscopy of neoadjuvant chemotherapy response in women with locally advanced breast cancer. *Clinical cancer research*, 2010, vol. 16, no 9, p. 2605-2614.

²³⁹ ACHARYA, U. Rajendra, et al. Thermography based breast cancer detection using texture features and support vector machine. *Journal of medical systems*, 2012, vol. 36, no 3, pp. 1503-1510.

²⁴⁰ FARIS, F., et al. Non-invasive optical monitoring of cerebral blood oxygenation in the foetus and newborn: preliminary investigation. *Journal of biomedical engineering*, 1992, vol. 14, no 4, pp. 303-306.

²⁴¹ MCBRIDE, Troy. Spectroscopic reconstructed near infrared tomographic imaging for breast cancer diagnosis. Tesis Doctoral. Dartmouth College. 2001.

²⁴² BASHKATOV, Alexey N.; GENINA, Elina A.; TUCHIN, Valery V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2011, vol. 4, no 01, pp. 9-38.

²⁴³ BACKMAN, V., et al. Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*, 2000, vol. 406, no 6791, p. 35.

²⁴⁴ QIU, Le, et al. In Vivo Optical Detection of Dysplasia in Barrett's Esophagus with Endoscopic Light Scattering Spectroscopy. En *Barrett's Esophagus*. Academic Press, 2016. pp. 91-104.

correspondiente al pixel. Esta señal retro-dispersada es extremadamente sensible a fluctuaciones en el índice de refracción a escala nanométrica²⁴⁵.

PWS aprovecha la existencia del efecto de campo carcinogénico, pues el tejido aparentemente normal (recto, boca, cerviz) alejado a varios centímetros de distancia del tejido anómalo (colón, pulmón, ovario), contiene alteraciones del orden micrómetro y nanométrico²⁴⁶. El arreglo experimental de PWS detecta el desorden a nivel de la cromática dentro de las células midiendo un parámetro de desorden que está relacionado con el índice de refracción de los tejidos. La forma en como está organizada la cromatina dentro de la célula es un medidor de los procesos moleculares, incluida la transcripción, la replicación y la reparación del ADN. Además, las estructuras que regulan los procesos dentro de la cromatina abarcan desde los niveles nucleosómicos (10 nm) hasta los niveles cromosómicos (> 200 nm)²⁴⁷. Esta técnica permite detectar células cancerosas aun cuando la imagen del microscopio óptico no muestra diferencias significativas.

Con base a lo anteriormente mencionado, la luz retro-dispersada por el tejido mamario contiene información relacionada con el estado del tejido, dado que los tejidos se pueden interpretar como elementos compuestos por moléculas en medios acuosos que describen movimientos Brownianos, por la temperatura y su interacción con el medio, en medidas de luz retro-dispersada, se puede estudiar el efecto de la dinámica de los centros dispersores del tejido, de la cual se espera observar las diferentes contribuciones espectrales entre tejidos normales y anormales, debido a las alteraciones bioquímicas presentes en los tejidos anormales.

²⁴⁵ SUBRAMANIAN, Hariharan, et al. Partial-wave microscopic spectroscopy detects subwavelength refractive index fluctuations: an application to cancer diagnosis. *Optics letters*, 2009, vol. 34, no 4, pp. 518-520.

²⁴⁶ BAUER, Greta M., et al. The transformation of the nuclear nanoarchitecture in human field carcinogenesis. *Future science OA*, 2017, vol. 3, no 3, p. FSO206.

²⁴⁷ CHANDLER, John, et al. High-speed spectral nanocytology for early cancer screening. *Journal of biomedical optics*, 2013, vol. 18, no 11, p. 117002.

5.3 DETECCIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA FED-SA

FED-SA por sus siglas en inglés, Field cancerization detection by spectral analysis, se diseñó para detectar el efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario por medio de un análisis espectral de la luz NIR retro-dispersada por el mismo, este método se propuso en base a la solicitud de patente de invención número NC2017 / 0003413.

Se ha propuesto en esta investigación que los cambios generados por anomalías localizadas dentro del tejido mamario no están localizadas únicamente alrededor de las mismas, si no esparcidas en todo el tejido, es decir; el efecto de campo carcinogénico no es un efecto local. Esto implica que el surgimiento de algunas anomalías modificará toda la señalización celular dentro del tejido²⁴⁸.

Estos cambios en la señalización celular ya han sido verificados en el cáncer de mamas²⁴⁹, pero aun no existen técnicas ópticas que puedan medir directamente el surgimiento o supresión de todas las proteínas involucradas en el proceso. De hecho un posible primer paso es medir la amplificación de las anomalías, a través de pacientes con alteraciones verificadas clínicamente, de esta forma al comparar entre la dinámica celular de todo el tejido mamario de una mama sana y una anormal se espera observar que la dinámica del tejido ha cambiado.

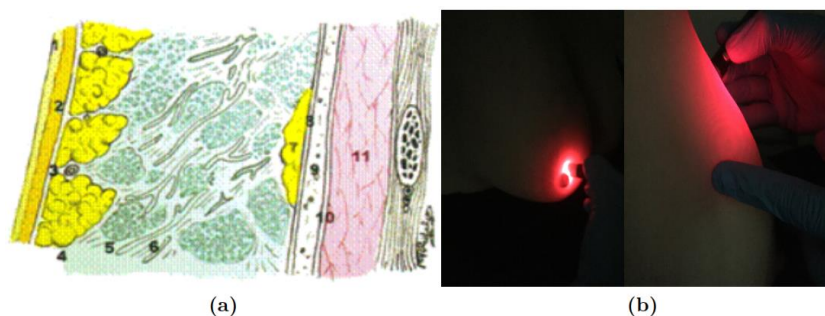
Para estudiar la dinámica del tejido, la información que se recolecta es principalmente recuperada de la luz NIR retro-dispersada por el tejido mamario en función del tiempo. Esta luz se encuentra a su paso una capa de células muertas denominadas stratum corneum que producen reflexión del haz entre 5-7 %, estas se

²⁴⁸ [70] FERNÁNDEZ, Janeth, et al. Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells? Medical hypotheses, 2016, vol. 97, pp. 107-111.

²⁴⁹ [55] MCCLESKEY, Brandi C., et al. GATA3 expression in advanced breast cancer: prognostic value and organ-specific relapse. American journal of clinical pathology, 2015, vol. 144, no 5, pp. 756-763.

consideran ubicadas dentro de la epidermis que es una capa de 0.027-0.15 *mm*. La epidermis tiene propiedades de absorción dominadas por la melanina, un cromóforo natural producido por las células melanocitos y tiene propiedades de dispersión. Estas dos capas de la piel se caracterizan por generar una dispersión de la luz hacia adelante. Posteriormente, se encuentra la dermis de 0.6-3 *mm*, que se encuentra compuesta por tejido conectivo irregular, nervios y vasos sanguíneos. Después esta la fascia superficial que se compone de tejido conectivo supraglandular, ligamentos de Cooper y vasos sanguíneos y finalmente, podría llegar hasta el tejido adiposo interglandular, ver figura 4.3.1a. Estas dos últimas capas no tienen valores específicos de tamaño pues este varía de un cuerpo a otro, es posible que en algunas mujeres la luz NIR llegue sólo hasta la fascia superficial y en otras alcance el tejido adiposo, esto debido a que la luz NIR tiene una profundidad aproximada de 0.5 *cm*, ver figura 4.3.1b y el tamaño de la glándula mamaria desde el pezón hasta el pectoral en una mujer joven es en promedio de 21cm²⁵⁰.

Figura 24. a. Anatomía de la mama: 1. epidermis, 2. dermis, 3. fascia superficial, 4. tejido adiposo, 5. tejido glandular, 6. conductos, 7. tejido graso retromamario, 8. fascia profunda, 9. tejido laxo retromamario, 10. Fascia pectoral superficial, 11. Músculo pectoral.



Fuente: BISBAL PIAZUELO, J.; GÓMEZ GARCÍA, R.; FIDALGO RODRÍGUEZ, F. Aspectos Anatómicos de Interés en Cirugía Plástica de Mama. [En Línea]. Clínica Planas. Disponible en: <https://www.clinicaplanas.com>.

²⁵⁰ BISBAL PIAZUELO, J.; GÓMEZ GARCÍA, R.; FIDALGO RODRÍGUEZ, F. Aspectos Anatómicos de Interés en Cirugía Plástica de Mama. [En Línea]. Clínica Planas. Disponible en: <https://www.clinicaplanas.com>.

La longitud de onda NIR se encuentra en el régimen de la óptica difusa, en la cual los fotones se dispersan mucho más a menudo de lo que se absorben. En el tejido mamario el recorrido medio libre es de aproximadamente 25 *cm* para la absorción mientras que para la dispersión es de 0.01 *cm*, esta diferencia en la longitud de trayectoria permite que los fotones se dispersen muchas veces antes de la absorción²⁵¹.

Dado que el fenómeno de dispersión es predominante en el tejido mamario cuando se implementa este tipo de luz, el sistema FED-SA aplicado al tejido mamario comprende cinco etapas:

- Etapa uno: Un sistema de iluminación que irradia el tejido preferiblemente con luz NIR para no alterar ni dañar el tejido.
- Etapa dos: Detectar la señal de la luz retro-dispersada por la muestra biológica.
- Etapa tres: Transformar la señal de luz retro-dispersada en una señal digital con una unidad de adquisición de datos.
- Etapa cuatro: Procesar la señal digital que contiene la información espectral, para obtener una gráfica del espectro representada en frecuencia, tiempo, espacio, intensidad o combinaciones de los mismos.
- Etapa cinco: Por medio de algoritmos expertos clasificar los datos y comparar los espectros.

²⁵¹ JACQUES, Steven L. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine & Biology*. 2013, vol. 58, no 11, p. R37.

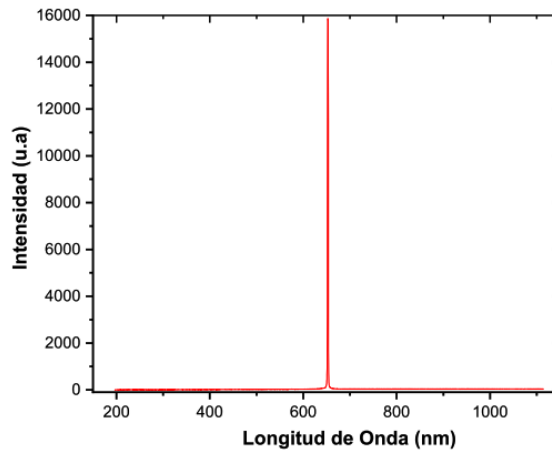
Los materiales, diseño, software y la implementación del sistema FED-SA se presentarán en la siguiente sub sección.

5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA TÉCNICA FED-SA

El dispositivo FED-SA fue diseñado para medir la luz retro-dispersada por el tejido mamario. La señal que se detecta se observa en una interfaz gráfica como una señal de voltaje en función del tiempo. El sistema cuenta con un emisor de luz y dos detectores, estos se encuentran al interior de una caja negra con dos botones que encienden el emisor y otro que activa los detectores, para las mediciones en el tejido mamario se adecuo un cuarto oscuro. La señal obtenida por cada detector y su diferencia van a un sistema de adquisición de datos. Las características y la organización de estos componentes se describirán a continuación.

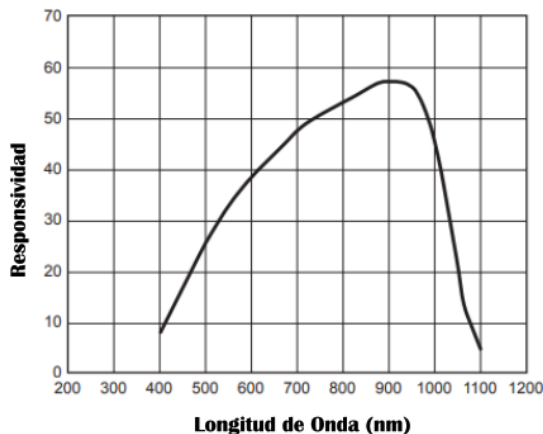
5.4.1 Materiales. El sistema de iluminación consta de un diodo LED (657nm) que emite luz en el infrarrojo con una potencia de salida de 0.5mW y temperatura 35.5 °C, promedios (según especificaciones del fabricante), con un perfil de emisión de luz como se presenta en la figura 4.3.1. Este perfil fue medido usando un foto detector de silicio de alta velocidad DET10A de THORLABS del laboratorio LEAM de la UIS.

Figura 25. Perfil espectral del LED en el infrarrojo utilizado en el sistema de iluminación



La detección de la luz se realizó utilizando dos detectores de referencia ODA-5WB-100K con una responsividad (es la tensión que entrega a la salida en relación con la potencia de entrada, V/mW) dentro de la longitud de onda del emisor de luz, ver figura 4.4.2. Estos detectores tienen una área activa de 5 mm^2 , una temperatura de operación entre -25° hasta 100° C , una fuente de alimentación de voltaje de 5 a 15 V y un ancho de banda de 500 kHz . Para el caso de diodo led implementado la responsividad de los detectores es de aproximadamente 40 V/mW .

Figura 26. Responsividad en función de la longitud de onda del detector ODA-5WB-100K



La adquisición de los datos obtenidos por los detectores es controlada por un sistema compactRio 9067 y el módulo 9223 acoplado dentro del chasis, ver figura 4.4.3.

CompactRIO es un sistema integrado resistente y reconfigurable que contiene tres componentes: un procesador que ejecuta un sistema operativo en tiempo real (RTOS), una matriz de puertas reconfigurables FPGA y módulos de entrada y salida industriales intercambiables. El procesador en tiempo real ofrece un comportamiento confiable y predecible y se destaca en el análisis y las matemáticas de punto flotante, mientras que el FPGA se destaca en tareas más pequeñas que requieren una lógica de alta velocidad y una sincronización precisa. La interfaz de control se realizó mediante el software Labview, este proporciona al operador una interfaz gráfica de usuario (GUI) para monitorear el estado del sistema y configurar los parámetros operativos. El controlador cRIO 9067 tiene una CPU Dual-Core de 667 MHz con 512 MB de DRAM, almacenamiento de 1 GB, FPGA Zynq-7020 y 8 Ranuras de acople para módulos de entrada y salida.

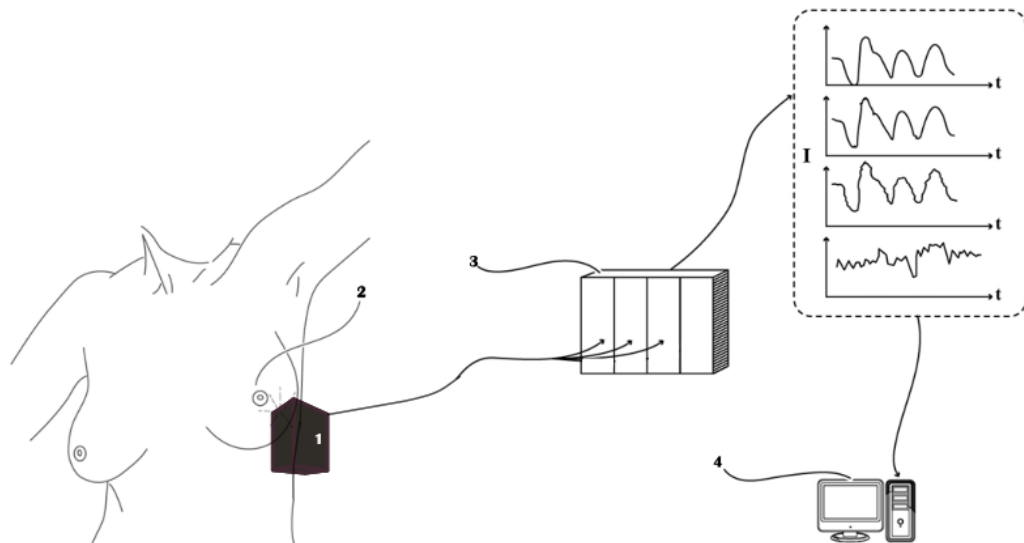
En cuanto al módulo 9223 este tiene cuatro canales para registrar señales de entrada con una tasa de adquisición total de 1 MS/s que se reparte en cada canal a 350KS/s con una resolución de 16 bits y una frecuencia de corte de 3db de al menos 1MHz. El dialogo entre el módulo 9223 y el sistema cRio, se realizó mediante el lenguaje de programación LabVIEW que requiere el módulo de Real-Time y el módulo FPGA, en la versión 2014 o una más avanzada.

Figura 27. Sistema de adquisición de datos adquirido a NI (National Instruments).
(a) Sistema CompactRio9067, (b) módulo 9223 con cuatro entradas de señal



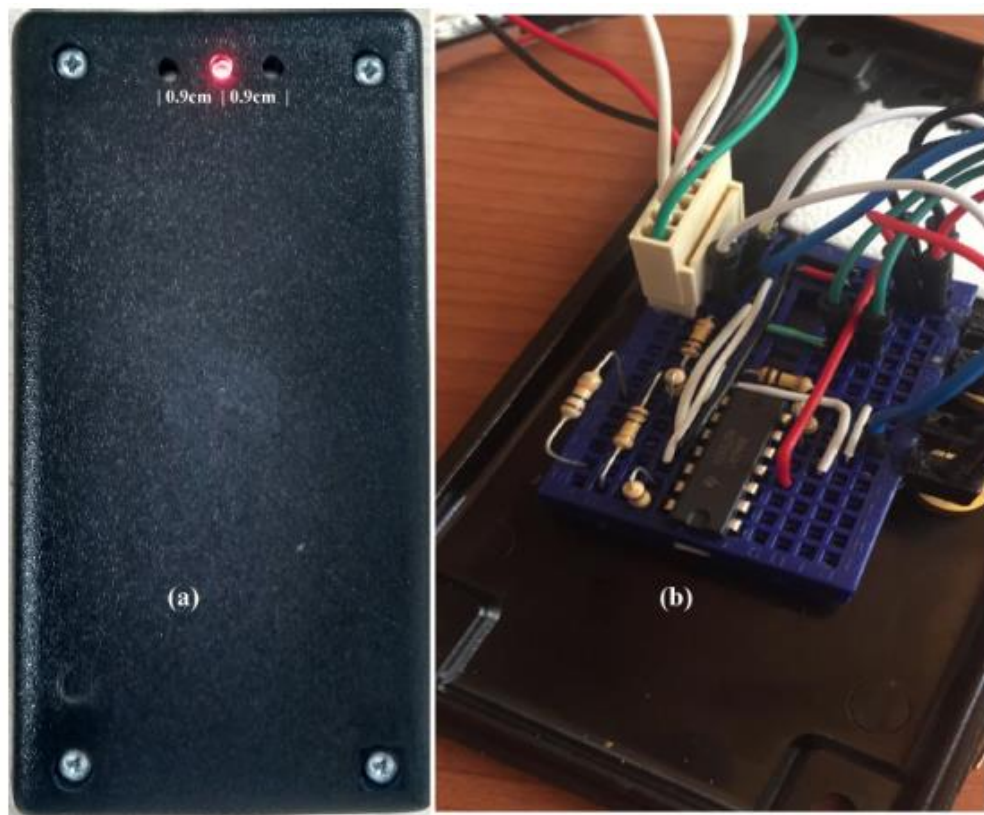
5.4.2 Diseño. Los materiales mencionados anteriormente se acoplaron para formar un esquema como el que se presenta en la figura 4.4.4.

Figura 28. Configuración del sistema FED-SA. 1. Sistema de iluminación y detección
2. Tejido mamario, 3. Sistema de adquisición de datos, 4. Procesamiento de datos por algoritmos expertos.



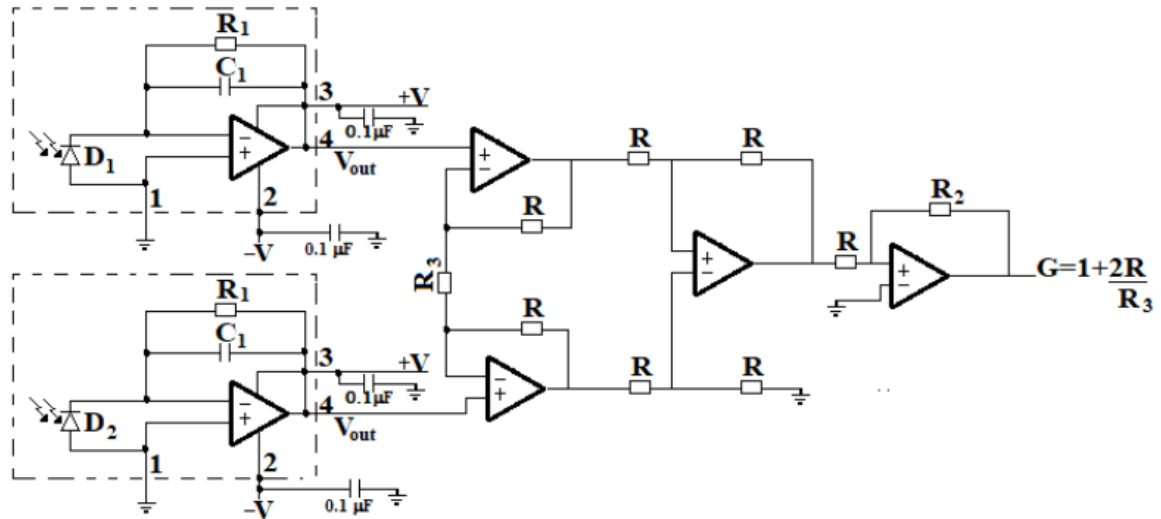
En esta imagen, 1 representa el sistema de iluminación y detección, 2 el tejido mamario, 3 el sistema de adquisición de datos y 4 corresponde a la implementación del software para análisis de los datos. El sistema de iluminación y detección se han ubicado dentro de una caja negra, la cual posee tres agujeros separados equidistante- mente, ver figura 4.4.5, en el medio se encuentra el emisor y a cada lado un detector (a 0.9cm del emisor).

Figura 29. Sistema de iluminación y detección. Fotografía exterior (a) e interior (b)



El circuito eléctrico que alimenta los detectores D_1 , D_2 y la forma en como es amplificada la diferencia de la señal recibida por los detectores Dif, se presenta en la figura 4.4.6. Las resistencias tiene valores de $R = 100K\Omega$, $R_1 = 10K\Omega$ y $R_3 = 20K\Omega$, la señal diferencial tiene una ganancia de $G = 11$.

Figura 30. Circuito eléctrico que alimenta los detectores D_1 , D_2 y se presenta la forma en como es amplificada la diferencia de la señal recibida por los detectores



Desde el sistema de iluminación y detección a través de un cable coaxial se dirigen tres señales medidas durante la interacción, dos corresponden a los detectores y una tercera señal que corresponde a la diferencia amplificada, estas se dirigen hacia el sistema de detección 3, que está constituido por el sistema compactRio 9067 y el módulo 9223, el cual adquiere cada señal a una frecuencia de muestreo de 333 kHz, que de acuerdo a la frecuencia de Nyquis permite adquirir máximo a 166 kHz aproximadamente. Todos los datos obtenidos son almacenados en un computador.

5.4.3 Software. La interacción entre el sistema de iluminación-detección y el sistema de adquisición de datos se realizó implementando el software Labview, siguiendo el diagrama de bloques presentado en la figura 4.4.7. Una vez ubicado el sistema de iluminación- detección sobre la zona elegida, se inicia el VI principal y se inician las variables (Frecuencia de adquisición, tiempo de medida y el nombre del archivo para guardar los datos), posteriormente se activa el VI que establece el dialogo con el sistema cRio y el módulo 9223. Cuando el experimento inicia, las variables FIFO que almacenan los datos empiezan en cero y se llena un vector de datos, el proceso de adquisición y almacenamiento se realiza en el sistema cRio,

una vez se cumple la condición temporal se realiza la transferencia de todos los datos hacia el disco duro y finaliza. La adquisición de los datos se realiza durante un tiempo predeterminado, una vez finaliza la toma de medidas en un punto del tejido mamario el sistema cRio transfiere los datos. Para la siguiente medición el sistema cRio no contiene datos de la anterior medida, esto se logra limpiando e inicializando siempre la variable FIFO en cero.

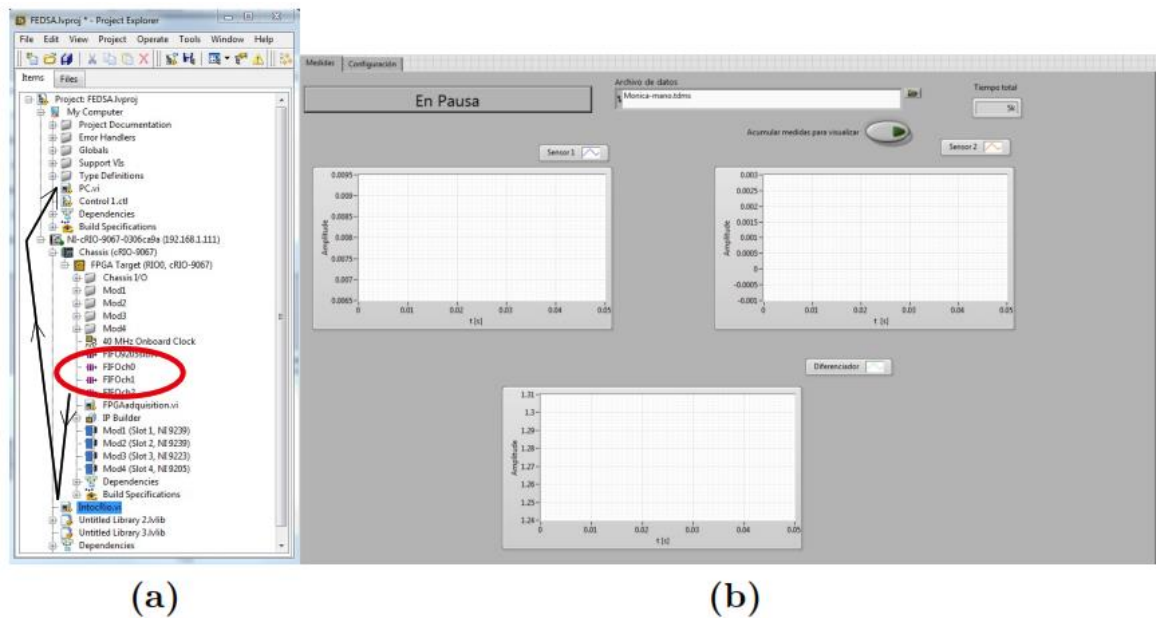
Figura 31. Diagrama de bloques para la adquisición de datos con el sistema cRio9067 y el módulo 9223.



El procesamiento descrito anteriormente, se realizó creando un proyecto en Labview en el que se estableció un dialogo entre el sistema cRio9067, el módulo 9223 y el sistema de iluminación-detección. El tipo de programación implementada para el sistema cRio fue en modo FPGA. Bajo este modo de programación se activan los tres canales de adquisición del módulo 9223, es decir, canal 1 (Dectector 1), canal 2 (Detector 2) y canal 3 (Diferencia). Los datos recibidos por cada canal se

transfieren a través de una memoria FIFO desde la FPGA hacia la memoria del chasis en tiempo real y posteriormente se almacenan en el computador utilizando la librería TDMS, ver figura 4.4.8. Los datos obtenidos constituyen la medida de la luz-retrodispersada por el tejido en función del tiempo. El procesamiento posterior se realizó mediante la implementación de algoritmos de programación en python y Rstudio.

Figura 32. Proyecto diseñado en Labview para manejar el sistema de adquisición de datos. (a) Configuración de programación del sistema cRio9067, los datos salen de la FPGA hacia el chasis del sistema de adquisición y posteriormente son almacenados en el computador, (b) Interfaz de interacción con el usuario para iniciar o parar la detección de la señal



5.5 PROTOCOLO DE MEDIDAS

Este estudio cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad Industrial de Santander y se llevó a cabo teniendo en cuenta las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos establecidos en el reporte

Belmont y las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud de la resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

5.5.1 Consideraciones éticas. Respeto por las personas: Según el artículo 11 esta investigación se considera de riesgo mínimo, teniendo en cuenta que las tomas de las medidas fueron realizadas en puntos específicos de la mama, y fueron tomados por la estudiante encargada de la investigación, Janeth Fernández.

Decisión personal: La población a estudiar estuvo conformada por mujeres con capacidad de tomar decisiones por sí mismas, las cuales fueron convocadas con avisos públicos en las universidades, en anuncios publicitarios de algunas revistas de la ciudad y el área metropolitana, garantizando de esta forma el derecho de igualdad. Durante esta investigación se garantizaron los principios morales de acción como: no maleficencia, beneficencia, utilidad, autonomía y justicia. Las participantes no recibieron ningún beneficio económico. Las medidas en las participantes se realizaron en una oficina adecuada en la facultad de medicina de la Universidad Industrial de Santander.

Criterios de Inclusión o Exclusión: Se incluyeron mujeres mayores de edad que viven en Bucaramanga o su área metropolitana con tejido normal y diagnosticadas con anomalías en el tejido mamario entre julio del año 2010 y 1 de diciembre del 2017, con masa o masas palpables que no fueron sometidas a quimioterapia. Dentro de este marco, se tuvieron en cuenta a aquellas que poseían algún tipo examen diagnóstico a través de Mamografía

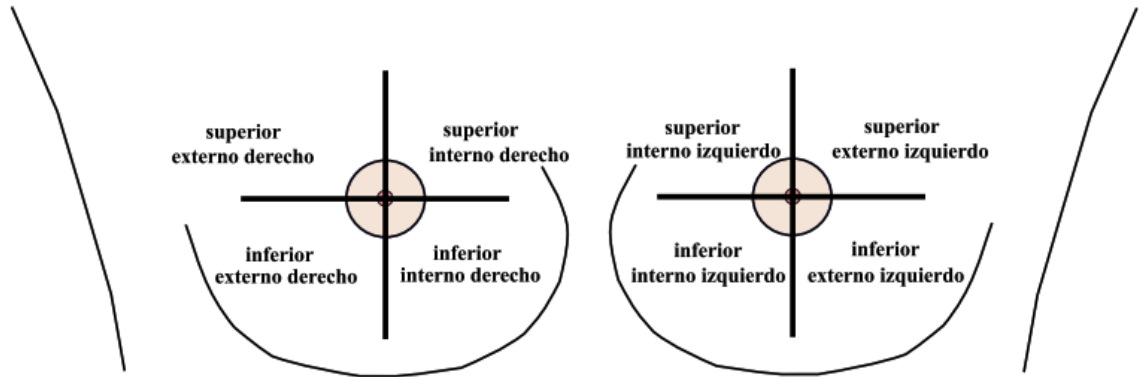
Consentimiento informado: Las participantes firmaron un consentimiento informado para la realización de las medidas, en este se estableció el propósito del estudio, el procedimiento al que sería sometida, la confidencialidad de la información suministrada por la persona, se le explicaron los riesgos y beneficios, se especificó

que no habría ningún cobro o pago por participar y que serían completamente voluntarias de desistir antes o durante la prueba y a responder cualquier pregunta. El documento se elaboró para que la paciente firmará su participación voluntaria como sujeto de investigación y autorizó el uso de los datos para los estudios que se requieran de estos. Por último, el documento lleva la declaración del investigador, en la que se aceptó haber explicado las consideraciones anteriores.

Beneficencia: Este tipo de investigación no tiene riesgos físicos debido a que la prueba no produce dolor, lesión o deterioro de algún sentido como el tacto o la vista. No tiene riesgos a corto o largo plazo, temporales o permanentes durante la investigación o que puedan surgir más adelante. No implica riesgos psicológicos y en caso de no sentirse dispuestas las participantes podían abandonar la investigación de acuerdo con el consentimiento informado. Los datos adquiridos se mantendrán en anonimato.

5.5.2 Mediciones sobre tejido mamario. El conjunto de mujeres seleccionado para este estudio piloto fue de 24 con un promedio de edad de 41 ± 12.36 entre (22-60). Entre ellas, seis mujeres con masas palpables con conocimiento a priori del diagnóstico, ver tabla 4.1, y una séptima que no envió los reportes clínicos, pero asevero tener alteraciones mamarias. La nomenclatura usada por las pacientes fue PN mas el número de conteo. Para registrar los datos por cuadrantes se utilizó la nomenclatura CSED (Cuadrante superior externo derecho), CSID (Cuadrante superior interno derecho), CIID (Cuadrante inferior interno derecho), CIED (Cuadrante inferior externo derecho), CSEI (Cuadrante superior externo izquierdo), CSII (Cuadrante superior interno izquierdo), CIII (Cuadrante inferior interno izquierdo) y CIEI (Cuadrante inferior externo izquierdo).

Figura 33. Nomenclatura y división por cuadrantes utilizada para realizar las mediciones sobre el tejido mamario



Todas las participantes descansaron durante un periodo de 15 minutos, en el cual se les explicó el consentimiento informado y se registraron los datos personales. Las mediciones se realizaron en un cuarto completamente oscuro a temperatura ambiente. Las participantes se adecuaron físicamente con una bata sin sostén y se delimitaron los cuadrantes en el tejido mamario de acuerdo a la morfología de cada mama, siguiendo la nomenclatura por cuadrantes presentado en la figura 4.5.1.

El procedimiento para realizar mediciones en el tejido mamario se describe a continuación:

Primero: Se establece si ambas mamas serán analizadas y se definen las zonas sobre la mama de la mujer sobre la que se realizarán las medidas. Esto se define con la ayuda de un especialista de la salud.

Segundo: Las mediciones se comienzan primero sobre la mama derecha que es dividida en cuatro partes, cuadrante superior externo, cuadrante superior interno, cuadrante inferior externo y cuadrante inferior interno. Siguiendo el orden de los cuadrantes y luego se realiza sobre la mama izquierda.

Tercero: Se ubican el dispositivo de iluminación y detección sobre la zona superior externa (zona próxima a la axila).

Cuarto: Se ilumina el tejido durante 10 segundos, la cantidad de tiempo puede variar, en este estudio se midieron las cuatro zonas de la mama implementando el mismo tiempo. El tiempo de medición puede ser mayor o menor, dependiendo del grado de exhaustividad que se quiera lograr.

Quinto: Se recoge la luz que surge de la interacción luz-tejido por retro-dispersión

Sexto: La señal de luz que se recoge es de voltaje en función del tiempo, esto se realiza mediante el sistema de adquisición de datos descrito previamente.

Séptimo: Todos los datos son almacenados en una carpeta con el código de la paciente

Octavo: Se repite desde el tercer paso hasta el séptimo midiendo en todos los cuadrantes.

Se finaliza el proceso de interacción con la participante.

Tabla 7. Descripción general del diagnóstico de las seis pacientes con anomalías en el tejido mamario.

Paciente	Paciente
PN013	Mamografía y ecografía observan en el cuadrante superior externo de la mama derecha (CSED) una imagen nodular que corresponde a microquistes agrupados
PN015	Ecografía mamaria revela nódulos probablemente benignos de características

Paciente	Paciente
	sólidas en el seno izquierdo, en la parte interna superior e inferior, (CSII, CIII).
PN016	Mamografía evidencia masas en los cuadrantes superiores de ambos senos (CSED, CSID, CSEI, CSII). Biopsia revela: Lesión glándula derecha e izquierda con fibroadenoma de: 3x3x2 cm ³ y 1,7x1x1,5 cm ³
PN025	Mamografía evidencia quistes en el cuadrante superior externo derecho (CSED) de 6.6x9x3.6 mm y 6x7x4 mm
PN028	Mamografía evidencia micro y macro calcificaciones en el cuadrante inferior interno izquierdo (CIII).
PN029	Mamografía evidencia quistes CSED, CSEI, CSII, CIII. Además posee implantes mamarios rellenos de gel de lumen sencillo precargados con gel de silicona

5.6 MINIMIZACIÓN DE RUIDO Y CÁLCULO DE POTENCIA ESPECTRAL

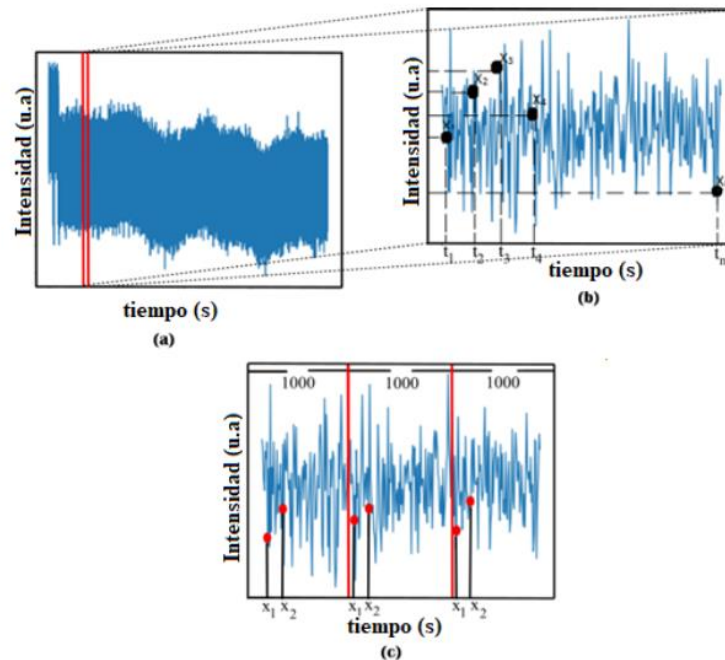
La señal de luz medida por retrodispersión, por medio de FED-SA, contiene información relacionada con el tamaño de los componentes moleculares de los medios intra y extracelular del tejido mamario. Esta relación implica que los componentes moleculares de mayor tamaño se moverán más lentamente, por ende, a frecuencias menores, en comparación con los componentes más pequeños, los cuales se moverán más rápidamente, a frecuencias mayores. El tiempo de adquisición total de la señal influye en los rangos de frecuencia que se pueden medir, sin embargo, las frecuencias del movimiento de las moléculas depende del tamaño y velocidad de las partículas en suspensión, no del tiempo de medición²⁵².

²⁵² INSTRUMENTS, Malvern. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note Malvern, MRK656-01, 2012, vol. 1.

Al realizar una medición de luz retrodispersada en el tejido se adquiere una componente debida a la señal biológica y otra que se denomina ruido, ver figura 4.6.1(a); el ruido está presente durante el tiempo total de la señal medida. Para este análisis se asumirá esta contribución como ruido blanco.

La señal biológica obtenida por el sistema de adquisición, corresponde con un conjunto de datos discretos en el que el tiempo representa una función temporal (señal), $x(t)$, ver figura 4.6.1(a). Esta señal $x(t)$ contiene una componente relacionada con la información proveniente de la interacción de la luz con la muestra de estudio x_N y una componente de ruido blanco e_x .

Figura 34. Intensidad retro-dispersada en función del tiempo por el tejido mamario (a). Amplificación de la señal en una ventana temporal de 0.01s (b). La señal total fue dividida en ventanas de 1000 datos, en cada ventana se identificaron los datos x_1 , x_2 , x_3 x_{1000}



Fuente: SCAFFARDI, Lucía B.; VIDELA, Fabián A.; SCHINCA, Daniel C. Visible and near-infrared backscattering spectroscopy for sizing spherical microparticles. Applied optics, 2007, vol. 46, no 1, pp. 67-75.

Es posible construir una nueva función, $y(t)$, que contenga a y_N (información del tejido) y a e_y (ruido blanco). Esta función $y(t)$ puede ser calculada por medio dos opciones: la primera consiste en obtener la media aritmética de una serie de mediciones independientes y la segunda, en utilizar un lote de datos para obtener dichas medidas de las ya tomadas. Estos procesos permiten minimizar la componente de ruido e_x talque $e_y < e_x$. Para los datos medidos en este experimento se utilizó la segunda opción, debido a que el conjunto total de datos por pacientes es de aproximadamente 2.5GB, en cuanto que la primera opción implicaría tomar de nuevo más datos.

Tabla 8. Relación señal ruido en los tres canales de adquisición antes (x) y después del procesamiento de datos (y).

Paciente	Detector	SNR db (x)	SNR db (y)
PN013	D1	27	53
	Dif	38	65
	D2	30	56
PN019	D1	20	48
	Dif	27	57
	D2	16	44

Como el proceso de adquisición de datos permite obtener señales discretas, es necesario introducir una descripción de las señales en tiempo discreto. Antes de entrar en detalles, se describirá el proceso de adquisición y procesamiento de los datos de manera general. De la señal $x(t)$ se obtienen muestras, x_k . Las muestras se dividen en conjuntos de N datos que corresponden a una de las V ventanas temporales. Por ejemplo, si se construyen ventanas con muestras adquiridas durante 0.01s, a una frecuencia de muestreo de 100kHz, como se representa en la figura 4.6.1 (b), entonces $N=1000$ datos. Es posible dividir la señal total en ventanas

con un mismo número de datos, figura 4.6.1(c). En este ejemplo, cada ventana tiene $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{1000}$ datos, a partir de los cuales se construye la señal discreta $y = \{y[n]\} = \{y_1, y_2, \dots, y_V\}$, donde cada elemento y_n está definido por la ecuación 4.6.1.

$$y[n] = y_n \sum_{k=1}^{1000} x_k \quad (5.6.1)$$

Este procesamiento de los datos se aplicó a todo el conjunto de datos. Además, se calculó la relación señal a ruido antes y después del procesamiento descrito anteriormente, SNR_{db} , definida por la ecuación 4.6.2, siendo μ el valor medio y σ la desviación estándar. En la tabla 4.2 se presentan algunos resultados alcanzados cuando se escogen ventanas de 512 datos²⁵³. La relación señal a ruido fue calculada para las señales medidas por los detectores (D1, D2) y su diferencia (Dif), en los pacientes PN013 y PN019.

$$SNR_{db} = 20 \log_{10} \left(\frac{\mu}{\sigma} \right) \quad (5.6.2)$$

A continuación, se describen los detalles del algoritmo implementado para la minimización del ruido blanco y la obtención de la potencia espectral.

5.6.1 Análisis de la señal discreta. Sea un conjunto de datos con una dependencia temporal aleatoria como se observa en el paso 1 de la figura 4.6.2. Esta señal $x(t)$ en el tiempo puede dividirse en intervalos iguales de tiempo. Como se describió anteriormente, en este ejemplo se tomaron 4096 datos por cada intervalo (ventanas de colores), para posteriormente ser apilados verticalmente como se muestra en el paso 2. Esta representación, $y[i, j]$, se puede manipular como una imagen. Definida la matriz y que describe los datos de la imagen, se procede en el paso 3, a calcular

²⁵³ FERNÁNDEZ, P. Janeth, et al. Spectrograms comparison between normal and abnormal signal of in vivo mammary tissue, obtained by back-scattering infrared light. En Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2019. p. 012023.

la transformada de Fourier bidimensional discreta, los valores obtenidos se almacenan en una nueva matriz y . Este resultado fue utilizado para disminuir el ruido al sumar las filas de esta nueva matriz, formando un vector unidimensional Γ , con este vector se calculó el espectro de potencia en función de la frecuencia, como se observa en el paso 4. El espectro de potencia es mostrado en escala logarítmica, ver figura 4.6.2 paso 4.

Matemáticamente, la transición entre el paso 1 y el 2, puede interpretarse como una función $y[i, j]$ dada por la siguiente expresión:

$$y[i, j] = x[i + j] \text{rect} \left[\frac{i - V/2}{V}, \right] \quad (5.6.3)$$

en esta ecuación $n - 1$ es el número de datos por ventana y j es el número de ventanas. La función rectángulo describe como la señal es dividida en ventanas tal que $n - 1 = 2^\mu$ es el número de datos de la ventana con $\mu \in \mathbb{Z}^+$ (paso 2), esta función cumplen con:

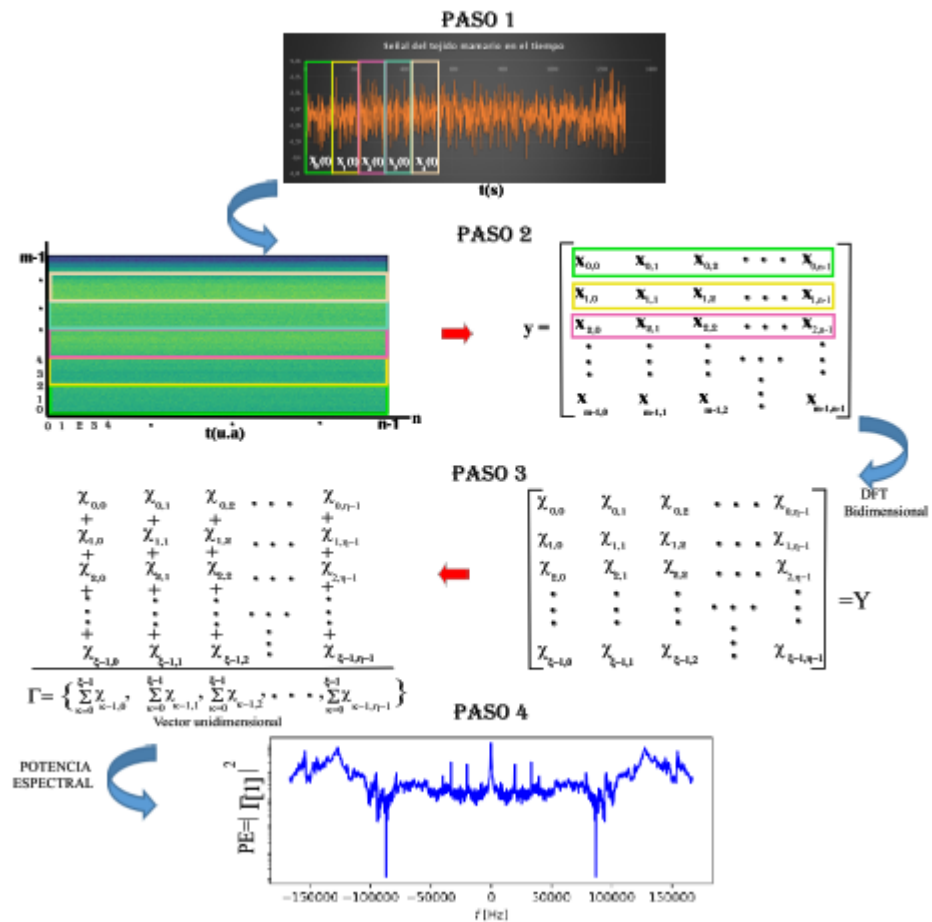
$$\text{rect}(t/\tau) = \begin{cases} 1 & |t| \leq \tau/2 \\ 0 & |t| > \tau/2 \end{cases}$$

5.6.2 Minimización del ruido blanco. En el paso 2 de la figura 4.6.2, se representa la creación matriz de datos y , para posteriormente aplicar la transformada discreta de Fourier bidimensional. En el paso 3, de la misma figura se obtiene una nueva matriz de datos $\{Y[k, l]\}$. Las filas de la matriz Y se suman, formando un vector unidimensional Γ . El cálculo de la potencia espectral (paso 4) para este vector unidimensional puede representarse matemáticamente como:

$$PE = |\Gamma[l]|^2 = \sum_{k=0}^{\xi-1} \left| DFT \{y\}_{k,l} \right|^2$$

Con DFT como la transformada discreta de Fourier bidimensional, este proceso se realizó probando varias ventanas en el paso 1, con valores de 512, 1024, 2048 y 4096. El cálculo de la potencia espectral informa cómo está distribuida la potencia o la energía de dicha señal sobre las distintas frecuencias de las que está formada.

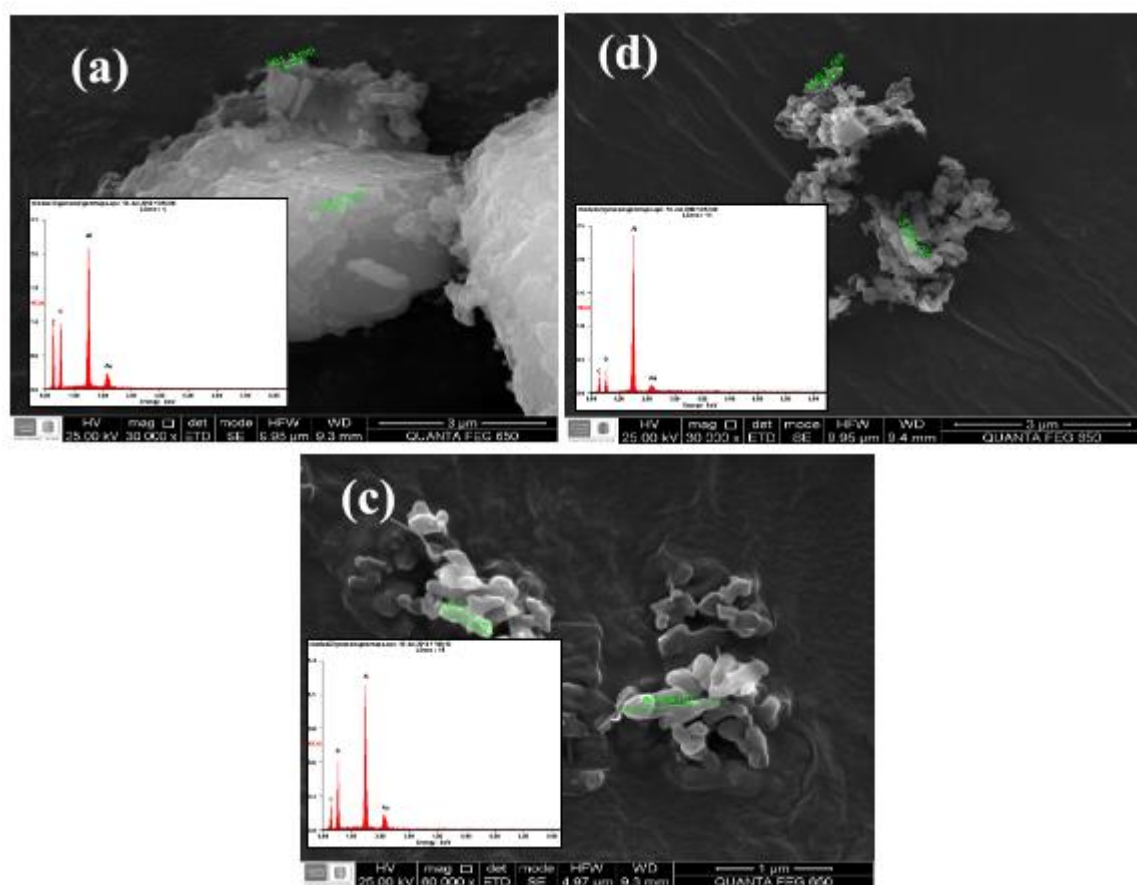
Figura 35. Procedimiento implementado para calcular la potencia espectral. Paso 1, la señal medida como voltaje en función de tiempo se divide en ventanas con igual número de datos. Paso 2, estas ventanas se arreglan verticalmente y se organizan en una matriz. Paso 3, se aplica la transformada discreta de Fourier bidimensional, para esta nueva matriz se suman las filas (minimización de ruido). Paso 4, con el vector obtenido se calcula la potencia espectral.



5.7 POTENCIA ESPECTRAL Y TAMAÑO DE PARTÍCULAS

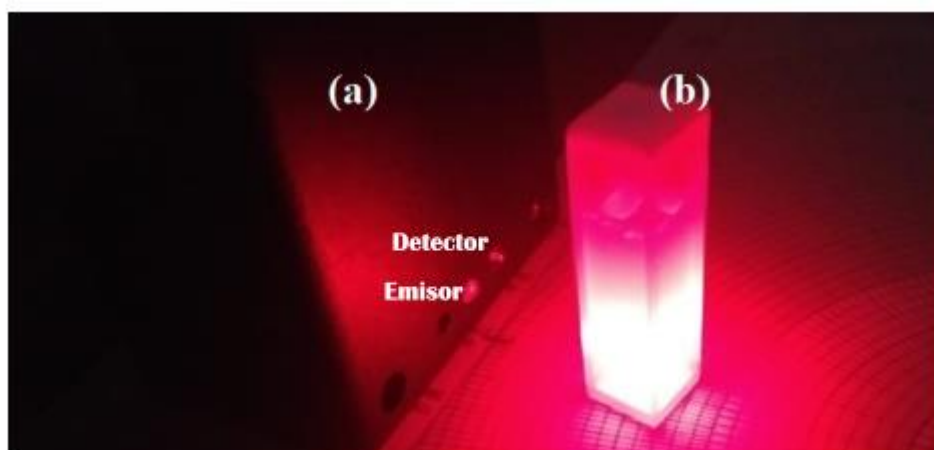
Para confirmar que la luz retro-dispersada contiene información del tamaño de partícula que compone el tejido, se realizaron unas pruebas preliminares con partículas en suspensión de varios tamaños. Se utilizaron partículas de alúmina agrupadas en tamaños promedios de $60 - 300 \text{ nm}$, $100 - 300 \text{ nm}$ y $500 \text{ nm} - 100 \text{ nm}$. El tamaño de estas partículas se observó a través de microscopia electrónica de barrido con detector (EDS), ver figura 4.7.1.

Figura 36. Medida del tamaño de partículas de alúmina y café por la técnica de espectroscopia EDS. Tamaño de alúmina de $60 - 300 \text{ nm}$ (a), $100 - 300 \text{ nm}$ (b), $500 \text{ nm} - 100 \text{ nm}$ (c).



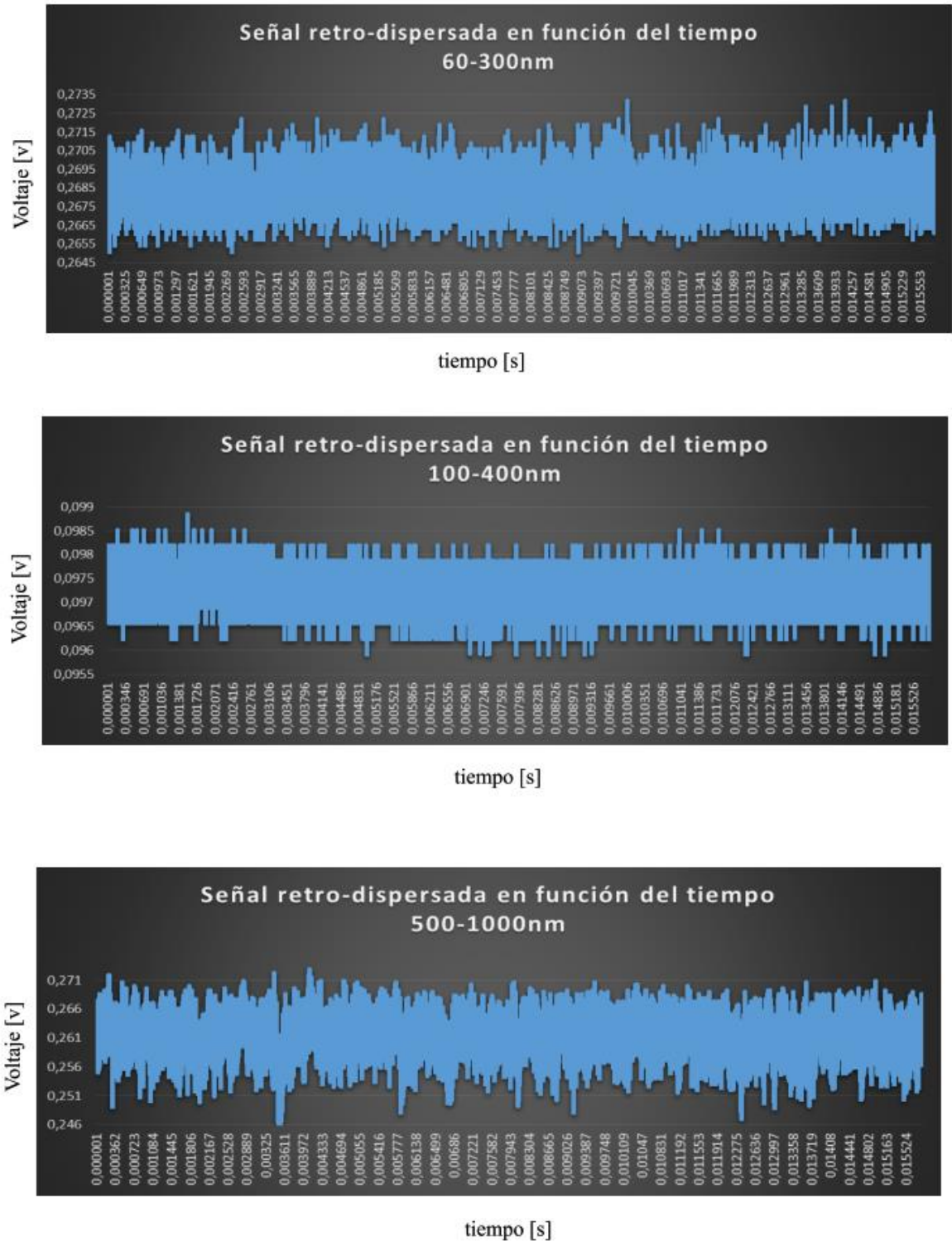
Todas las muestras se prepararon en 3ml de agua destilada incorporando 30 mg de cada polvo. Las partículas en suspensión se colocaron en una cubeta de cuarzo a dos centímetros de distancia del emisor de luz, la detección se realizó por retro-dispersión a 176° con respecto al haz incidente, con este fin se ubicó la muestra formando un ángulo de 4° grados con el sistema de iluminación-detección, ver figura 4.7.2.

Figura 37. Experimento para medir la potencia espectral de partículas en suspensión. (a) Sistema de iluminación y detección, (b) Partículas en suspensión en cubeta de cuarzo



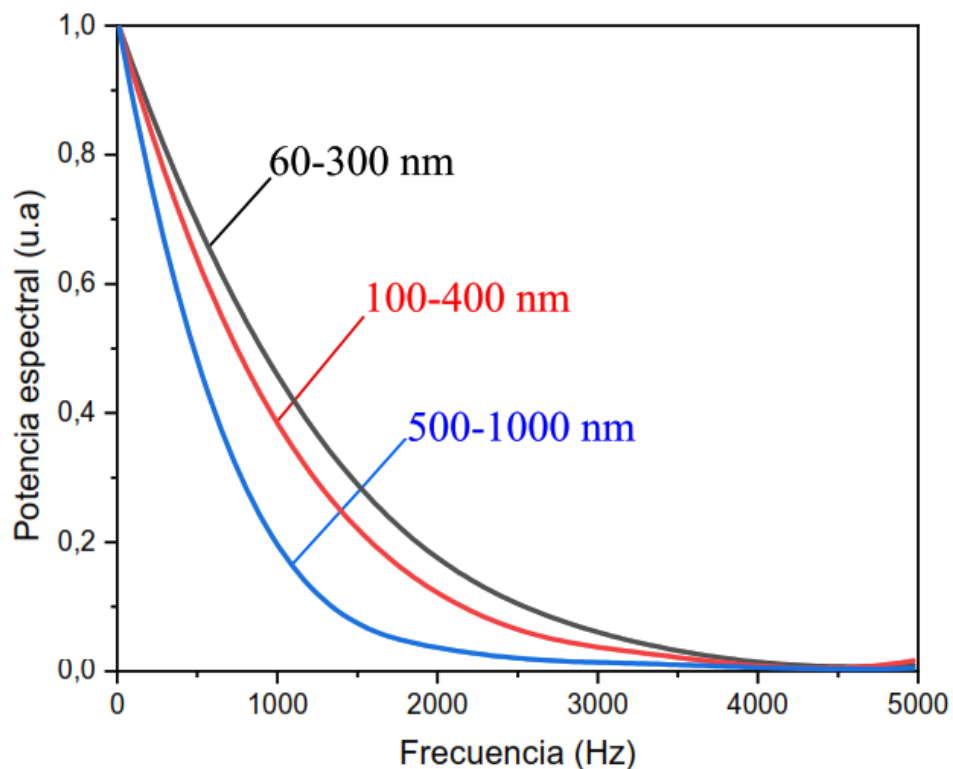
Para cada muestra se midió por triplicado la luz retro-dispersada durante 10s con el sistema descrito en la sección 3.3 (detección mediante la técnica FED-SA). En la figura 4.7.3 se presenta una ampliación de la señal obtenida en una ventana de 0.015s para cada uno de los tres grupos de partículas en función del tiempo.

Figura 38. Señal retro-dispersada en función del tiempo medida con el sistema FED_SA, para partículas en suspensión de 60-300nm, 100-400nm y 500- 1000nm



Realizando el procesamiento de datos descrito en la sección 4.6, se calculó la potencia espectral en función de la frecuencia para cada medición realizada en los conjuntos de partículas en suspensión. Con los datos de potencia espectral normalizados se calculó el valor medio, ver figura 4.7.4 y la desviación estándar de los tres experimentos, ver figura 4.7.5.

Figura 39. Potencia espectral en función de la frecuencia para partículas en suspensión de diferentes tamaños.



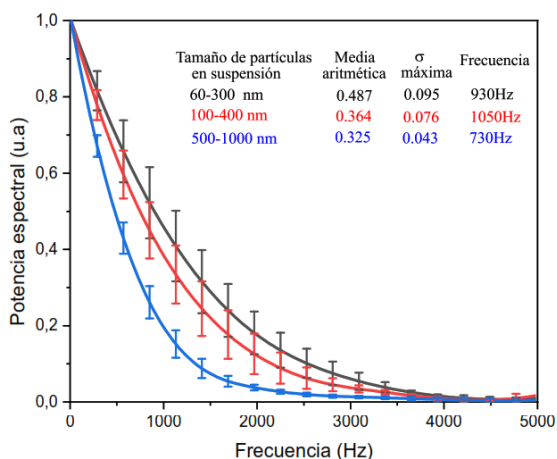
Según las medidas experimentales, bajo el principio básico de DLS para partículas del tamaño de 6 nm la potencia espectral contiene información de frecuencias a bajo de 50 kHz , las de 60 nm abajo de 5 kHz y las de 600 nm abajo de 500 Hz , esta relación con el tamaño es tal que a medida que aumenta el tamaño de las partículas la contribución de las frecuencias bajas se hace más marcada. De los datos

obtenidos se observa una disminución en la desviación estándar para partículas con mayor tamaño, la desviación para partículas del tamaño de 60-300 *nm* es la más grande $\sigma = 0.095$ debido a la gran cantidad de partículas con diversos tamaños, para 100-300 *nm* con $\sigma = 0.084$ y la menor desviación se da para las partículas de 500-1000 *nm* con $\sigma = 0.325$, ver figura 4.7.5. Esta dispersión en la media aritmética de la potencia espectral juega un papel importante en la determinación de la contribución de la frecuencia, porque las partículas de mayor tamaño se moverán lentamente en comparación con las más pequeñas. En este gráfico se observa que la potencia espectral correspondiente a las partículas de tamaños entre 60 – 300 *nm* contiene información de frecuencias abajo de 5kHz, entre 100 – 400 *nm* de 4kHz y de 500 – 1000 *nm* de 3400Hz.

Se esperaba de acuerdo a DLS, que la potencia espectral de las partículas con tamaño cercano a 600*nm* tuvieran una fuerte contribución de frecuencias menores a 500 *Hz*, pero en los resultados obtenidos se evidencia que al tener partículas de tamaños mezclados puedan darse contribuciones del movimiento de las partículas involucradas produciendo el corrimiento hacia frecuencias más altas, de hecho ya se ha verificado experimentalmente que al medir la luz retro-dispersada en función de la longitud de onda de partículas en suspensión con varios tamaños, es posible al transformar esta información al espacio de frecuencias, visualizar los picos de intensidad a frecuencias determinadas para cada tamaño de partículas²⁵⁴.

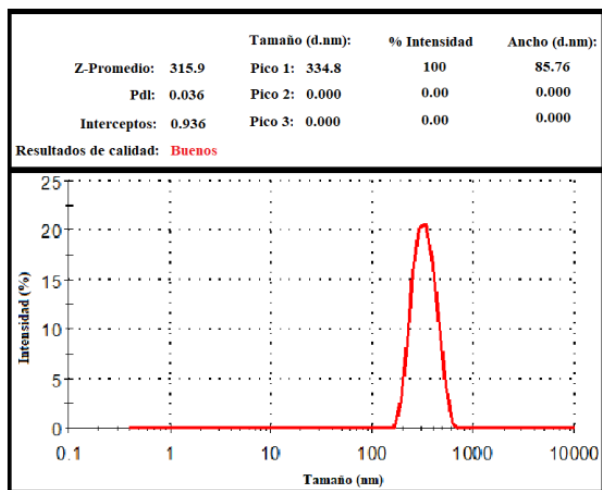
²⁵⁴ SCAFFARDI, Lucía B.; VIDELA, Fabián A.; SCHINCA, Daniel C. Visible and near-infrared backscattering spectroscopy for sizing spherical microparticles. Applied optics, 2007, vol. 46, no 1, pp. 67-75.

Figura 40. Barra de errores sobre las medidas de potencia espectral en función del tamaño de partículas en suspensión. Se adjuntaron datos del valor de desviación máxima con el valor medio de la potencia espectral a una frecuencia determinada.



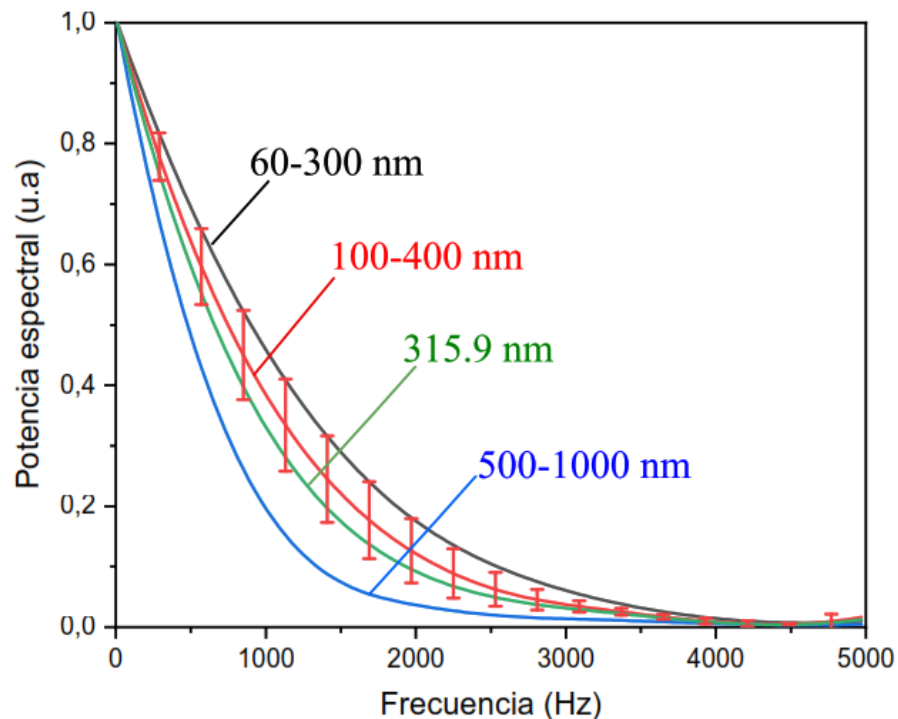
Para comparar los resultados obtenidos mediante el sistema experimental implementado y el tratamiento de datos propuesto por FED-SA, se utilizaron nanopartículas en suspensión de poliestireno de 315 *nm* en tapón acuso con pH=9, el tamaño de estas partículas fue medido mediante el sistema Zetasizer de Malvern instrumentos con luz roja de 632 *nm*, ver figura 4.7.6.

Figura 41. Tamaño de partícula medido por Zetasizer Malverin instrumentos



Con el sistema FED-SA se midió por triplicado la luz retro-dispersada y se calculó la potencia espectral para estas nanopartículas utilizando el método de procesamiento de datos descritos en la sección 4.6, ver figura 4.7.7.

Figura 42. Potencia espectral en función de la frecuencia para partículas de poliestireno de tamaño medio de 315.9 nm en suspensión.



En esta gráfica se observa como la potencia espectral para partículas en suspensión de un tamaño promedio de 315.9 nm caen dentro del rango de potencia espectral entre 100-400 nm. Esta prueba de concepto no se pretende medir el tamaño de partículas presentes en los tejidos, si no en base a estos resultados, la técnica FED-SA pretende buscar información a través de la potencia espectral en función de la frecuencia de componentes con un tamaño superior a los 60 nm.

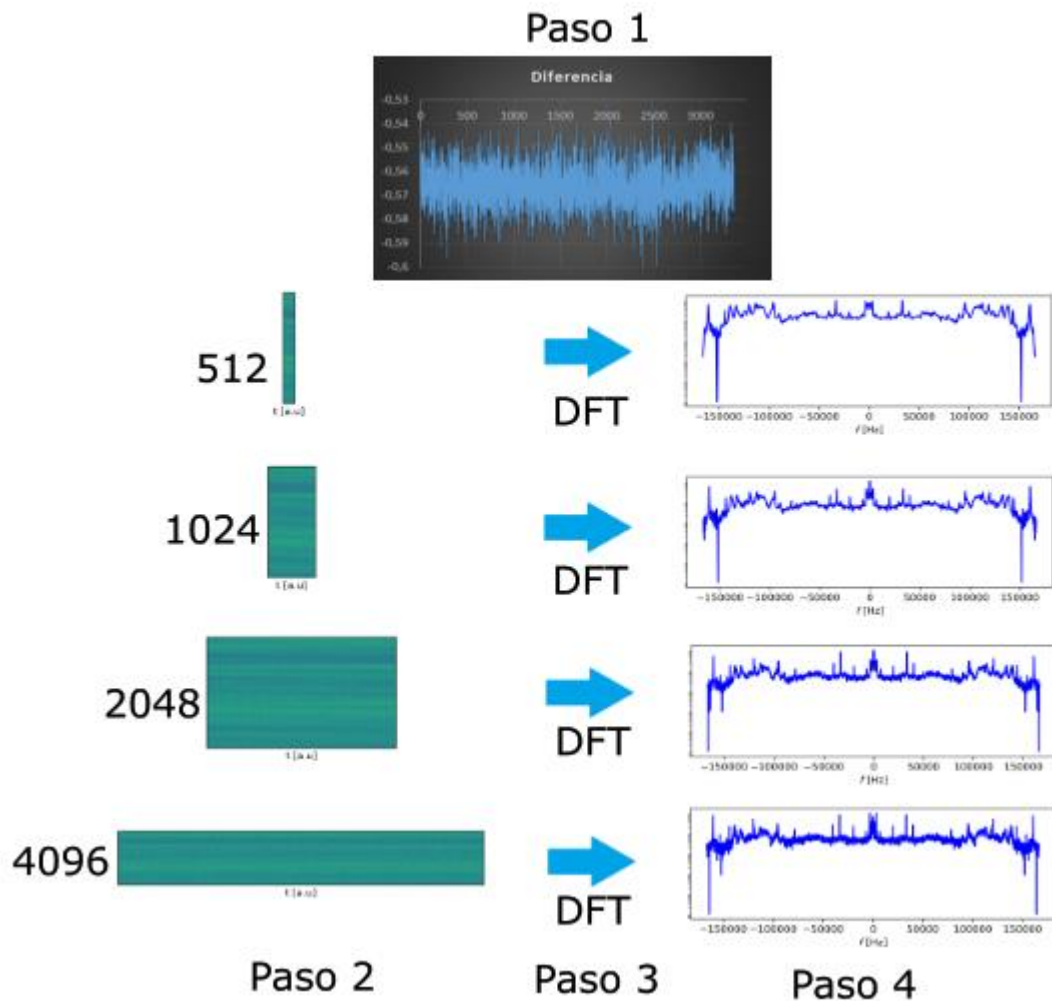
Usando FED-SA se recogieron datos de 24 mujeres durante tres días. El sistema almacenó la información detectada por los dos sensores y por la diferencia (3

canales de adquisición), así que para cada participante se registraron datos de los cuatro cuadrantes del tejido mamario durante un tiempo de 10 segundos por cuadrante y por canal. Algunos de los datos obtenidos se presentan a continuación.

5.8 POTENCIA ESPECTRAL DE TEJIDO MAMARIO NORMAL

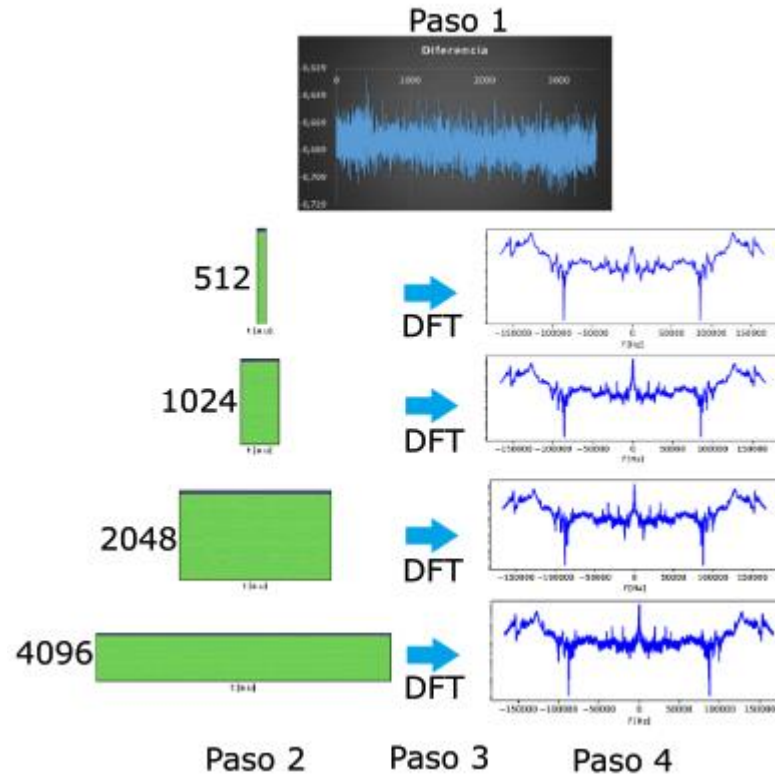
En las figuras 4.8.1 y 4.8.2, se presenta el resultado de la potencia espectral en función de la frecuencia para dos participantes con diagnóstico normal PN020 y PN035, por medio de FED-SA. En estas figuras, se muestra un corte (3000 datos) de la señal biológica medida en el CSED y el procedimiento aplicado para obtener la potencia espectral en función de la frecuencia (sección 4.6). El paso 1, representa la señal medida por la diferencia entre las señales recibidas por el detector 1 y el detector 2. Estos datos de voltaje en función del tiempo fueron ordenados eligiendo ventanas V con un número de datos de 512, 1024, 2048 y 4096 por ventana, posteriormente las ventanas se ordenaron verticalmente, como se muestran en el paso 2. Se hizo el procedimiento descrito para el paso 3 que consiste en: construcción de la matriz y , realizar la transformada discreta de Fourier (DFT), almacenar los valores obtenidos por DFT en una nueva matriz Y y calcular el vector unidimensional Γ . A partir de este vector se encontró la potencia espectral en función de la frecuencia, $PE = |\Gamma[l]|^2$ (ecuación 4.1.8), paso 4.

Figura 43. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente normal PN020.



Se observa como la potencia espectral en función de la frecuencia tiene un perfil que no cambia abruptamente con el número de datos por ventana V , definidos en el paso 1 del método de minimización de ruido propuesto, además se muestra como disminuye el ruido en el perfil de la potencia espectral con la disminución del número de datos por ventana.

Figura 44. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente normal PN035.



5.9 POTENCIA ESPECTRAL DE TEJIDO MAMARIO ANORMAL

En las figuras 4.9.1 y 4.9.2, se presentan los datos registrados para dos participantes PN015 y PN016 con anomalías bajo el procesamiento de datos propuesto y la potencia espectral en función de la frecuencia, ver sección 4.6. Por comparación, la potencia espectral de las dos mujeres con anomalías tiene una dependencia con la frecuencia bien diferenciada con respecto a los datos de las mujeres normales presentadas anteriormente.

Para el análisis de los datos se utilizó toda la información recolectada con los dos detectores y la diferencia de la señal entre ellos. En total se calcularon 96 espectros

de potencia espectral en función de la frecuencia por cuadrante, que dan un total de 768 espectros para los ocho cuadrantes, a partir de la información de un detector. En total se calcularon 2304 gráficos de potencia espectral.

Una vez calculadas todas las potencias espectrales en función de la frecuencia con etiquetas previas de normal y anormal, se calculó el área bajo la curva de la potencia espectral dividiendo la información contenida en bandas de frecuencia de 0-1, 1-10, 10-50, 50-100, 100-150, 150-160 kHz. Todos los datos se organizaron para realizar un análisis estadístico y determinar si existían o no diferencias entre las mediciones realizadas para el grupo de mujeres normales y con anomalías.

Figura 45. Procesamiento de datos sobre la señal biológica registrada para la paciente con anomalías PN015.

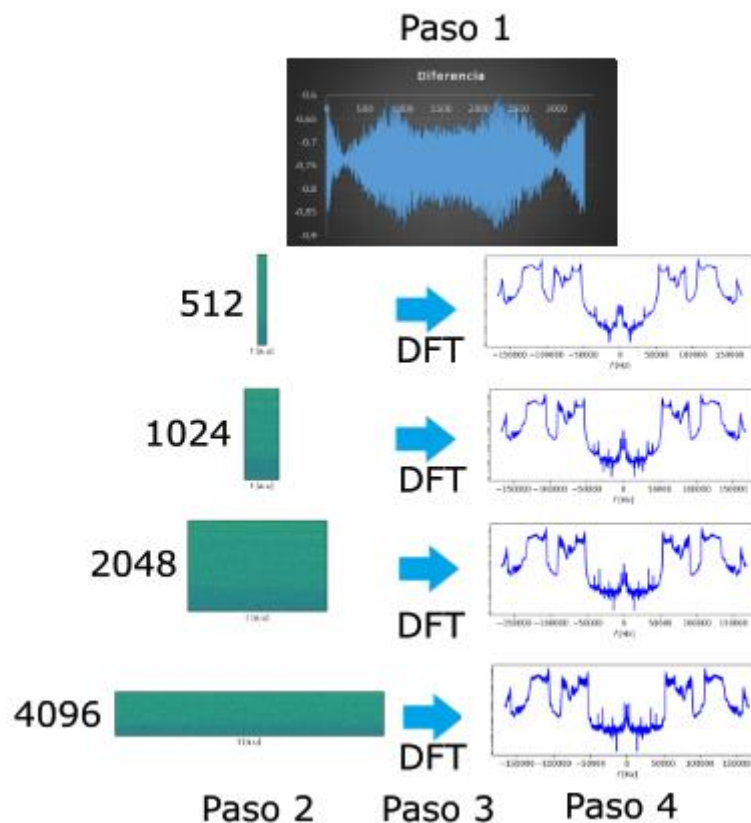
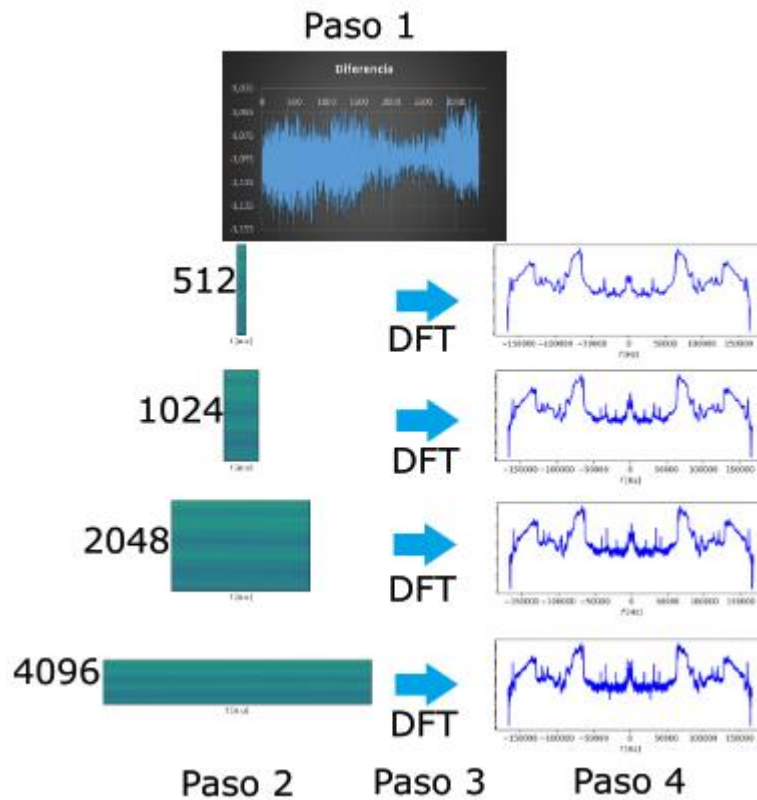


Figura 46. Procesamiento de la señal biológica registrada para la paciente con anomalías PN016.



5.10 COMPARACIÓN DE BANDAS ESPECTRALES DE TEJIDO MAMARIO NORMAL Y ANORMAL

Los datos objeto de estudio están conformados por información proveniente del espectro de potencia de seis (0-1, 1-10, 10-50, 50-100, 100-150, 150-160 kHz) bandas de frecuencias de 24 personas, estos conjuntos de datos contienen información de la luz retro-dispersada por el tejido mamario en posiciones específicas etiquetadas como: CSED, CSID, CIID, CIED, CSEI, CSII, CIII y CIEI.

Inicialmente, se presenta un análisis descriptivo que resumen el comportamiento de los rangos de frecuencias con respecto a todos los cuadrantes, ver tabla 4.3. En esta se observa que los datos en el rango de 0-1 kHz tienen la menor desviación 556.76 respecto a la media, en comparación con el rango de 10-50 kHz que tiene la mayor desviación estándar 20986.32.

Tabla 9. Valores de la media, desviación estándar, mínimo, máximo y cuartiles para las bandas de frecuencia

Frecuencias	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Mediana	IQR	Q1(25 %)	Q3(75 %)
0-1kHz	4606.82	556.76	22281.46	5737.62	4650.95	800.56	4234.04	5036.41
1-10kHz	29315.7	4373.85	8245.29	40376.26	29854.50	3719.36	27843.86	31570.59
10-50kHz	130983.67	20986.32	40275.26	186442.66	133989.25	18961.86	123868.54	142870.77
50-100kHz	33087.20	4491.70	13232.91	43840.07	33158.49	5910.81	30235.98	36151.31
100-150kHz	180251.30	17865.30	79324.24	232315.46	169860.91	19173.41	160270.42	179410.69
150-160kHz	180251.30	18489.77	81554.46	2326609.23	181216.66	24204.19	168372.42	192592.91

Los datos pertenecientes a los cuadrantes para cada franja de frecuencias se encuentran representados en las figuras 4.10.1 y 4.10.2, en estos diagramas se presentan estas dos variables (cuadrantes, frecuencias) respecto a las etiquetas de clasificación (normal y anormal). Estas gráficas de caja y bigotes permiten describir la dispersión y asimetría de los datos, así como también se representan los valores máximos, mínimos y los tres cuartiles (25 %, 50 % y 75 %) sobre un rectángulo. En estas re- presentaciones, se evidencia una mayor dispersión de los datos para los cuadrantes CSII, CSID y CSEI, esta tendencia se da para cualquier rango de frecuencia, además se observan valores atípicos en especial en las bandas intermedias de frecuencia. Para los rangos de 0-1, 1-10, 10-50, 150-160 kHz los valores de mediana son menores para la clasificación Anormal (Caja color verde) en

comparación con los valores de mediana presentados en la clasificación Normal (Caja color naranja) para todas las zonas.

Figura 47. Representación en diagrama de cajas y bigotes para tres bandas de frecuencia (0-1, 1-10, 10-50 kHz) por cuadrantes, con etiquetas normal y anormal para el conjunto de datos de las 24 mujeres.

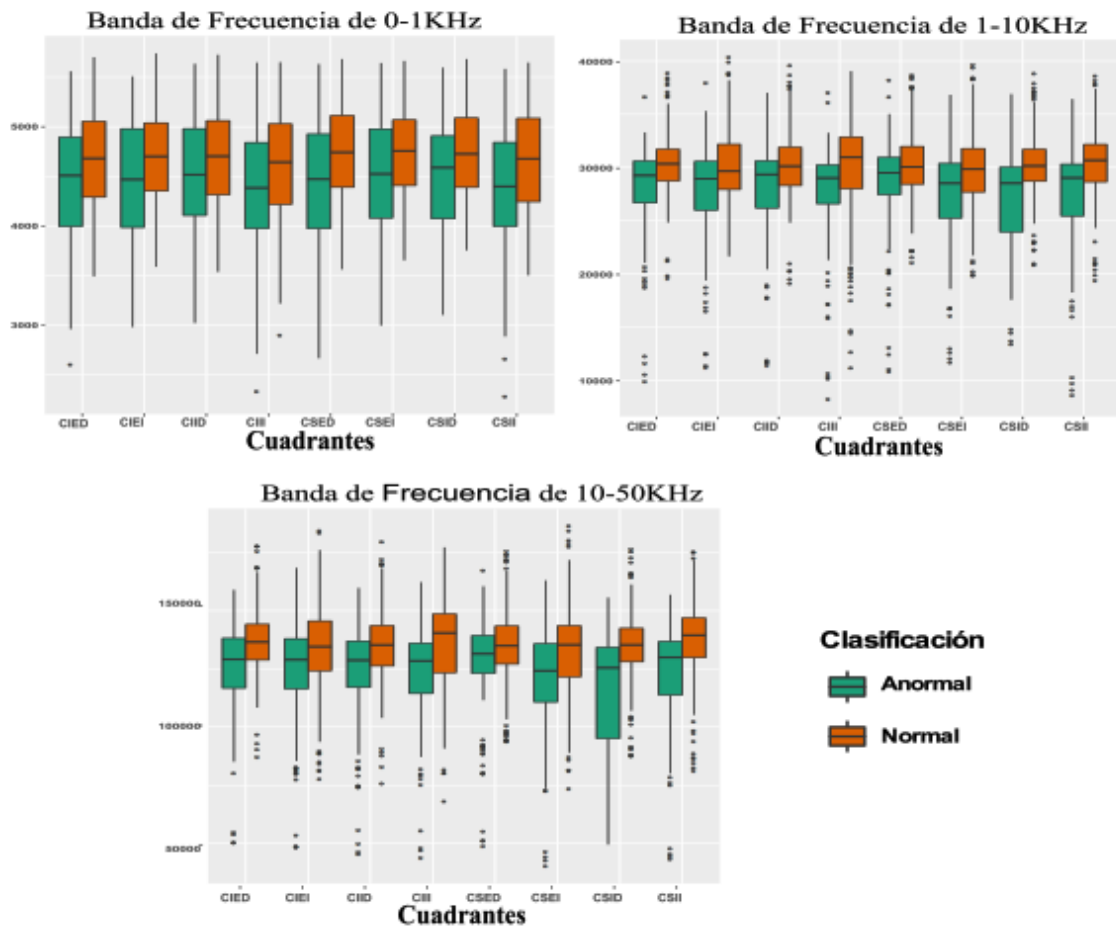
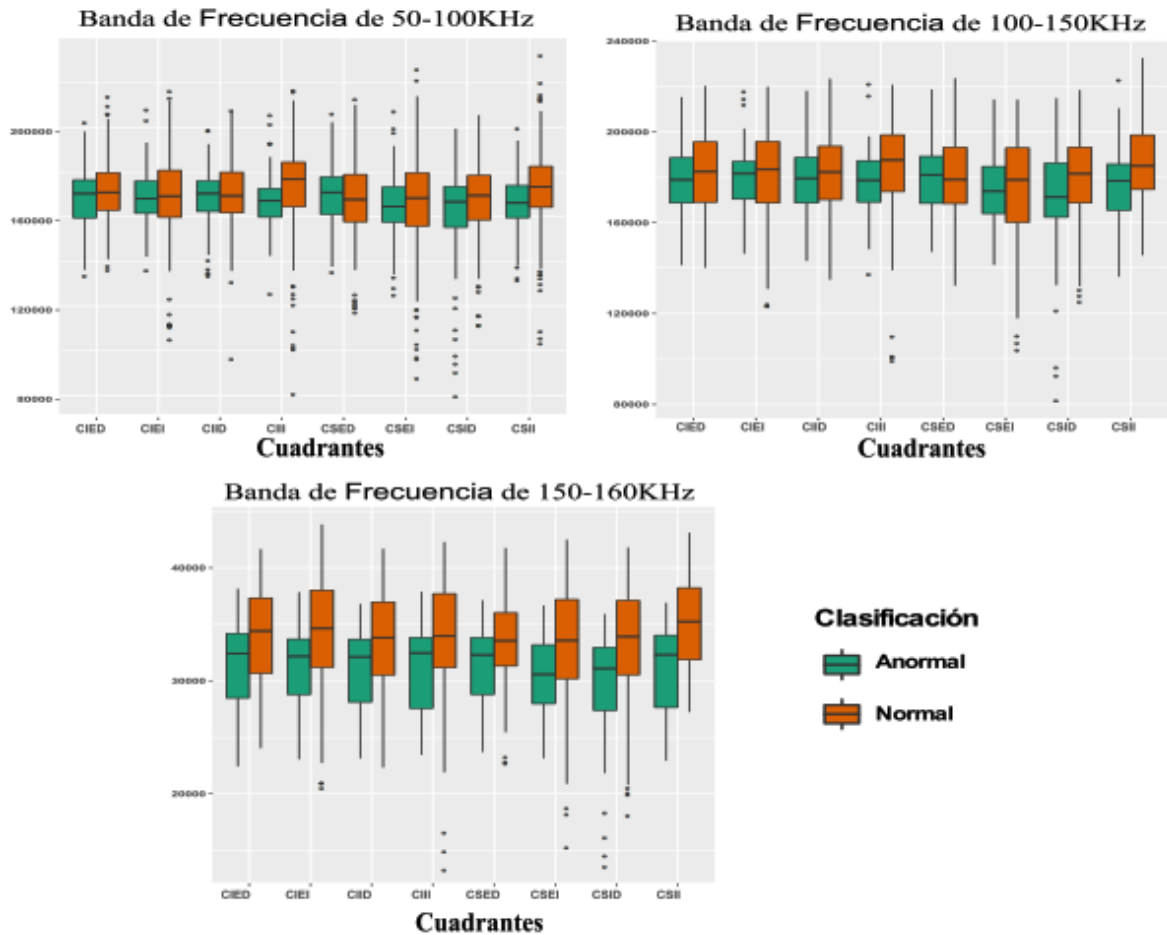


Figura 48. Representación en diagrama de cajas y bigotes para tres bandas de frecuencia (50-100, 100-150, 150-160 kHz) por cuadrantes, con etiquetas normal y anormal para el conjunto de datos de las 24 mujeres



5.11 RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS ESPECTRALES Y EL EFECTO DE CAMPO CARCINOGENÉTICO

Los parámetros espectrales elegidos para estudiar el efecto de campo carcinogénico fueron: detectores (D1, D2, Dif), cuadrantes (CSED, CSID, CIID, CIED, CSEI, CSII, CIII, CIEI), el número de datos por ventana V (512, 1024, 2048, 4096) elegidos en

el paso 1, de la sección 4.6 y el espectro de potencia a través de seis bandas de frecuencia (0-1, 1-10, 10-50, 50-100, 100-150, 150-160 kHz).

Los dos detectores, así como la diferencia entre las señales Dif, recuperan información del fenómeno predominante en la interacción luz-tejido, la dispersión. Los cuadrantes hacen relación a la zona de ubicación del sistema de iluminación-detección. El número de datos por ventana V , utilizados para minimizar el ruido y el espectro de potencia por medio de seis bandas de frecuencia, que se relacionan con información referente al movimiento Browniano dentro del tejido.

Se realizaron dos análisis estadísticos, ANOVA (Analysis of variance) y curvas ROC (receiver operating characteristic curve). El primero se hizo para observar si existen diferencias significativas entre las medias de los parámetros, esto se define a partir del valor de significancia $p < 0.05$, los parámetros que obtengan este valor podrían ser utilizados como clasificatorios del estado del tejido y se podría aseverar que existe una marcada correlación entre el rango numérico de los parámetros en cuestión y el efecto de campo carcinogénico. El segundo análisis, curva ROC, permite determinar la exactitud diagnóstica de estos parámetros (tests), esto se realiza determinando la sensibilidad y especificidad, junto con el área bajo la curva (AUC), estos permiten evaluar la capacidad discriminativa del test, es decir, su capacidad de diferenciar sujetos Normales versus Anormales. ROC permite diferenciar cuales parámetros espectrales miden en mejor medida el estado del tejido y por ende el efecto de campo carcinogénico.

5.11.1 Análisis ANOVA. Con base en los diagramas de cajas se observan diferencias entre las medianas de los resultados por paciente normal y anormal. Para verificar que existen diferencias entre estos valores, se realizó el análisis de la varianza ANOVA una vía. Para implementar este método, se formula la hipótesis nula que supone que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos de estudio. Para determinar si la hipótesis es aceptada o rechazada contiene la variable p , que se refiere a la

probabilidad de ocurrencia y se denomina variable de significancia. Para el valor de significancia $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, y lo contrario en caso de que $p > 0.05$. Dependiendo de la aplicación, el valor de esta variable puede variar, en este análisis se asignó como $p < 0.05$, esto indica que el resultado no es debido al azar y podría obtenerse de nuevo si se vuelve a realizar el experimento²⁵⁵.

La hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_a) se plantearon como:

H_0 : No hay diferencias significativas entre las medidas de los parámetros espectrales al comparar los datos con clasificación normal y anormal.

H_a : Existen diferencias significativas entre las medidas de los parámetros espectrales al comparar los datos con clasificación normal y anormal.

El análisis ANOVA se realizó considerando la variable clasificación (normal, anormal) como independiente y la variable dependiente definida por los diferentes parámetros de análisis, estos se utilizaron uno por uno. Es decir, para un número definido de ventana V , detector D1, banda de frecuencia y cuadrante. Para lograr este objetivo se utilizó un algoritmo de programación que mantiene la variable independiente constante (Normal y Anormal) e interactúa con los parámetros espectrales, variable dependiente.

Los resultados encontrados se resumen en las tablas 4.4, 4.5 y 4.6, en donde se presentan los valores de $p < 0.05$ que rechazan la hipótesis nula y aceptan la hipótesis alterna, estas se organizan considerando los parámetros de estudio. Los espacios que aparecen en blanco o los valores para D1, D2, Dif, bandas de frecuencias y cuadrantes que no aparecen es porque alcanzaron valores de $p > 0.05$.

²⁵⁵ Ibíd.

Tabla 10. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CSED y CSID

Datos por ventana V	Bandas de frecuencia kHz	CS D		CSED	CSID	CSID	CSID
		D1	D2		D1	Dif	D2
512	150-160 10-50 1-10	p=0,0204 F=6,24			p=0,0229 F=5,98 p=0,047 F=4,43 p=0,0185 F=6,47	p=0,0275 F=5,57	p=0,0305 F=5,35 p=0,0518 F=4,23 p=0,01 F=7,93
1024	10-50 1-10 0-1				p=0,0198 F=632	p=0,0362 F=4,98	p=0,0125 F=7,40 p=0,0323 F=1,71
2048	150-160 10-50 1-10 0-1	p=0,0327 F=5,20 p=0,0334 F=5,15			p=0,0377 F=5,13 p=0,0339 F= 5,12 P=0,0392 F=4,81	p=0,0174 F=6,61 p=0,0265 F=5,66	p=0,0317 F=5,26 p=0,0259 F=5,70 p=0,0311 F=5,30
4096	150-160 10-50 1-10 0-1	p=0,0264 F=5,66 p=0,0417 F=4,68 p=0,0346 F=5,08 p=0,063 F=5,67	p=0,0413 F=4,7		p=0,04 F= 4,76 p=0,041 F=4,71 p=0,0482 F=4,38	p=0,0363 F=4,97 p=0,0454 F=4,50	p=0,0299 F=5,39 p=0,0282 F=5,52 p=0,0315 F= 5,27

Tabla 11. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CSEI y CSII

Datos por ventana V	Bandas de frecuencia kHz	CSEI	CSEI	CSII	CSII	CSII
		D1	D2	D1	Dif	D2
512	150-160 10-50 1-10	p=0,0153 F=6,91 p=0,0292 F=5,45 p=0,0059 F=9,28	p=0,0447 F=4,53	p=0,0198 F=6,31 p=0,0209 F=6,19	p=0,0033 F=10,98 p=0,1075 F=2,81	p=0,0331 F=5,17 p=0,0446 F=4,54
1024	10-50 1-10 0-1	p=0,0101 F=7,97 p=0,0177 F=658		p=0,035 F= 5 p=0,0457 F=4,49	p=0,0089 F=8,23	p=0,0294 F=5,42 p=0,0342 F=5,10
2048	150-160 10-50 1-10 0-1	p=0,0183 F=6,50 p=0,02 F=6,29 p=0,0265 F=5,65			p=0,0091 F=8,18	p=0,0546 F=4,12
4096	150-160 10-50 1-10 0-1		p=0,0313 F=5,19	p=0,0438 F=4,58 p=0,0414 F=4,69 p=0,0437 F=4,58	p=0,0099 F=7,99	p=0,0481 F=4,38

Tabla 12. Resultados del análisis anova para los cuadrantes CIED, CIEI y CIII.

Datos por ventana V	Bandas de frecuencia kHz	CIED	CIEI	CIEI	CIEI	CIII
		Dif	D1	Dif	D2	D1
512	150-160 10-50 1-10		p=0,0477 F=4,53		p=0,0346 F=5,07 p=0,047 F=4,43	p=0,0467 F=4,44 p=0,0424 F=4,64
1024	150-160 10-50 1-10 0-1	p=0,026 F=5,57 p=0,0387 F=4,83 p=0,0425 F=4,64			p=0,0482 F=4,38	

Datos por ventana V	Bandas de frecuencia kHz	CIED	CIEI			CIII
		Dif	D1	Dif	D2	D1
2048	150-160 1-10 0-1	p=0,0474 F=4,41 p=0,0483 F=4,37				
4096	150-160 10-50 1-10 0-1	p=0,0276 F=5,57 p=0,0468 F=4,44		p=0,026 F=5,70		

Para cada conjunto de datos reportados en las tablas con valor $p < 0.05$, se demostró la normalidad de los residuos y homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos, ver en anexo 6.3 (se presenta tres ejemplos), estos confirman la validez de la aplicación del análisis ANOVA.

Entre los datos de las mujeres estudiadas se destacan los obtenidos para los cuadrantes CSID y CSII en el rango de frecuencia de 10-50 kHz. El CSID tiene la característica de aceptar la hipótesis alterna también en los rangos de frecuencia de 0-1, 1-10 y 150 160 kHz. Los otros cinco cuadrantes CSED, CSEI, CIED, CIEI y CIII muestran también diferencias significativas en rangos de frecuencias específicos. Dentro de estos resultados se destaca que el CIID, así como las bandas de frecuencia de 50-100 y 100-150 kHz en los ocho cuadrantes, obtienen un valor de $p > 0.05$ por lo tanto no contienen diferencias significativas al comparar los datos de las mujeres con clasificación Normal con Anormal.

Los datos reportados por las técnicas diagnósticas de mamografía y ecografía en las seis mujeres con anormalidades, ver tabla 4.1, muestran que estas alteraciones en los cuadrantes mamarios están distribuidas de la siguiente manera: cuatro mujeres con anormalidades en el CSED, tres en CSII y CIII, dos en CSEI, y una CSID. Estos resultados se muestran en concordancia con los reportados en esta investigación en donde se ha mostrado que CIID no contiene diferencias significativas al comparar los datos medidos en las mujeres con clasificación Normal

y Anormal, en cuanto que los cuadrantes CSID, CSII CSED, CSEI, CIED, CIEI, CIII muestran diferencias significativas entre estos dos grupos.

5.11.2 Curvas ROC. Para determinar si los parámetros espectrales elegidos pueden usarse para diferenciar el estado del tejido como normal o anormal, se implementó un algoritmo en RStudio, que permitió obtener la métrica de la sensibilidad y especificidad, o curva ROC (Receiver Operating Characteristic), a través de un método estadístico denominado regresión logística, este se enmarca en el grupo de modelos lineales generalizados (GLM)^{256, 257}.

Este método de regresión logística se usa para tratar de correlacionar la probabilidad de una variable cualitativa binaria definida como estado del tejido mamario (anormal "0" y normal "1") con una variable escalar X (parámetros espectrales). La idea es que la regresión logística aproxime la probabilidad de obtener "0" (no ocurre cierto suceso) o "1" (ocurre el suceso) con el valor de la variable explicativa x. En esas condiciones, la probabilidad $\mu(x)$ de que ocurra el suceso, dado que el individuo presenta los valores ($X_1 = x_1, X_2 = x_2, \dots, X_k = x_k$), se aproximará mediante una función logística que tiene la forma:

$$\mu(x) = \frac{\exp[\sum_{k=0}^n \beta_k x_k]}{1 + \exp[\sum_{k=0}^n \beta_k x_k]}.$$

²⁵⁶ Ibid.

²⁵⁷ Ibid.

El objetivo es hallar los coeficientes β_k que mejor se ajusten a esta función, estas constantes vinculadas con la probabilidad $\mu(x)$ se calculan usando la expresión 4.11.2, que hace referencia al predictor lineal η .

$$\eta = \log\left(\frac{\mu(x)}{1 - \mu(x)}\right) = \text{logit}(\mu(x)) = \sum_{k=0}^n \beta_k x_k.$$

El predictor lineal η en función de las variables x (conjunto de observaciones o parámetros espectrales), permite estimar los valores de las constantes, estas se obtienen usando la función `gml` en Rstudio. Para este cálculo RStudio obtiene el máximo del logaritmo de la función de verosimilitud (Maximum likelihood)²⁵⁸ [208], usando algunas funciones como por ejemplo: LOGIT (se utilizó esta), RELODI, MULTLR, EPIS- TAT, BMDP, SAS, etc. La verosimilitud es la probabilidad de los datos condicionada a los parámetros del modelo

Para aplicar GML con regresión logística, se propusieron cinco posibles modelos que contienen los cuatro parámetros espectrales que podrían utilizarse como variables predictoras X , del estado del tejido normal o anormal:

Modelo 1: Bandas de frecuencia. A manera de ejemplo, usando la regresión logística, esta variable predictor tiene seis categorías (seis bandas de frecuencia) y estará descrita por una probabilidad de ocurrencia dada por la ecuación 4.11.3.

$$\mu(x) = \frac{\exp[\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_6]}{1 + \exp[\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_6]}.$$

Al aplicar la función logarítmica $\text{logit}(\mu(x)) = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_6$, el modelo quedará descrito por las constantes, $(\alpha, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6)$. Todos estas

²⁵⁸ *Ibíd.*

son calculadas bajo el supuesto de independencia, considerando

$$\sum_{k=0}^n \beta_k = 0 .$$

Modelo 2: Bandas de frecuencias y edad ($Freq_k, Edad_j$), la edad es considerada un factor de riesgo discriminaste en la incidencia del cáncer de mamas.

Modelo 3: Bandas de frecuencias, edad y detectores ($Freq_k, Edad_j, Dect_l$)

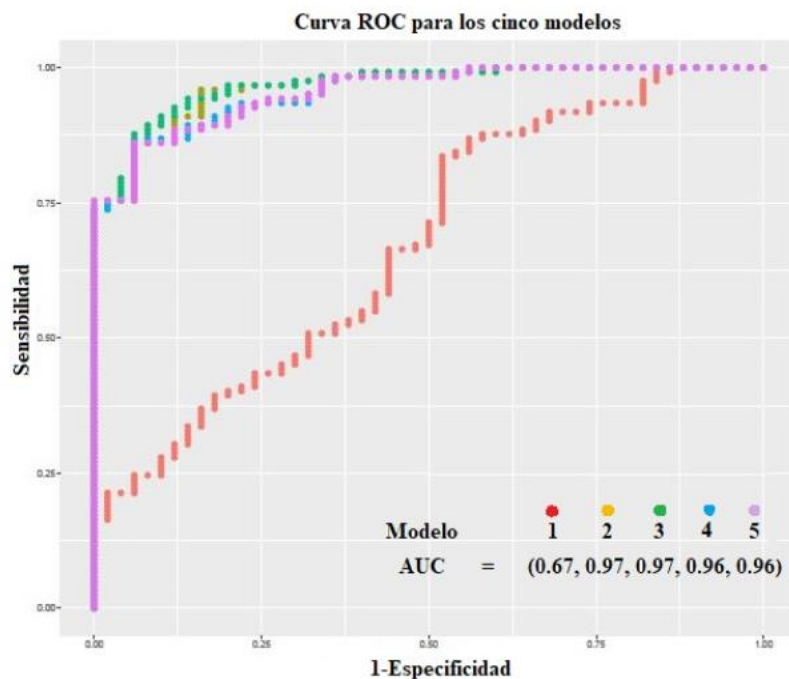
Modelo 4: Bandas de frecuencias, edad, detectores y cuadrantes ($Freq_k, Edad_j, Dect_l, Cud_m$).

Modelo 5, Bandas de frecuencias, edad y cuadrantes ($Freq_k, Edad_j, Cud_m$).

Los valores para las constantes β obtenidos por la estimación LOGIT para todos los modelos, se presentan en el anexo 6.4. Se agregó el parámetro de edad de las pacientes, el cual no se incluyó en el análisis ANOVA para no crear sesgo (aparece repetidamente para un individuo en cada cuadrante). Los modelos fueron entrenados utilizando el 70 % de los datos y con la función predict en RStudio se realizó la predicción de los modelos usando el 30 % restante de los datos

Capacidad predictiva de los modelos

Figura 49. Curva ROC para cinco modelos en los que se consideran las siguientes variables predictoras: 1. Bandas de frecuencia, 2. Bandas de frecuencias y edad, 3. Bandas de frecuencias, edad y detector, 4. Bandas de frecuencias, edad, detector y cuadrantes y 5. Bandas de frecuencias, edad y zona. En el eje x se presenta (1-Especificidad) y sobre el eje y la sensibilidad. AUC representa el área bajo la curva de los cinco modelos empleados.



En la figura 4.11.1, se presenta la curva ROC construida para los cinco modelos, esta representa una herramienta para seleccionar los modelos posiblemente óptimos y descartar modelos subóptimos. Este espacio ROC se define por la razón de los falsos positivos FPR (1-Especificidad) y la razón de los verdaderos positivos VPR.

(Sensibilidad) como los ejes x e y, respectivamente. Uno de los indicadores más aplicados en muchos contextos es el área bajo la curva ROC o AUC. El valor reportado por este índice se interpreta como la probabilidad de que, ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente. En la tabla 4.7, se presentan los valores del área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad para los cinco modelos elegidos y en el anexo 6.4, se encuentran los valores obtenidos para los parámetros relacionados con cada modelo²⁵⁹. Las curvas ROC fueron calculadas considerando un número de datos por ventana de 4096, este valor se seleccionó considerando el mejor valor AUC obtenido al considerar V (512, 1024, 2048, 4096), estos fueron elegidos en el paso 1, de la sección 4.6 para minimización del ruido.

Tabla 13. Área bajo la curva ROC de los cinco modelos elegidos

Modelos	1	2	3	4	5
AUC	0.67	0.97	0.97	0.96	0.96
Sensibilidad	0.18	0.84	0.84	0.78	0.8
Especificidad	0.93	0.95	0.94	0.92	0.9

De los resultados presentados en la tabla 4.7 y la gráfica 4.11.1, se observa el efecto sobre la sensibilidad de los modelos, cuando se consideran las variables edad, detectores y cuadrantes, ésta alcanza un valor del 84 %. Es decir, la capacidad de los modelos para predecir que un sujeto se encuentra enfermo ha aumentado de un 18 % a un valor de 84 %. La sensibilidad es especialmente importante cuando una enfermedad no debe pasar desapercibida y cuando el pronóstico mejora mucho con el tratamiento precoz.

En cuanto a la especificidad, al comparar el modelo 1, basado sólo en analizar las frecuencias, con los modelos 2 y 3 (edad, detectores), el valor de la especificidad

²⁵⁹ *Ibíd.*

oscila entre 90-95 %. Los modelos 2 y 3, proporcionan los mismos valores de sensibilidad y una especificidad muy cercana, además de tener un comportamiento casi idéntico sobre la curva ROC, con igual área bajo la curva $AUC_{\text{modelo2}} = AUC_{\text{modelo3}}$.

El modelo 2 con dos variables (bandas de frecuencias y edad) tiene ventaja sobre el modelo 3, porque permite obtener los mismos resultados con una combinación menor de variables predictoras. Esto generalmente se decide mediante el criterio de información de Akaike (AIC)²⁶⁰, dado por:

$$AIC = 2k - 2\ln(L).$$

Donde k es el número de parámetros y L el valor máximo en la función de verosimilitud. Por lo tanto, AIC mide la bondad de ajuste a partir de la máxima verosimilitud del modelo y la complejidad a partir el número de parámetros. La medida de bondad de ajuste en este caso es $2\ln(L)$. Esta es una función creciente (la bondad de ajuste aumenta de forma logarítmica respecto al valor de máxima verosimilitud, L), pero se hace decreciente al multiplicar por -1. Así, cuando L tiende a infinito, la expresión $2\ln(L)$ que aparece en la función de AIC tiende a un valor muy pequeño (el indicador AIC se reduce cuando aumenta la bondad de ajuste).

Los valores de AIC para cada modelo se encuentran en el anexo 6.4, de allí se extraen los valores AIC (189.27 y 191.22), para los modelos 2 y 3, respectivamente. Según estos valores, el modelo 2 es el que mejor hace predicciones dentro de los datos que lo han generado. Dentro de este modelo las variables que tienen mayor significancia ($p < 0.05$) son las bandas de frecuencia de: 0-1kHz, 100-150kHz y 150-160kHz (ver anexo 6.4, estimación logit), que en concordancia con los resultados

²⁶⁰ *Ibíd.*

expresados por el análisis ANOVA, las bandas 0-1kHz y de 150-160kHz influyen en la discriminación entre el estado normal y anormal del grupo de mujeres estudiadas con una confianza del 95 %.

Para determinar el punto de corte que mide la especificidad y sensibilidad más alta en el modelo 2, puede aplicarse el concepto del índice de Youden, calculado según la expresión (sensibilidad+especificidad-1). Este valor se ubica gráficamente en la curva ROC, como el punto más cercano al punto (0,1). Para este modelo se han elegido tres puntos, ver figura 4.11.2, con valores de índice de Youden condensados en la tabla 4.9.

Tabla 14. Puntos de corte elegidos sobre la curva ROC del modelo 2, e índice de Youden

Puntos de corte	1	2	3
x	0.08	0.06	0.04
y	0.9	0.86	0.79
Especificidad	0.91	0.94	0.96
Índice de Youden	0.81	0.80	0.75

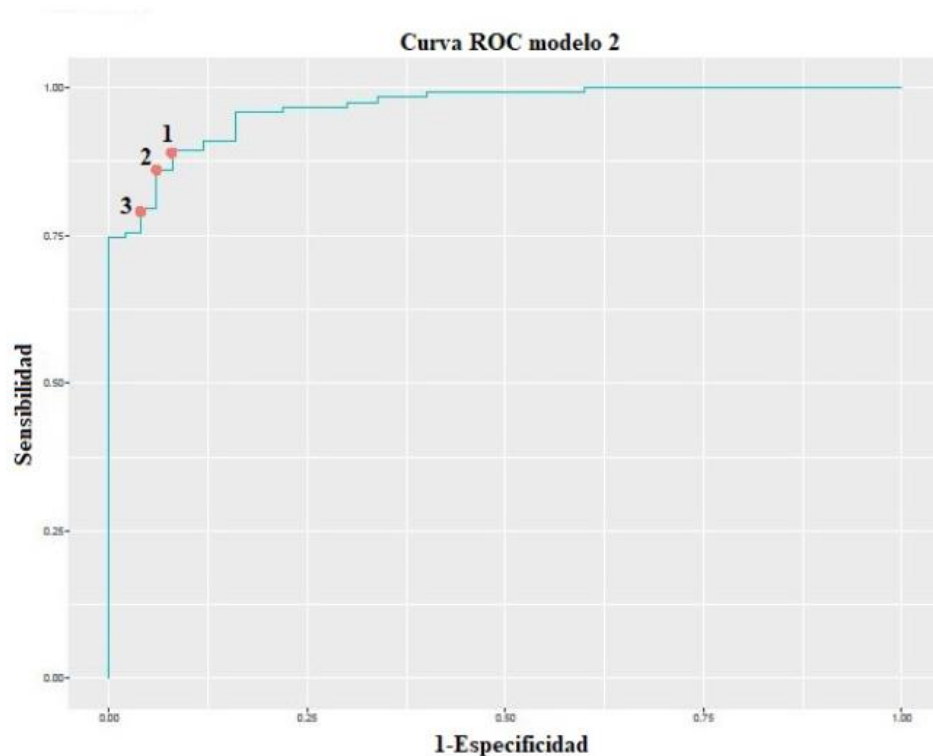
Para el punto elegido gráficamente como 1, se da el valor más alto del índice Youden, el cual contiene el valor más alto de sensibilidad pero no el más alto en especificidad²⁶¹. En algunas ocasiones cuando esto ocurre, el punto de corte puede decidirse dependiendo del objetivo del test diagnóstico, el cual puede ser altamente sensible o altamente específico. Esta decisión puede tomarse de acuerdo a los daños que pueda representar el diagnóstico sobre una persona.

Al señalar un falso positivo, este no es un riesgo de la enfermedad, sino de la técnica creada para la prestación del servicio, así si un paciente fallece de cáncer de mamas

²⁶¹ Ibid.

en un centro médico público, la muerte es por el mismo riesgo de padecer la enfermedad y no del servicio, pero si sufre daños por la gestión del tratamiento y no por el curso inevitable de la enfermedad, el daño no se realiza por el riesgo de cáncer (que no tiene pues es FP), sino del tratamiento, como riesgo del servicio médico. Al aceptar el punto 3 como punto de corte para el modelo 2, se establece un test diagnóstico con mayor especificidad, es decir, con una capacidad más alta para hacer un diagnóstico de normalidad.

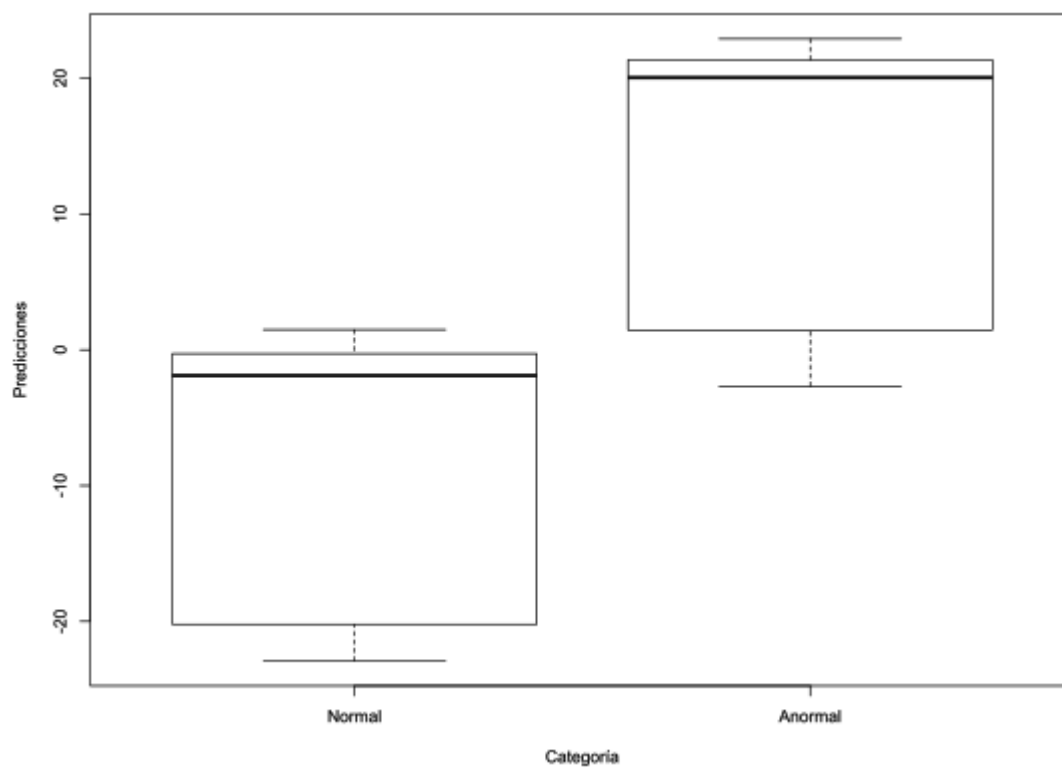
Figura 50. Curva ROC para el modelo 2 que reúne las variables predictoras relacionadas con las Bandas de frecuencias y edad. En el eje x se presenta (1-Especificidad) y sobre el eje y la sensibilidad. Se ubicaron tres puntos de corte para elegir los valores de sensibilidad y especificidad del modelo



Finalmente, se presentan las predicciones η del modelo 2 para valores de las variables predictoras en función de las categorías normal y anormal, en un diagrama de cajas y bigotes, ver figura 4.11.3. Estos valores son calculados a través de la

variable predict en RStudio, llamando los valores de predicciones descritos por la ecuación 4.11.2.

Figura 51. Predicciones η de las variables predictor del modelo 2 en función de la categoría normal y anormal.



6. CONCLUSIONES

La investigación realizada permite vislumbrar dos posibles técnicas para estudiar el efecto de campo carcinogénico en tejido mamario, y a su vez estudiar e identificar alteraciones que permitan realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Relación entre los espectros Raman y el efecto de campo carcinogénico

En concordancia con la hipótesis: "El efecto de campo carcinogénico se puede interpretar como un efecto de amplificación de las anomalías bioquímicas debido a las células anormales o transformadas", la espectroscopia Raman evidencio líneas espectrales en los tejidos normales relacionadas con HDA, CDIS y CDI. Estos resultados muestran una gran diferencia en el diagnóstico de posibles alteraciones en el tejido por patología y por espectroscopia Raman. La diferencia fundamental radica en la limitación óptica del sistema de estudio que utiliza el patólogo, el cual le permite visualizar alteraciones del orden macrométrico y micrométrico, en cuanto que el origen del cáncer puede describirse como una sumatorio de alteraciones genéticas o epigenéticas que modifican la estructura molecular de las células y de su entorno, estas son del orden nanométrico. Entre los cambios iniciales está el control de la señalización celular del tejido mamario, que es alterada por las células que han sido transformadas. La amplificación de las anomalías bioquímicas permite que estas señales biológicas estén presentes en todo el tejido, este es el caso de la muestra de tejido mamario tomada en el pezón, registrada por patología en su totalidad como normal (sin alteraciones), a más de diez centímetros del centro de grupo de células visiblemente alteradas, esta muestra de tejido evidencia líneas espectrales directamente relacionadas con CDI, uno de los carcinomas con mayor incidencia de cáncer de mamas a nivel mundial.

A diferencia de otros estudios, en este trabajo las condiciones iniciales de las muestras objeto de estudio no fueron modificadas, es decir, se propuso una metodología para estudiar muestras biológicas que se encuentran en bancos de tejidos, embebidas en parafina y con tinción. Esto se logró midiendo los espectros Raman de todos los compuestos usados en la preservación de las muestras y en la tinción. Al excluir las bandas Raman relacionadas con estos compuestos, se identificaron las líneas Raman del espectro que podrían pertenecer únicamente al tejido. De esta forma, se midió el efecto de campo carcinogénico en once muestras de tejido mamario y se estudió la distribución espacial de este efecto en dos muestras biológicas.

Sugerencias

Dadas las características de la espectroscopia Raman y la metodología propuesta para extraer las líneas Raman correspondientes a tejido mamario almacenado en las condiciones experimentales dadas por los laboratorios de patología de la UIS y UNAB. Se sugiere realizar un estudio más amplio en el que se mida la mayor cantidad de espectros Raman de las muestras de tejido mamario, esto permitiría formar una base de datos de líneas Raman y estados neoplásicos, para este tipo de muestras. Esta base podría utilizarse para identificar rápidamente los espectros Raman de muestras biológicas de mama que requieran un análisis patológico sustentado por espectroscopia Raman, esto será una ayuda fundamental en el tratamiento o procedimiento quirúrgico. También, con esta metodología puede estudiarse el efecto de campo carcinogénico en otros tipos de tejido biológico y así ampliar el conocimiento de las alteraciones relacionadas con los diferentes tipos de cáncer.

Retrodispersión por el tejido mamario y su relación con el efecto de campo carcinogénico

Se diseñó e implementó un sistema en el infrarrojo cercano para estudiar y medir el efecto de campo carcinogénico en el tejido mamario (FED-SA), que consta de las siguientes características: Un sistema de iluminación (NIR) y detección, que midió la interacción de la luz con el tejido por retro-dispersión, un sistema de adquisición de datos (tres canales activos de adquisición) que envió la información a un computador y un algoritmo de programación para toma de decisiones. El sistema FED-SA fue testeado al medir la potencia espectral de la luz retro-dispersada y su desviación estándar en tres grupos de partículas en suspensión (60-300, 100-400, 500-1000nm), la prueba control se realizó con partículas en suspensión de 315.9nm de poliestireno usadas en la calibración del Zetasizer de Malvern (medida de tamaño de partículas), verificando que la potencia espectral de estas partículas de poliestireno caen dentro del rango de la potencia espectral de 100-400nm.

Según la hipótesis propuesta: "Dado que las moléculas en medios acuosos describen movimientos Brownianos, por la temperatura y su interacción con el medio, en medidas de luz retro-dispersada, se puede estudiar el efecto de la dinámica de los centros dispersores del tejido, de la cual se espera observar las diferentes contribuciones espectrales entre tejidos normales y anormales, debido a las alteraciones bioquímicas presentes en los tejidos anormales".

FED-SA evidencia diferencias significativas entre los valores medios de la potencia espectral en 24 mujeres con clasificación normal y anormal. El análisis ANOVA, muestra como los cuadrantes CSID y CSII, contienen información relevante en cuanto al estado del tejido mamario. La información recolectada para el CSID, sugiere que las diferencias encontradas en bandas de frecuencia específicas (0-1, 1-10, 10-50, 150-160kHz) dentro la potencia espectral, son independientes de la señal recopilada por cada detector y del número de ventanas elegidas para minimizar el

ruido del conjunto de datos. Al comparar estos resultados con los reportados por mamografía, se observa que, dentro de las siete pacientes con anomalías, hay una paciente que contiene alteraciones de tamaños considerables ($3 \times 3 \times 2 \text{ cm}^3$ y $1,7 \times 1 \times 1,5 \text{ cm}^3$) en comparación con las otras, estas alteraciones están ubicadas únicamente en los cuadrantes superiores de la mama, y es la única con masas en el CSID. En cuanto a los CSED, CSEI, CIED, CIEI y CIII, estos muestran diferencias significativas utilizando parámetros específicos de frecuencia, detectores y número de datos por ventanas (minimización del ruido).

Según el análisis ANOVA la combinación de los parámetros: detectores (D1, D2, Dif), cuadrantes (CSED, CSID, CIID, CIED, CSEI, CSII, CIII, CIEI), el número de datos por ventana V (512, 1024, 2048, 4096) elegidos en el paso 1, de la sección 4.6 y el espectro de potencia a través de seis bandas de frecuencia (0-1, 1-10, 10-50, 50-100, 100-150, 150-160 kHz), permite discriminar el estado del tejido entre normal y anormal, y por ende medir el efecto de campo carcinogénico. Se propusieron cinco modelos a partir de estos parámetros, para analizar su capacidad discriminante como prueba diagnóstica usando una curva ROC. El modelo elegido como el mejor que hace predicciones dentro de los datos que lo han generado, es el compuesto por los parámetros bandas de frecuencia y edad (modelo 2), con una sensibilidad del 79 %, especificidad del 96 % un área bajo la curva AUC de 0.9669 y un AIC 737.39.

Los análisis mediante ROC (modelo 2: parámetros bandas de frecuencia y edad) y ANOVA, muestran como las bandas (0-1, 100-150kHz, 150-160kHz) y (0-1, 1-10, 10-50, 150-160kHz), respectivamente, influyen en la discriminación entre el estado normal y anormal del grupo de mujeres estudiadas con una confianza del 95 %. El movimiento Browniano de partículas en suspensión predice que las frecuencias de movimiento están relacionadas con el tamaño en las siguientes proporciones: 600nm (moviéndose a una frecuencia $f \leq 0.5\text{kHz}$), 60nm ($f \leq 5\text{kHz}$) y 6 nm

(frecuencias $\leq 50\text{kHz}$). Para el caso del haz de luz utilizado en el sistema de iluminación de FED-SA, el cual tiene una longitud de onda de 650 nm, la información recopilada por el sistema de adquisición proviene de luz retrodispersada dentro de los 0.5cm del tejido mamario. Así que las bandas de frecuencia que están discriminando el estado del tejido (normal o anormal) pueden contener información de la luz retro-dispersada por células de grasa (15-250 nm), fibras de colágeno (1-50nm), altura de las células epiteliales (25nm), microtubulos (10-25 nm), diámetro de las células epiteliales (10-20nm), diámetro de leucocitos (8-22nm), diámetro del núcleo de la célula (5-10nm), diámetro de las fibras de colágeno (0.5-12nm), diámetro de las fibras de elastina (2-3nm), mitocondrias y lisosomas (1-2nm), longitud del tropocolágeno (300nm), diámetro de fibrillas y microtubulos (5-400nm) y mitocondrias pequeñas (100-200nm).

Futuras investigaciones

Para que el sistema FED-SA pueda desarrollarse como una técnica de tamizado de cáncer de mamas, deben realizar varios estudios, entre ellos puede mencionarse: primero, ampliar en número las mujeres estudiadas, incluyendo poder acceder con el consentimiento informado a pacientes en estadios neoplásicos más avanzados, esto permitirá mejorar la sensibilidad de la técnica, segundo, realizar un seguimiento en el tiempo de pacientes normales, con anormalidades y aquellas que estén pasando por tratamiento, esta es una de las ventajas del haz de luz implementado, NIR no altera ni daña el tejido, y tercero, crear un modelo más robusto para determinar las métricas de sensibilidad y especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAMCZYK, Halina, et al. Raman 'optical biopsy' of human breast cancer. [Online]. Progress in biophysics and molecular biology, 2012, vol. 108, no 1-2, p. 74-81. Disable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610711001623>.

ABRAMCZYK, Halina, et al. The label-free Raman imaging of human breast cancer. Journal of Molecular Liquids, 2011, vol. 164, no 1-2, pp. 123-131.

ABRAMOVA, E. A., et al. Dynamics of Backscattering of Human Tissue on Exposure to a Low-Intensity Optical Radiation. Journal of Applied Spectroscopy, 2003, vol. 70, no 4, p. 644-647.

ACHARYA, U. Rajendra, et al. Thermography based breast cancer detection using texture features and support vector machine. Journal of medical systems, 2012, vol. 36, no 3, pp. 1503-1510.

ALLISON, Kimberly H. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. American journal of clinical pathology. 2012, vol. 138, no 6, p. 770-780.

ALMASSALHA, Luay M., et al. Label-free imaging of the native, living cellular nanoarchitecture using partial-wave spectroscopic microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, vol. 113, no 42, p. E6372-E6381.

ALMASSALHA, Luay M., et al. Macrogenomic engineering via modulation of the scaling of chromatin packing density. Nature biomedical engineering, 2017, vol. 1, no 11, p. 902.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. American Cancer Society, 2015, vol. 800, p. 1-64.

ANANTHAKRISHNAN, Revathi; EHRLICHER, Allen. The forces behind cell movement. International journal of biological sciences, 2007, vol. 3, no 5, p. 303.

BACKMAN, V., et al. Detection of preinvasive cancer cells. Nature, 2000, vol. 406, no 6791, p. 35.

BACKMAN, Vadim; and ROY, Hemant. Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification. Journal of Cancer, 2013, vol. 4, no 3, p. 251.

BAILEY, Regina. How and why cells move. [Online]. Science, Tech, Math. February 25, 2019. Disable: <https://www.thoughtco.com/how-and-why-cells-move-373377>

BAROLET, Daniel. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. En Seminars in cutaneous medicine and surgery. No longer published by Elsevier, 2008. pp. 227-238.

BASHKATOV, Alexey N.; GENINA, Elina A.; TUCHIN, Valery V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2011, vol. 4, no 01, pp. 9-38.

BAUER, Greta M., et al. The transformation of the nuclear nanoarchitecture in human field carcinogenesis. Future science OA, 2017, vol. 3, no 3, p. FSO206.

BERKESI, Marta, et al. Detection of small amounts of H₂O in CO₂-rich fluid inclusions using Raman spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering, 2009,

vol. 40, no 11, p. 1461-1463.

BISBAL PIAZUELO, J.; GÓMEZ GARCÍA, R.; FIDALGO RODRÍGUEZ, F. Aspectos Anatómicos de Interés en Cirugía Plástica de Mama. [En Línea]. Clínica Planas. Disponible en: <https://www.clinicaplanas.com>.

BLANPAIN, Cédric. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature cell biology*, 2013, vol. 15, no 2, pp. 126-134.

BLOCK, Stephan. Brownian Motion at Lipid Membranes: A Comparison of Hydrodynamic Models Describing and Experiments Quantifying Diffusion within Lipid Bilayers. *Biomolecules*, 2018, vol. 8, no 2, p. 30.

BOHREN, Craig F.; HUFFMAN, Donald R. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley & Sons, 2008.

BOUSTANY, Nada; BOPPART, Stephen; and BACKMAN, Vadim. Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light. *Annual review of biomedical engineering*, 2010, vol. 12, p. 285-314.

BREASTCANCER.ORG. Types of Breast Cancer. [Online]. BREASTCANCER.ORG. Last modified on October 16, 2018. Disponible: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types>.

BRUNEL, Benjamin, et al. Structure and dynamics of multicellular assemblies measured by coherent light scattering. *New Journal of Physics*, 2017, vol. 19, no 7, p. 073033.

BRYANT, David M.; MOSTOV, Keith E. From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008, vol. 9, no 11, p. 887.

BUTLER, Holly J., et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. [Online]. Nature protocols, 2016, vol. 11, no 4, p. 664. Disable: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>.

CASE, Kenneth M.; ZWEIFEL, Paul Frederick. Linear transport theory. 1967.

CASEY, Stephanie C., et al. The effect of environmental chemicals on the tumor microenvironment. Carcinogenesis, 2015, vol. 36, no Suppl_1, pp. S160-S183.

CAVUOTO, Paul; FENECH, Michael F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. Cancer treatment reviews, 2012, vol. 38, no 6, pp. 726-736.

CERDA, Jaime; CIFUENTES, Lorena. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Revista chilena de infectología, 2012, vol. 29, no 2, p. 138-141.

CERUSSI, Albert E., et al. Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography. Academic radiology, 2001, vol. 8, no 3, p. 211-218.

CHAI, Hong y BROWN, Robert. Field effect in cancer—an update. Annals of Clinical & Laboratory Science. 39(4):331–337, 2009.

CHANDLER, John, et al. High-speed spectral nanocytology for early cancer screening. Journal of biomedical optics, 2013, vol. 18, no 11, p. 117002.

CHANDRASEKHAR, Subrahmanyam. Radiative transfer. Courier Corporation, 2013.

CHATURVEDI, Deepika, et al. Different phases of breast cancer cells: Raman study of immortalized, transformed, and invasive cells. Biosensors, 2016, vol. 6, no 4, p.

57.

CHOE, Regine. Diffuse optical tomography and spectroscopy of breast cancer and fetal brain. University of Pennsylvania, 2005.

CHOU, Jonathan, et al. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nature cell biology*, 2013, vol. 15, no 2, p. 201.

CINTA PINZARU, Simona y ANDRONIE, Luisa. Raman Spectroscopy of the Hematoxylin-Eosin Stained Tissue. *Pro Environment / ProMediu*. 2015. pp. 590-12.

CLARK, Noel A.; LUNACEK, Joseph H.; and BENEDEK, George B. A study of Brownian motion using light scattering. *American Journal of Physics*, 1970, vol. 38, no 5, p. 575-585.

CLARK, Virginia; DUNN, O., and MICKEY, R. *Applied statistics, analysis of variance and regression*. Wiley, 1974.

CONTAG, Christopher H., et al. Monitoring dynamic interactions between breast cancer cells and human bone tissue in a co-culture model. *Molecular Imaging and Biology*, 2014, vol. 16, no 2, pp. 158-166.

CONTRERAS, C. Utrilla, et al. Diffusion-Weighted MRI: from Brownian Motion to Head & Neck Tumor Characterization. *International Journal of Interactive Multimedia & Artificial Intelligence*, 2017, vol. 4, no 5.

CORLU, Alper, et al. Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans. *Optics express*, 2007, vol. 15, no 11, pp. 6696-6716.

COUSSENS, Lisa M.; ZITVOGEL, Laurence; PALUCKA, A. Karolina. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 2013, vol. 339, no 6117, pp. 286-291.

CUBEDDU, Rinaldo, et al. Effects of the Menstrual Cycle on the Red and Near-infrared Optical Properties of the Human Breast. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 72, no 3, pp. 383-391.

CURTIUS, Kit; WRIGHT, Nicholas A.; and GRAHAM, Trevor. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer*, 2018, vol. 18, no 1, p. 19.

DAKUBO, G.; DANELY, P. Slaughters field cancerization concept of carcinogenesis: the path forward to early cancer detection and chemoprevention, *Cell Dev. Biol*, 2015, vol. 4, p. 158.

DAKUBO, Gabriel D., et al. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer cell international*, 2007, vol. 7, no 1, p. 2.

DALEY, William P.; PETERS, Sarah B.; and LARSEN, Melinda. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science*, 2008, vol. 121, no 3, p. 255-264.

DAMANIA, Dhwanil, et al. Insights into the field carcinogenesis of ovarian cancer based on the nanocytology of endocervical and endometrial epithelial cells. *International journal of cancer*, 2013, vol. 133, no 5, pp. 1143-1152.

DAMANIA, Dhwanil, et al. Nanocytology of rectal colonocytes to assess risk of colon cancer based on field cancerization. *Cancer research*, 2012, vol. 72, no 11, pp. 2720-2727.

DE CHARRY, Ligia Constanza; CARRASQUILLA, Gabriel y ROCA, Sandra. Equidad en la detección del cáncer de seno en Colombia. *Revista de salud pública*. pp. 10: 571–582, 2008.

DEPCIUCH, Joanna, et al. Application of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer. *Applied spectroscopy*, 2016, vol. 70, no 2, pp. 251-263.

DÍAZ, Sandra; PIÑEROS, Marion; y SÁNCHEZ, Oswaldo. Detección temprana del cáncer de mama: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. *Revista Colombiana Cancerología*. 2005. Vol. 9(3): pp. 93–105.

DOWNES, Andrew; and ELFICK, Alistair. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors*, 2010, vol. 10, no 3, pp. 1871-1889.

DRAVIDA, Swethasri, et al. Comparison of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin signal reliability with and without global mean removal for digit manipulation motor tasks. *Neurophotronics*, 2017, vol. 5, no 1, p. 011006.

DUBIN, Stuart B.; LUNACEK, Joseph H.; BENEDEK, George B. Observation of the spectrum of light scattered by solutions of biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1967, vol. 57, no 5, p. 1164.

DURDURAN, Turgut, et al. Bulk optical properties of healthy female breast tissue. *Physics in Medicine & Biology*, 2002, vol. 47, no 16, p. 2847.

DWORKIN, Amy M.; HUANG, Tim H.-M.; TOLAND, Amanda Ewart. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. En *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2009. p. 165-171.

DWORKIN, Amy; HUANG, Tim; and TOLAND, Amanda. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. En Seminars in cancer biology. Academic Press, 2009. p. 165-171.

EILERS, Paul HC; BOELEN, Hans FM. Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. Leiden University Medical Centre Report, 2005, vol. 1, no 1, p. 5.

EINSTEIN, Albert. On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the molecular-kinetic theory of heat (English translation, 1956). Investigations on the theory of the Brownian movement, 1905.

ELLIS, David I.; GOODACRE, Royston. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst, 2006, vol. 131, no 8, p. 875-885.

ELLSWORTH, Rachel; BLACKBURN, Heather; SHRIVER, Craig; SOON-SHIONG, Patrick and ELLSWORTH, Darrell. Molecular heterogeneity in breast cancer: state of the science and implications for patient care. En Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, 2017. p. 65-72.

ELOSEGUI-ARTOLA, Alberto, et al. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. Nature materials, 2014, vol. 13, no 6, p. 631.

FARIS, F., et al. Non-invasive optical monitoring of cerebral blood oxygenation in the foetus and newborn: preliminary investigation. Journal of biomedical engineering, 1992, vol. 14, no 4, pp. 303-306.

FARNSWORTH, Rae Helen; LACKMANN, M.; ACHEN, M.; and STACKER, S. Vascular remodeling in cancer. Oncogene, 2014, vol. 33, no 27, p. 3496-3505.

FAWCETT, Tom. An introduction to ROC analysis. Pattern recognition letters, 2006, vol. 27, no 8, pp. 861-874.

FEARON, Eric. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. Science, 1997, vol. 278, no 5340, pp. 1043-1050.

FERNÁNDEZ, Janeth, et al. Could field cancerization be interpreted as a biochemical anomaly amplification due to transformed cells? Medical hypotheses, 2016, vol. 97, pp. 107-111.

FERNÁNDEZ, P. Janeth, et al. Spectrograms comparison between normal and abnormal signal of in vivo mammary tissue, obtained by back-scattering infrared light. En Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2019. p. 012023.

FERRER ESPINILLA, Perla. Una contribución a la investigación de la espectroscopia Raman en el análisis de pigmentos: resultados teóricos y experimentales. 2014. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

FOO, Jasmine; LEDER, Kevin; RYSER, Marc D. Multifocality and recurrence risk: a quantitative model of field cancerization. Journal of theoretical biology, 2014, vol. 355, pp. 170-184.

FOUCHER, Frédéric. Detection of Biosignatures Using Raman Spectroscopy. En Biosignatures for Astrobiology. Springer, Cham, 2019. p. 267-282.

FRANGIONI, John V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. Current opinion in chemical biology, 2003, vol. 7, no 5, pp. 626-634.

FRANK, Christopher J.; MCCREERY, Richard L.; REDD, Douglas CB. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. Analytical chemistry, 1995, vol. 67, no 5, pp. 777-783.

FREUD, Paul J. Nanoparticle Sizing: Dynamic Light Scattering Analysis in the Frequency Spectrum Mode. Application Note: Microtrach Inc, 2007.

FUKSIS, Rihards, et al. Infrared imaging system for analysis of blood vessel structure. Elektronika ir Elektrotehnika, 2010, vol. 97, no 1, pp. 45-48.

FULLWOOD, Leanne M., et al. Effect of substrate choice and tissue type on tissue preparation for spectral histopathology by Raman microspectroscopy. [Online]. Analyst, 2014, vol. 139, no 2, pp. 446-454. Disable: <http://dx.doi.org/10.1039/C3AN01832F>.

GAZI, Ehsan; GARDNER, Peter. Preparation of tissues and cells for infrared and Raman spectroscopy and imaging. Vibrational Spectroscopic Imaging for Biomedical Applications. New York: McGraw-Hill, 2010, pp. 59-98.

GERMAIN, Ronald N.; ROBEY, Ellen A.; and CAHALAN, Michael. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. Science, 2012, vol. 336, no 6089, pp. 1676-1681.

GERNER, Eugene W.; MEYSKENS JR, Frank L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. Nature Reviews Cancer, 2004, vol. 4, no 10, p. 781.

GLADSTEIN, Scott, et al. Correlating colorectal cancer risk with field carcinogenesis progression using partial wave spectroscopic microscopy. Cancer medicine, 2018, vol. 7, no 5, pp. 2109-2120.

GOLDBURG, W. Dynamic light scattering. American Journal of Physics, 67(12): 1152–1160, 1999.

GRANADOS, Alejandro A., et al. Distributed and dynamic intracellular organization of extracellular information. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, no 23, pp. 6088-6093.

GRUND, Birgit; SABIN, Caroline. Analysis of biomarker data: logs, odds ratios and ROC curves. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2010, vol. 5, no 6, p. 473.

HA, Patrick K.; and CALIFANO, Joseph. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2003, vol. 14, no 5, pp. 363-369.

HAKA, Abigail S., et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 35, p. 12371-12376.

HAKA, Abigail S., et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *Journal of biomedical optics*, 2009, vol. 14, no 5, pp. 54-23.

HAKA, Abigail S., et al. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer research*, 2002, vol. 62, no 18, p. 5375-5380.

HAKA, Abigail S., et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer research*, 2006, vol. 66, no 6, pp. 3317-3322.

HALL, John E. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences, 2015.

HAN, Bing, et al. Differences and relationships between normal and atypical ductal

hyperplasia, ductal carcinoma in situ, and invasive ductal carcinoma tissues in the breast based on Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 2017, vol. 71, no 2, pp. 300-307.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no 5, pp. 646-674.

HANSON, Derek R.; and ATLAS, Mark. Chapter 23: Central Nervous System Malignancies. In Philip Lanzkowsky, Jeffrey M. Lipton, and Jonathan D. Fish, editors, *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology (Sixth Edition)*. Academic Press, San Diego, sixth edition, 2016. pp. 453 – 472.

HEAPHY, Christopher M., et al. Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *International journal of cancer*, 2006, vol. 119, no 1, pp 108-116.

HEAPHY, Christopher M.; GRIFFITH, Jeffrey K.; BISOFFI, Marco. Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. *Breast cancer research and treatment*, 2009, vol. 118, no 2, pp. 229-239.

HEUSMANN, Hans, et al. Spectral transillumination of human breast tissue. In *Optical Tomography, Photon Migration, and Spectroscopy of Tissue and Model Media: Theory, Human Studies, and Instrumentation*. International Society for Optics and Photonics, 1995. pp. 798-808.

HINCK, Lindsay; NÄTHKE, Inke. Changes in cell and tissue organization in cancer of the breast and colon. *Current opinion in cell biology*, 2014, vol. 26, pp. 87-95.

HORTON, Nicholas J.; KLEINMAN, Ken. *Using R and RStudio for data management, statistical analysis, and graphics*. Chapman and Hall/CRC, 2015.

HU, Yaogai; JIANG, Tao; ZHAO, Zhengyu. Discrimination of squamous cell carcinoma of the oral cavity using Raman spectroscopy and chemometric analysis. En 2008 First International Conference on Intelligent Networks and Intelligent Systems. IEEE, 2008. pp. 633-636.

HUANG, Ying; PEPE, Margaret S.; FENG, Ziding. Logistic regression analysis with standardized markers. The annals of applied statistics, 2013, vol. 7, no 3.

HULST, Hendrik Christoffel; VAN DE HULST, Hendrik C. Light scattering by small particles. Courier Corporation, 1981.

INSTRUMENTS, Malvern. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note Malvern, MRK656-01, 2012, vol. 1.

ISHIMARU, Akira. Wave propagation and scattering in random media. New York: Academic press, 1978.

JACQUES, Steven L. Optical properties of biological tissues: a review. Physics in Medicine & Biology. 2013, vol. 58, no 11, p. R37.

KAMEMOTO, Lori E., et al. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. Applied spectroscopy, 2010, vol. 64, no 3, pp. 255-261.

KELLER, Matthew D., et al. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. [Online]. Disease markers, 2008, vol. 25, no 6, p. 323-337. Disable: <http://europepmc.org/articles/PMC2756505>.

KEY, H., et al. Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths. Physics in medicine & biology, 1991, vol. 36, no 5, p. 579.

KINGSNORTH, A.; WALLACE, H.; BUNDRED, N.; and DIXON, J. Polyamines in breast cancer. *British journal of surgery*, 1984, vol. 71, no 5, pp. 352-356.

KOONTONGKAEW, Sittichai. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*, 2013, vol. 4, no 1, p. 66.

KRAKHMAL, Nadezhda V., et al. Cancer invasion: patterns and mechanisms. *Acta Naturae* (англоязычная версия), 2015, vol. 7, no 2 (25).

KRAUSE, Marina; WOLF, Katarina. Cancer cell migration in 3D tissue: Negotiating space by proteolysis and nuclear deformability. *Cell adhesion & migration*, 2015, vol. 9, no 5, pp. 357-366.

KRISHNA, C. Murali, et al. Raman spectroscopy of breast tissues. *Expert review of molecular diagnostics*, 2008, vol. 8, no 2, pp. 149-166.

KURIYAMA, Sei, et al. In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. *J Cell Biol*, 2014, vol. 206, no 1, pp. 113-127.

LI, Li; YONG, He; MIN, Zhao, and JIANXIN, Jiang. Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. *Burns & trauma*, 2013, vol. 1, no 1, p. 21.

LI, Qingbo; GAO, Qishuo; ZHANG, Guangjun. Classification for breast cancer diagnosis with Raman spectroscopy. *Biomedical optics express*, 2014, vol. 5, no 7, p. 2435-2445.

LIAO, Kang-Ling; BAI, Xue-Feng; FRIEDMAN, Avner. Mathematical modeling of interleukin-27 induction of anti-tumor T cells response. PLoS One, 2014, vol. 9, no 3, p. e91844.

LIAO, Kang-Ling; BAI, Xue-Feng; FRIEDMAN, Avner. Mathematical modeling of interleukin-27 induction of anti-tumor T cells response. PLoS One, 2014, vol. 9, no 3, p. e91844.

LIEBER, Chad, NETHERCOTT, Hubert, y KABEER, Mustafa. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. [Online]. Biomed. Opt. Express, 1(3):975–982, Oct 2010. Disable: <http://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-1-3-975>.

LIEBER, Chad; NETHERCOTT, Hubert; and KABEER, Mustafa. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. Biomedical optics express, 2010, vol. 1, no 3, p. 975-982.

LORD, R.; YU, Nai-Teng. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: II. Native ribonuclease and α -chymotrypsin. Journal of molecular biology, 1970, vol. 51, no 2, pp. 203-213.

LU, Pengfei; WEAVER, Valerie; and WERB, Zena. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol, 2012, vol. 196, no 4, p. 395-406.

LU, Renfu. Light scattering technology for food property, quality and safety assessment. Crc Press, 2016.

MACARA, Ian G.; MCCAFFREY, Luke. Cell polarity in morphogenesis and metastasis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, vol. 368, no 1629, p. 20130012.

MAHADEVAN-JANSEN, Anita; and RICHARDS-KORTUM, Rebecca. Raman spectroscopy for cancer detection: a review. En Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.'Magnificent Milestones and Emerging Opportunities in Medical Engineering'(Cat. No. 97CH36136). IEEE, 1997. p. 2722-2728.

MALIK, Akshat, et al. In vivo Raman spectroscopy–assisted early identification of potential second primary/recurrences in oral cancers: An exploratory study. Head & neck, 2017, vol. 39, no 11, p. 2216-2223.

MANOHARAN, Ramasamy; WANG, Yang; FELD, Michael S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1996, vol. 52, no 2, pp. 215-249.

MCBRIDE, Troy. Spectroscopic reconstructed near infrared tomographic imaging for breast cancer diagnosis. Tesis Doctoral. Dartmouth College. 2001.

MCCLATCHY III; and DAVID M. Development and Translation of Light Scatter Imaging and micro-Computed Tomography to Improve the Surgical Resection of Breast Cancer. 2018. Tesis Doctoral. Dartmouth College Hanover, New Hampshire.

MCCLESKEY, Brandi C., et al. GATA3 expression in advanced breast cancer: prognostic value and organ-specific relapse. American journal of clinical pathology, 2015, vol. 144, no 5, pp. 756-763.

MIAN, Salman A., et al. Development of a dewaxing protocol for tissue-engineered models of the oral mucosa used for Raman spectroscopic analysis. Applied Spectroscopy Reviews, 2014, vol. 49, no 8, pp. 614-617.

MIRANDA, D.; CRISTIANO, K.; GUTIÉRREZ, J. Breast phantom for mammary tissue characterization by near infrared spectroscopy. En Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2013. p. 012018.

MITCHISON, T.; and CRAMER, L. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell, 1996, vol. 84, no 3, pp. 371-379.

MOURANT, Judith R., et al. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. Applied optics, 1998, vol. 37, no 16, pp. 3586-3593.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, vol. 42, no 5, pp. 493-541.

NARAYANAN, V. Anantha; STOKES, David L.; VO-DINH, Tuan. Vibrational spectral analysis of Eosin Y and Erythrosin B—intensity studies for quantitative detection of the dyes. Journal of Raman spectroscopy, 1994, vol. 25, no 6, pp. 415-422.

NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION. Breast anatomy and how cancer starts. What are breasts made of? [Online]. National Breast Cancer Foundation. 19 of December of 2012. Disable: <https://nbcf.org.au/about-national-breast-cancer-foundation/about-%20breast-cancer/what-you-need-to-know/breast-anatomy-cancer-starts/>

NATURE EDUCATION. *Cell adhesion and cell communication*. [Online]. Nature. 2014. Disable: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-adhesion-and-cell-communication-14050486>

NISHIOKA, Kenji. Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches. Landes Bioscience, 1996.

NOSHO, Katsuhiko, et al. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. Gastroenterology, 2009, vol. 137, no 5, pp. 1609-1620. e3.

ORTIZ DORSAL, Luis Carlos. Identificación no-invasiva de sustancias biológicas por medio de espectroscopia Raman. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2014.

PAPPAS, Christos, et al. Evaluation of a Raman spectroscopic method for the determination of alcohol content in Greek spirit Tsipouro. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 2016, vol. 4, no Special Issue Nutrition in Conference October 2016, pp. 01-09.

PATEL, Nimit, et al. Relative capacities of time-gated versus continuous-wave imaging to localize tissue embedded vessels with increasing depth. Journal of biomedical optics, 2010, vol. 15, no 1, p. 016015.

PECORA, Robert. Spectral distribution of light scattered by monodisperse rigid rods. The Journal of Chemical Physics, 1968, vol. 48, no 9, pp. 4126-4128.

PERRY, F.; et al. Guía de Práctica Clínica para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del Cáncer de Mama. Instituto Nacional de Cancerología ESE; Instituto Nacional de Cancerología; Ministerio de Salud y Protección Social; y Colciencias. 2012.

PETERS, Victor George, et al. Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. Physics in Medicine & Biology, 1990,

vol. 35, no 9, p. 1317.

PICHARDO-MOLINA, J. L., et al. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers in medical science*, 2007, vol. 22, no 4, pp. 229-236.

PODLAHA, Ondrej; RIESTER, Markus; DE, Subhajyoti; and MICHOR, Franziska. Evolution of the cancer genome. *Trends in Genetics*. 2012, vol. 28, no 4, pp. 155-163.

PUERTO, M.; and BALZARETTI, N. Raman and infrared vibrational modes of tricosane paraffin under high pressure. *Vibrational Spectroscopy*, 2014, vol. 75, pp. 93-100.

PUSZTAIA, Lajos; MAZOUNIA, Chafika; ANDERSONB, Keith; WUC, Yun and FRASER, Symmansc. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *The Oncologist*, 2006, vol. 11, no 8, pp. 868-877.

QIU, Le, et al. In Vivo Optical Detection of Dysplasia in Barrett's Esophagus with Endoscopic Light Scattering Spectroscopy. *En Barrett's Esophagus*. Academic Press, 2016. pp. 91-104.

RADOSEVICH, Andrew J., et al. Ultrastructural alterations in field carcinogenesis measured by enhanced backscattering spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 2013, vol. 18, no 9, p. 097002.

RAMAN, Chandrasekhara Venkata. A new radiation. *Indian Journal of physics*, 1928, vol. 2, pp. 387-398.

RANIERO, L., et al. In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2011, vol. 130, no 4-6, pp. 1239-1247.

RAZALI, Nornadiah Mohd, et al. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2011, vol. 2, no 1, pp. 21-33.

REDD, Douglas C., CHUAN, Zhe. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, pp. 787-791.

REDD, Douglas, et al. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied spectroscopy*, 1993, vol. 47, no 6, pp. 787-791.

REHMAN, Shazza, et al. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 2007, vol. 38, no 10, pp. 1345-1351.

REJON, Carlis; MCCAFFREY, Luke. Cell polarity in mammary gland morphogenesis and breast cancer. *En Cell Polarity 2*. Springer, Cham, 2015. pp. 187-207.

REQUENA RODRÍGUEZ, Alberto y ZÚÑIGA ROMÁN, José. *Espectroscopia*. Madrid: Pearson/Prentice Hall, 2004.

RIVENBARK, Ashley G., and COLEMAN, William B. Field cancerization in mammary carcinogenesis—Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Experimental and molecular pathology*, 2012, vol. 93, no 3, p. 391-398.

ROY, Hemant K., et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) mediates the early increase of blood supply (EIBS) in colon carcinogenesis. *FEBS letters*, 2007, vol. 581, no 20, pp. 3857-3862.

ROY, Hemant K., et al. Spectroscopic microvascular blood detection from the endoscopically normal colonic mucosa: biomarker for neoplasia risk. [Online]. *Gastroenterology*, 2008, vol. 135, no 4, p. 1069-1078. Disable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508011001>.

ROY, Hemant K.; HENSING, Thomas; BACKMAN, Vadim. Nanocytology for field carcinogenesis detection: novel paradigm for lung cancer risk stratification. *Future oncology*, 2011, vol. 7, no 1, pp. 1-3.

RUEDA, Mesa, et al. Caracterización de los monómeros DGEBA y TMAB, y seguimiento de la reacción de entrecruzamiento por espectroscopia Raman. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 2013, vol. 21, no 3, pp. 414-423.

SAKAMOTO, Yosiyuki; ISHIGURO, Makio; KITAGAWA, Genshiro. Akaike information criterion statistics. Dordrecht, The Netherlands: D. Reidel, 1986, vol. 81.

SCAFFARDI, Lucía B.; VIDELA, Fabián A.; SCHINCA, Daniel C. Visible and near-infrared backscattering spectroscopy for sizing spherical microparticles. *Applied optics*, 2007, vol. 46, no 1, pp. 67-75.

SEKHAR TALARI, Abdullah Chandra, et al. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 2015, vol. 50, no 1, pp. 46-111.

SHAFFER-PELTIER, Karen E., et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2002, vol. 33, no 7, pp. 552-563.

SHAH, Natasha, et al. Noninvasive functional optical spectroscopy of human breast tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no 8, pp. 4420-4425.

SHARMA, Shiv K.; MISRA, Anupam K.; SHARMA, Bhavna. Portable remote Raman system for monitoring hydrocarbon, gas hydrates and explosives in the environment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, vol. 61, no 10, pp. 2404-2412.

SHUBBAR, Emman. *Analysis of Novel Biomarkers for Unfavorable Breast Cancer Prognosis (tesis)*. Gothenburg: University of Gothenburg. 2012.

SHUBBAR, Emman. *Analysis of Novel Biomarkers for Unfavorable Breast Cancer Prognosis*. 2012.

SINGH, S, et al. In vivo Raman spectroscopy of oral buccal mucosa: a study on malignancy associated changes (MAC)/cancer field effects (CFE). *Analyst*, 138(14). 2013. pp. 4175– 4182.

SLAUGHTER, Danely; SOUTHWICK, Harry; and SMEJKAL, Walter. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 1953, vol. 6, no 5, pp. 963-968.

SMEKAL, Adolf. Zur quantentheorie der dispersion. *Naturwissenschaften*, 1923, vol. 11, no 43, pp. 873-875.

SMITH, J., et al. Raman spectral mapping in the assessment of axillary lymph nodes in breast cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2003, vol. 2, no 4, pp. 327-331.

SOBOCINSKI, Raymond L.; PEMBERTON, Jeanne E. Determination of alcohol solvent orientation and bonding at silver electrodes using surface-enhanced Raman scattering: methanol, ethanol, 1-propanol, and 1-pentanol. *Langmuir*, 1992, vol. 8, no 8, pp. 2049-2063.

SOLIMAN, Hany, et al. Functional imaging using diffuse optical spectroscopy of neoadjuvant chemotherapy response in women with locally advanced breast cancer. *Clinical cancer research*, 2010, vol. 16, no 9, pp. 2605-2614.

SUBRAMANIAN, Hariharan, et al. Partial-wave microscopic spectroscopy detects subwavelength refractive index fluctuations: an application to cancer diagnosis. *Optics letters*, 2009, vol. 34, no 4, pp. 518-520.

SUZUKI, Kazunori, et al. Quantitative measurement of optical parameters in normal breasts using time-resolved spectroscopy: in vivo results of 30 Japanese women. *Journal of biomedical optics*, 1996, vol. 1, no 3, pp. 330-335.

TAE, Kyung, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clinical cancer research*, 2000, vol. 6, no 7, pp. 2821-2828.

TALUKDAR, S., et al. Evolving strategies for therapeutically targeting cancer stem cells. *En Advances in cancer research*. Academic Press, 2016. p. 159-191.

TARONI, Paola, et al. Do shorter wavelengths improve contrast in optical mammography? *Physics in Medicine & Biology*, 49(7): 2004. p. 1203.

TFAYLI, Ali, et al. Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies. *Applied spectroscopy*, 2009, vol. 63, no 5, pp. 564-570.

TIWARI, Ashish K., et al. Neo-angiogenesis and the premalignant micro-circulatory augmentation of early colon carcinogenesis. *Cancer letters*, 2011, vol. 306, no 2, pp. 205-213.

TOMASKOVIC-CROOK, Eva; THOMPSON, Erik W.; THIERY, Jean Paul. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast cancer research*, 2009, vol. 11, no 6, p. 213.

TRUJILLO, Kristina A., et al. Breast field cancerization: isolation and comparison of telomerase-expressing cells in tumor and tumor adjacent, histologically normal breast tissue. *Molecular Cancer Research*, 2011, vol. 9, no 9, pp. 1209-1221.

TSEKOV, Roumen; LENSEN, Marga C. Brownian Motion and the Temperament of Living Cells. *Chinese Physics Letters*, 2013, vol. 30, no 7, p. 070501.

TUCHIN, Valery V. *Handbook of photonics for biomedical science*. CRC Press, 2010.

TUCHIN, Valery V. Laser light scattering in biomedical diagnostics and therapy. *Journal of laser applications*, 1993, vol. 5, no 2, pp. 43-60.

TUCHIN, Valery V. Polarized light interaction with tissues. *Journal of biomedical optics*, 2016, vol. 21, no 7, p. 071114.

TUCHIN, Valery. Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 2015, vol. 1, no 2.

VAN VEEN, R. L. P., et al. Intraoperatively assessed optical properties of malignant and healthy breast tissue used to determine the optimum wavelength of contrast for optical mammography. *Journal of biomedical optics*, 2004, vol. 9, no 6, pp. 1129-

1137.

VAN ZIJL, Franziska; KRUPITZA, Georg; MIKULITS, Wolfgang. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2011, vol. 728, no 1-2, pp. 23-34.

VASKOVA, H. Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. Int. J. Biol. & Biomed. Eng, 2014, vol. 8, pp. 27-34.

VISVADER, Jane E. Cells of origin in cancer. Nature, 2011, vol. 469, no 7330, p. 314.

WALI, R. K., et al. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. Gut, 2005, vol. 54, no 5, pp. 654-660.

WANG, Changsong, et al. Volatile Organic Metabolites Identify Patients with Breast Cancer, Cyclomastopathy and Mammary Gland Fibroma. Scientific reports, 2014, vol. 4, p. 5383.

WANG, Lihong V.; WU, Hsin-i. Biomedical optics: principles and imaging. John Wiley & Sons, 2012.

WANG, Yuan-Yuan, et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. Cancer letters, 2012, vol. 324, no 2, pp. 142-151.

WAX, Adam and BACKMAN, Vadim. Biomedical applications of light scattering. McGraw Hill Professional, 2009.

WOLF, Katarina, et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. J Cell Biol, 2013, vol. 201, no 7, pp. 1069-1084.

WORLD CANCER RESEARCH FOUND INTERNATIONAL. Breast Cancer Statistics. American Institute for Cancer Research. 2015. (Recuperated 31 de enero de 2019). Disable: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>

YANKEELOV, Thomas E., et al. Clinically relevant modeling of tumor growth and treatment response. Science translational medicine, 2013, vol. 5, no 187, p. 187ps9-187ps9.

YI, Ji, et al. Spatially resolved optical and ultrastructural properties of colorectal and pancreatic field carcinogenesis observed by inverse spectroscopic optical coherence tomography. Journal of biomedical optics, 2014, vol. 19, no 3, p. 36-13.

YU, Min, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. Science, 2013, vol. 339, no 6119, p. 580-584.

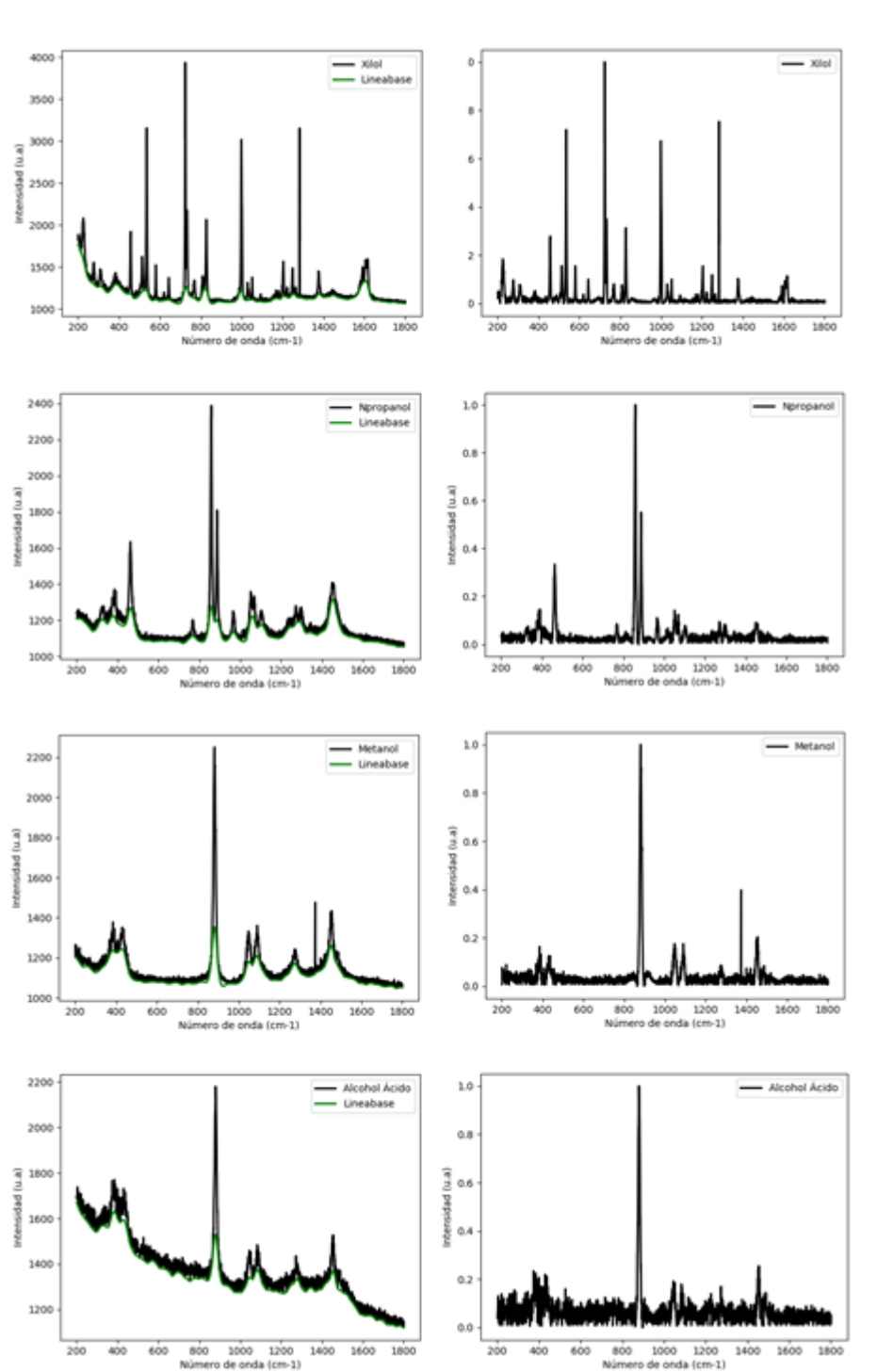
ZHANG, Mei; LEE, Adrian; ROSEN, Jeffrey. The cellular origin and evolution of breast cancer. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2017, vol. 7, no 3, pp. 27-128.

ANEXOS

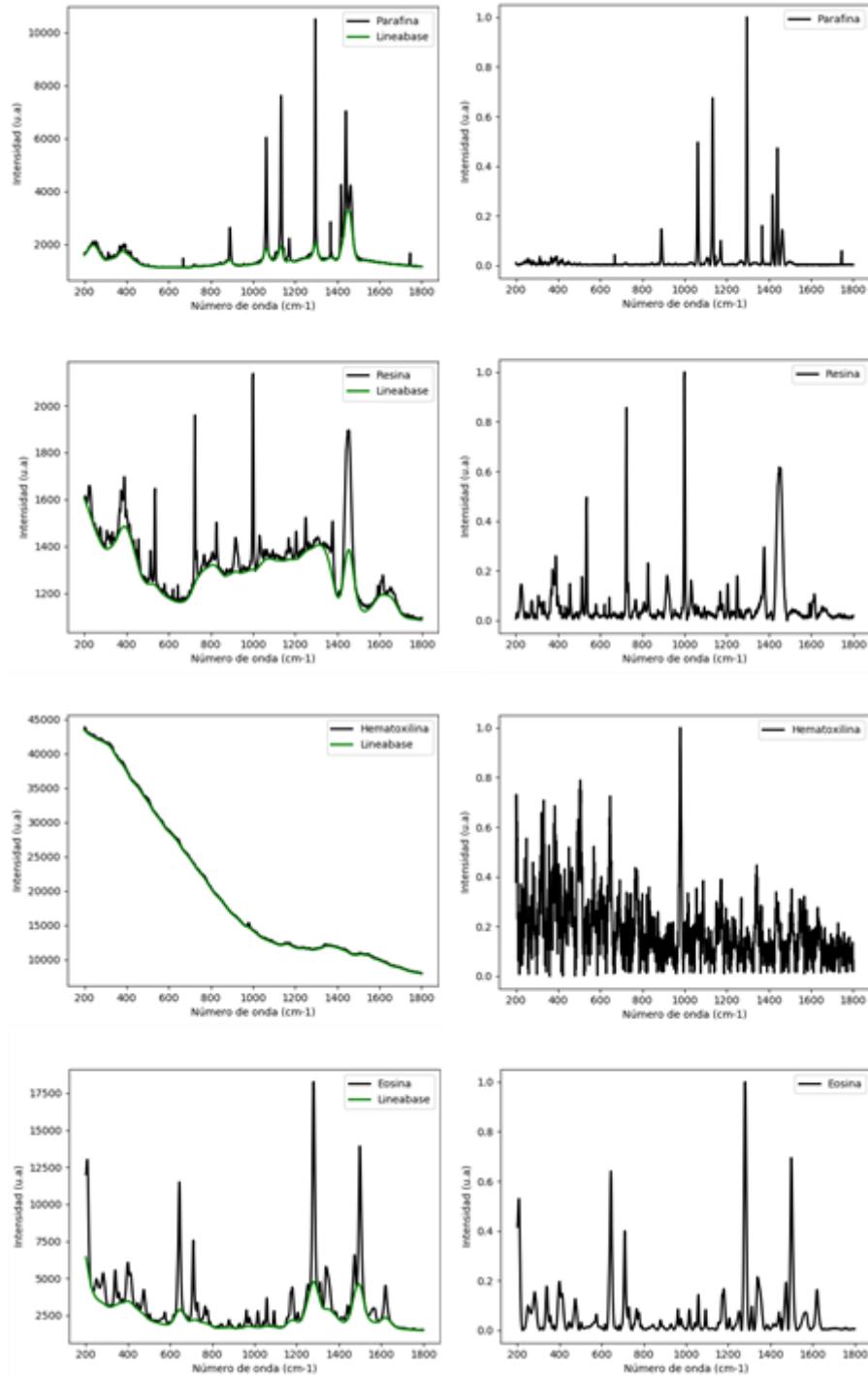
ANEXO A. DISPERSIÓN RAMAN

Para todos los compuestos implementados en los laboratorios de patología de la UNAB y UIS, usados en la preservación de la bioquímica del tejido mamario, se midieron los espectros Raman en el rango de $200\text{-}2000\text{cm}^{-1}$. En las figuras 6.1.1 y 6.1.2, se presentan a la izquierda los espectros en bruto (color negro), junto con la línea base (color verde) y a la derecha el espectro de cada compuesto después de eliminar la línea base.

A partir de los espectros de estos compuestos, se enlistaron las líneas Raman en las once muestras de tejido, estas se presentan en las tablas 6.1, 6.2 y 6.3. Para la construcción de las tablas se usó como nomenclatura el número de la paciente acompañada de la clasificación cáncer (C) o Normal (N), de esta forma las muestras procesadas por el laboratorio de patología de la UNAB se etiquetaron como P1N, P1C, P2C, P3N, P3C, P4N y P4C, en cuanto a las muestras del laboratorio de patología de la UIS se antepuso a la clasificación una letra que está relacionada con la zona de extracción de la muestra en las pacientes de la siguiente forma: P5AN, P5AC, P6A2C, P6DN, P6DC, P7A1N, P7A1C, P5AN, P5AC, P6A2C, P6DN, P6DC, P7A1N y P7A1C.



A la derecha corrección de línea base implementada y a la izquierda espectro Raman final normalizado. Para el Xilol, Npropanol, Etanol y Alcohol Ácido.



A la derecha corrección de línea base implementada y a la izquierda espectro Raman final normalizado. Para la Parafina, Resina Epoxi, Hematocilina y Eosina.

Bandas Raman para las muestras de los pacientes P1, P2, P3 y P4 entre los rangos $600\text{--}1800\text{cm}^{-1}$, con clasificación cáncer (C) y normal (N). Laboratorio de patología UNAB.

P1N	P1C	P2C	P3N	P3C	P4N	P4C	Asignación de Bandas[116, 142, 143, 144, 145, 146]
639	639	639	639	639	638	638	640 estiramiento del enlace $C-S$ y giro $C-C$ de proteína tirosina, 640 Cáncer , 644 Xilol,
		681	681		678	678	678 Modos de respiración de anillo en las bases de ADN
708	708	708	708		705	705	702 Colesterol, éster de colesterol, 710 Eosina
739	731	737				734	733 Fosfatidilserina, Xilol, 735 Estiramiento $C-S$ (Uno de los tres picos del tiocianato), 736 Eosina
772	777	772	772	777	774	774	776 Fosfatidilinositol, 778 Eosina
	828	833					827 Resina epoxi, Xilol, 831 Estiramiento $O-P-O$ asimétrico, tirosina,
849		854	851	854	851		851 Anillo de respiración de tirosina, 854 Npropanol
955	923	920	923		934		920 Estiramiento $C-C$ del anillo de prolina / glucosa / ácido láctico, 920 DCI, 934 Columna vertebral de $C-C$ (colágeno), 954 Carotenoides (ausencia en tejidos normales)
974	974	974	971	971			971 movimiento $v(C-C)$, 973 ácido metil ester, 974 vibración de la ribosa, Uno de los distintos modos del RNA con 874 y 915 cm^{-1}
1000	1003	1000	1000	1000	1000	1000	998 Resina epoxi, 999 Xilol, 1002 Fenilalanina (colágeno), 1026 1029 1025 Carbohidratos (Glucógeno), 1030 Xilol
1043	1043	1043		1043		1040	1040 Formalina , 1043 DCI, 1044 Alcohol ácido
1059	1054		1059				1051 Xilol, 1055 información respecto a los ácidos nucleicos, 1057 Lípidos, 1058 Eosina
1088	1088	1088	1088	1088	1088	1088	1087-90 Estiramiento $C-C$, PO_2 , 1089 Etanol
1125			1130				1130 Trans-conformación del estiramiento esquelético , 1131 Parafina
	1152	1152		1152		1152	$v(C-N)$, Proteínas, $v(C-C)$ Carotenoides
1168	1168	1167	1168	1168	1167	1167	1168 lípidos, 1169 Colágeno tipo I , DCI, Xilol 1170 Flexión en el plano $C-H$ de la tirosina, 1172 Resina epoxi 1197 1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, Amida III (Proteínas), 1202 Xilol
1226	1231	1242	1242	1242	1244	1234	1222 Xilol, 1224 Amida III (Hoja plegada Beta), 1230 Amida III (Estiramiento $C-N$ y flexión de $N-H$), 1242 Amida III (Hoja plegada beta y bobina aleatoria), 1247 Xilol
1271	1271	1271	1271		1271	1271	1269 DCI, 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento $C-N$ de las proteínas en la hoja plegada beta, $C=C$ grupos en ácidos grasos insaturados
1311	1311						1309, Modo de torsión molécula CH_3CH_2 de colágeno / lípidos
1341	1341	1341	1341	1341	1341	1341	1340 Ácido nucleico, deferencias en contenido de colágeno, modo vibracional del ácido nucleico indicando el contenido del mismo en el tejido, 1342 Hematoxilina, 1343 DCI
1386							1386 CH_3
	1401						1401 Modos de flexión de grupos metilo (colágeno)
		1428			1428	1428	1420-50 CH deformación (DNA/RNA proteínas, lípidos y carbohidratos)
	1439		1436				1436 Tijera de CH_2 , 1439 Flexión en tejido normal CH_2 , 1439 Lípidos
1463		1460	1460	1460	1462		1460 Deformación lípidos y colágeno CH_3/CH_2 , 1462 Disacáridos, sacarosa, δCH_2 , 1463 parafina
1500	1500	1497	1500	1500		1497	1498 Eosina, 1499 $C=C$ estiramiento en anillo de benceno 1524 1524 Carotenoides (Ausencia en tejido normal) 1550 1552 Triptófano (Proteínas)
1561	1563	1561	1561	1561			1560-70 COO^-
1617	1617	1617	1614	1614	1617	1617	1611 Xilol, 1614 Tirosina, 1618 Triptófano (Proteínas), 1620 Eosina 1691 1691 1682 Estiramiento de las vibraciones de cortisona

Bandas Raman para las muestras de los pacientes P5, P6 y P7 entre los rangos 600 1800 cm^{-1} . Nomenclatura para los pacientes en concordancia con la zona de procedencia como A, A2, D y A1, A2, A3, B respectivamente. Clasificación cáncer (C) y normal (N). Laboratorio de patología UIS.

P5AN	P5AC	P6A2C	P6DN	P6DC	P7A1N	P7A1C	Asignación de Bandas [116, 142, 143, 144, 145, 146]
638	638	638	638	638	638	638	640 estiramiento del enlace $C-S$ y giro $C-C$ de proteína tirosina, 640 cáncer , 644 Xilol
673	673	678		678	662	662	662 Colágeno tipo I, 678 Modos de respiración de anillo en las bases de ADN
708	708	708	702	702	708	708	702 Colesterol, éster de colesterol, 710 Eosina
734				734			733 Fosfatidilserina, Xilol, 735 Estiramiento $C-S$ (tiocianato), 736 Eosina
774	774	771			772	772	776 Fosfatidilinositol, 778 Eosina
		936				950	936 Proteína, 954 Carotenoides (ausencia en tejidos normales)
1000	1000	1000					998 Resina epoxi, 999 Xilol, 1002 Fenilalanina
1053	1053	1053					1051 Xilol, 1053 Estiramiento $C-O$ y $C-N$ (proteína)
1088	1088	1085	1088	1088			1084 Grupos fosfodiéster en ácidos nucleicos 1087-90 Estiramiento $C-C$, PO_2 , 1089 Etanol
		1123					1123 Proteínas $C-N$, estiramiento en lípidos y proteínas $C-C$
1146	1152	1152					1044 Alcohol ácido, 1149 Carbohidratos, 1152 $\nu(C-N)$ Proteínas, $\nu(C-C)$ carotenoides
1168	1168	1168	1168	1168	1168	1168	1167 CDI, HDA, 1168 lípidos, 1169 Colágeno tipo I, Xilol 1170 Flexión en el plano $C-H$ de la tirosina, 1172 Resina epoxi
1200	1200	1202	1208	1202			1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, Amida III (Proteínas), 1202 Xilol, 1208 Fenilalanina
		1224	1226	1226	1226	1226	1222 Xilol, 1224 Amida III (Hoja plegada Beta)
1234	1234			1239			1235 amida III, 1239 Amida III
1242	1242	1240					1242 Amida III (Hoja plegada beta y bobina aleatoria), 1247 Xilol
1271	1271	1271	1272	1272	1272	1272	1269 DCI, 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento $C-N$ de las proteínas en la hoja plegada beta, $C=C$ grupos en ácidos grasos insaturados
		1309		1311			1309 Modo de torsión molécula CH_3CH_2 de colágeno / lípidos
1343	1343	1343	1341	1341	1341	1341	1340 Ácido nucleico, deferencias en contenido de colágeno, modo vibracional del ácido nucleico indicando el contenido del mismo en el tejido, 1342 Hematoxilina
	1402		1386				1386 CH_3 , 1401 Modos de flexión de grupos metilo (colágeno)
		1431	1428	1428		1413	1417 y 1439 Parafina, 1455 Dexosirribosa
1462	1462	1471	1463	1463	1463	1463	1460 Deformación lípidos y colágeno CH_3/CH_2 , 1462 Disacáridos, sacarosa δCH_2 , 1463 parafina
1495	1495	1495	1500	1500	1495	1495	1492 Formalina, 1498 Eosina, 1499 Estiramiento en anillo de benceno $C=C$
1562	1562	1556	1561	1561		1559	1558 Amida II (Proteínas), 1560-70 COO^-
1615	1615	1615	1617	1617			1611 Xilol, 1614 Tirosina, 1618 Triptófano (Proteínas), 1620 Eosina
					1660	1660	1660 Amida I, $\nu(C=C)$ lípidos, ácidos grasos, 1660 Resina Epoxi
		1681					1682 Estiramiento de las vibraciones de cortisona
		1716					$C=O$
		1772					No tiene asignación

Bandas Raman para las muestras del paciente P7 entre los rangos de 600 1800 cm^{-1} . Se uso la nomenclatura referente a la zona de procedencia como A1, A2, A3, B y la clasificación cáncer (C) y normal (N). Laboratorio de patología UIS.

P7A2N	P7A2C	P7A3N	P7A3C	P7BC	P7BN	Asignación de Bandas[116, 142, 143, 144, 145, 146]
638	638	638	638	638	638	640 estiramiento del enlace C – S y giro C – C de proteína tirosina, 640 cáncer, 644 Xilol
678	678			665		662 Colágeno tipo I, 666 G,T (Modos de respiración en anillo ADN), Tirosina-G en RNA 678 Modos de respiración de anillo en las bases de ADN
705	705		705	705	705	702 Colesterol, éster de colesterol
		713		713		710 Eosina
734	734					733 Fosfatidilserina, Xilol,
772	772	761	766	771	771	776 Fosfatidilinositol, 778 Eosina
851	851		915			851 anillo de respiración de tirosina, 854 Npropanol 915 Vibración Ribosa (RNA)
955			955	955	955	954 carotenoides (ausencia en tejidos normales)
			974	974	974	974 vibración de la Ribosa
1005	1005		1005	1000	1000	998 Resina epoxi, 999 Xilol, 1002 Fenilalanina (Colágeno), 1005 Fenilalanina (Proteínas)
			1013			1013 Eosina
			1053	1051	1051	1051 Xilol, 1052 $\nu(C - N)$ Proteínas, $\nu(C - C)$ Carotenoides 1053 Estiramiento C – O y C – N (Proteínas)
1088	1088		1088	1088	1088	1087-90 Estiramiento C – C, PO_2 , 1089 Etanol
			1128			1128 Estiramiento C – N (Proteínas), C – O (Carbohidratos)
1168	1168	1168	1168	1169	1169	1167 CDI, HDA 1168 lípidos, 1169 Colágeno tipo I, Xilol 1170 Flexión en el plano C – H de la tirosina, 1172 Resina epoxi
1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200 Ácidos nucleicos y fosfatos, 1202 Xilol, Amida III (Proteínas)
1232	1232	1232	1232	1234	1234	1235-1239 Amida III
1272	1272	1269	1269	1272	1272	1269 DCI, 1270 Fosfolípidos, Amida III (Banda de proteínas), estiramiento C – N de las proteínas en la hoja plegada beta, C = C grupos en ácidos grasos insaturados
1309	1309	1309	1309	1309	1309	1309 Modo de torsión molécula $CH_3 CH_2$ de colágeno / lípidos
1346	1346	1346	1346	1349	1349	1342 Hematoxilina, 1347 Aún no asignado
1402				1389	1389	1386 CH_3 , 1401 Modos de flexión de grupos metilo, colágeno
1436		1426	1426	1426	1426	1424 Desoxirribosa, 1436 Tijera CH_2
1468	1468	1468	1468	1468	1468	1465 Lípidos
1500	1500	1498	1498	1498	1498	1492 Formalina, 1498 Eosina, 1499 Estiramiento en anillo de benceno C = C
1561	1561	1560	1560	1560	1560	1560-70 COO^-
1617	1617	1617	1617	1617	1617	1611 Xilol, 1614 Tirosina, 1618 Triptófano (Proteínas), 1620 Eosina
		1724				1728 Grupo éster

ANEXO B. MAMOGRAFÍAS PACIENTES CON CONDICIÓN DE ANORMALIDAD. FED-SA ESTUDIO

Los resultados de las mamografías para las seis pacientes con condición de anormalidad en el tejido mamario, son presentados a continuación:

MAMOGRAFIA BILATERAL - TECNICA DIGITAL

INDICACIÓN DEL ESTUDIO: Tamizaje. Anexa estudios previos para comparar, última mamografía realiza en el año 2015.

La composición de la mama es heterogéneamente densa (tipo C), hallazgo que disminuye la sensibilidad de la mamografía para la detección de pequeñas lesiones.

En el cuadrante supero-externo de la mama derecha se observa una imagen nodular de alta densidad, no identificada en la mamografía previa, realizo ecografía mamaria complementaria utilizando transductor lineal de 13 y 18 Mhz, en esta localización en la mama derecha, hora 11 con línea axilar anterior, se observan imágenes nodulares, anecoicas, de forma redonda y ovalada, de 7 x 5 x 4 mm, 5 x 2 x 3 mm y 3 x 5 x 4 mm. No encuentro calcificaciones agrupadas sospechosas de malignidad.

No hay distorsión de la arquitectura.

En las axilas no hay alteraciones.

CONCLUSIÓN: EN EL CUADRANTE SUPERO-EXTERNO DE LA MAMA DERECHA SE OBSERVA UNA IMAGEN NODULAR, EN LA ECOGRAFÍA CORRESPONDE A MICROQUISTES AGRUPADOS.

SE RECOMIENDA NUEVA MAMOGRAFÍA Y ECOGRAFÍA MAMARIA EN SEIS MESES ANEXANDO EL PRESENTE ESTUDIO PARA PODER COMPARAR.

SE ANEXA CD CON ESTUDIO MAMOGRÁFICO COMPLETO, INCLUYENDO CONO DE COMPRESION FOCAL EN LA MAMA DERECHA.

Descripción médica para PN015

Sexo: FEMENINO
Examen solicitado: ULTRASONOGRAFIA DIAGNOSTICA DE MAMA CONFECHA de Realización: 24/01/2017 02:20:00 p.m.
TRANSDUCTOR DE 7 MHZ O MAS

Informe Fecha de Transcripción: 24-Ene-2017 3:48 pm N° Resultado: 292,695
BIOPSIA DE NODULO EN MAMA IZQUIERDA

SE REALIZA EXPLORACION ECOGRAFICA DE MAMA IZQUIERDA EVIDENCIANDOSE EN EL EJE 3,3 DOS NODULOS SOLIDOS DE CONTORNOS LOBULADOS SIN MICROCALCIFICACIONES NI REFUERZO ACUSTICO POSTERIOR Y OTRO EN EL EJE 6,2 QUE MIDE APROXIMADAMENTE 12 X 7 X 6 MM CON CONTORNOS IRREGULARES, CON SOMBRA ACUSTICA POSTERIOR DE CARACTERISTICAS SOSPECHOSAS BIRADS IV B.
NO SE IDENTIFICA ASIMETRIA FOCAL DESCRITA POR MAMOGRAFIA DE CARACTERISTICAS SOSPECHOSAS EN LA INTERLINEA DE LOS CUADRANTES EXTERNOS, POR LO QUE SE RECOMIENDA A CRITERIO DEL MEDICO TRATANTE BIOPSIA POR ESTEROTAXIA.

PREVIA ASEPSIA Y ANTISEPSIA BAJO ANESTESIA LOCAL MEDIANTE GUIA ECOGRAFICA SE REALIZA BIOPSIA CON AGUJA TRUCUT NO. 14 DE NODULO SOSPECHOSO EN EJE 6,2, SE OBTIENEN CINCO CILINDROS QUE SE ENVIAN EN FORMOL PARA ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

PROCEDIMIENTO SIN COMPLICACIONES

SE DAN LAS RECOMENDACIONES Y SIGNOS DE ALARMA RESPECTIVAS

DR. EDWARD LEONEL GONZALEZ BARBOSA
MEDICO RADIOLOGO
RM 403608

JS

Descripción médica para PN016

Examen ECOGRAFIA MAMARIA

Unión de los cuadrantes externos a 2 cm de la areola que mide 9.5x8.2x7.2 mm.
Cuadrante superoexterno en el eje de la 1:00 a 1 cm de la areola que mide 9.9x5.7x9.4 mm.
Cuadrante superoexterno en el eje de la 1:00 periareolar que mide 21x19.6x8.1 mm.

Estructura ductal de calibre normal bilateral.
Regiones axilares sin adenopatías, tejido accesorio ni masas.
Piel y tejido celular subcutáneo de grosor y ecogenidad normal.

IMPRESION DIAGNOSTICA:

1. Quistes simples bilaterales.
2. Nódulos hipoeogénicos sólidos en ambas mamas como fueron descritos que la mayoría se han mantenido estables con respecto a estudio previo. Solo ha aumentado discretamente de tamaño el nódulo del cuadrante superoexterno de la mama izquierda en el eje de la 1. Birads 3. (Probablemente benigno).

Se sugiere control ecográfico en 6 meses.

Atentamente,

GLADYS PATRICIA CABALLERO DE GREGORI
Especialista: RADIOLOGIA E IMAGENES DIAGNOST

Descripción médica para PN025

HALLAZGOS: Parénquima mamario heterogéneamente denso (Tipo C), hallazgo que disminuye la sensibilidad de la mamografía para la detección de pequeñas lesiones.

En las proyecciones obtenidas no se visualizan áreas que sugieran retracción ni espículas. Tampoco hay grupos sospechosos de microcalcificaciones.

Existe macrocalcificación izquierda, benigna.

Hacia el cuadrante infero interno derecho se observa una lesión nodular isodenso al tejido mamario fibroglandular adyacente.

Con transductor lineal multifrecuencia 10-14 Mhz realizo valoración complementaria con ecografía mamaria, identifico tejido fibroglandular heterogéneo. Hacia la unión de los cuadrantes internos derechos identifico quistes simples de 6.5 mm, probablemente esta lesión sea correlacionada con la mamográfica visualizada. En el cuadrante súpero externo derecho sobre el eje horario de las 10 a 4.5 cm del pezón, identifico dos nódulos sólidos hipocóicos ovalados de márgenes lisos, uno de ellos mide 6.6 x 9 x 3.6 mm y el segundo mide 6 x 7 x 4 mm, probablemente benignos. Al realizar la comparación con los exámenes anteriores, la última ecografía que presenta la Paciente es del 2014 y estos nódulos no se encontraban descritos, por lo cual se consideran de reciente aparición. No hay masas ni dilatación de los conductos galactóforos.

Regiones axilares sin adenopatías.

CONCLUSIÓN: NÓDULOS MAMARIOS EXTERNOS DERECHOS PROBABLEMENTE BENIGNOS.

ESTUDIO REALIZADO	MAMOGRAFIA BILATERAL
-------------------	----------------------

RESULTADOS

AMBOS SENOS SON DE TIPO CONGESTIVO EDEMATOSO MODERADO SIN ALTERACION NODULAR DE LA MATRIZ GLANDULAR.

NO HAY MICROCALCIFICACIONES AGRUPADAS QUE EVOQUEN MALIGNIDAD. TAMPOCO NODULOS ESPICULADOS SIN EMBARGO SE IDENTIFICA UNA IMAGEN NODULAR A NIVEL INFERO INTERNO DE LA MAMA IZQUIERDA CON MICRO Y MACROCALCIFICACIONES AGRUPADAS A ESTE NIVEL LAS CUALES NO HAN PRESENTADO CAMBIOS CON RESPECTO AL ESTUDIO MAMOGRAFICO DE HACE 1 AÑO

HAY ADENOMEGALIAS AXILARES BILATERALES

CONCLUSIÓN
IMAGEN NODULAR CON MICRO Y MACROCALCIFICACIONES INFEROINTERNO DE LA MAMA IZQUIERDA SIN CAMBIOS CON RESPECTO AL ESTUDIO MAMOGRAFICO
BIRADS II

NOTA: LOS FALSOS NEGATIVOS EN MAMOGRAFIA SON APROX. EL 10%.
EL MANEJO DE UNA ANORMALIDAD PALPABLE, SE DEBE BASAR EN CRITERIOS CLINICOS.
UN SENO DENSO PUEDE OCULTAR UN CARCINOMA.

ATENTAMENTE,
DR. JUAN MANUEL LARA
MD RADIÓLOGO
empt

Descripción médica para PN029

ECOGRAFIA MAMARIA

Con transductor sectorial superficial lineal de ancho de banda de 12 MHz, se realiza ecografía mamaria, observando cambios post-quirúrgicos por la presencia de implantes mamarios bilaterales localizados en adecuada posición, sin evidencia de signos de ruptura valorables por ecografía al momento del examen. Se observa escasa cantidad de líquido libre de localización periprotésica bilateral hacia la región de los cuadrantes internos.

La matriz glandular se observa comprimida y rechazada en sentido anterior y es de tipo congestivo edematoso moderado a severo, la cual presenta alteración nodular.

Se observan dos pequeños quistes localizados en la unión de los cuadrantes superiores de la mama derecha que tiene un diámetro promedio de 5 mm.

Se observa una serie de lesiones nodulares sólidas, hipocógenas, homogéneas, ovaladas de orientación paralela y con refuerzo acústico posterior que se localizan en ambas mamas y están distribuidas de la siguiente manera:

En el cuadrante supero externo de la mama derecha sobre el territorio de las 10:00 de reloj aproximadamente a 2 cm de la areola y mide 17.1 mm en transverso x 5.9 mm en anteroposterior x 14.1 mm de longitud para un volumen de 0.8 cc.

En región periareolar de la unión de los cuadrantes internos de la mama izquierda sobre el territorio de las 9:00 de reloj y mide 9.7 mm en transverso x 5.6 mm en anteroposterior x 11.8 mm de longitud para un volumen de 0.4 cc.

En el cuadrante supero externo de la mama izquierda sobre el territorio de las 2:00 de reloj aproximadamente a 2 cm de la areola y mide 10.9 mm en transverso x 5.0 mm en anteroposterior x 11.5 mm de longitud para un volumen de 0.3 cc.

En el cuadrante supero externo de la mama izquierda sobre el territorio de las 2:00 de reloj aproximadamente a 4.5 cm de la areola y mide 8.9 mm en transverso x 4.4 mm en anteroposterior x 12.9 mm de longitud para un volumen de 0.3 cc.

No se identifican dilataciones galactóforicas.

CONCLUSION

CAMBIOS POST-QUIRURGICOS DE MAMOPLASTIA DE AUMENTO.

ESCALA CANTIDAD DE LIQUIDO LIBRE DE LOCALIZACION PERIPROTESICA HACIA LA REGION DE LOS CUADRANTES INTERNOS DE AMBOS IMPLANTES MAMARIOS.

CAMBIOS FIBROQUISTICOS DE LA MAMA.

NODULOS SOLIDOS MAMARIOS BILATERALES DE ASPECTO ECOGRAFICO PROBABLEMENTE BENIGNO DE ETIOLOGIA A ESTABLECER, SUGIRIENDO DESCARTAR FIBROADENOMAS, DEBIENDOSE CORRELACIONAR CON LA CLINICA DEL PACIENTE Y ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

BIRADS ECOGRAFICO III

ANEXO C. ANOVA, NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD DE LOS DATOS

Se presentan los valores alcanzados con ANOVA una vía, las pruebas de normalidad y homocedasticidad de los residuos.

Siendo la hipótesis nula que la población está distribuida normalmente, si el p-valor es menor a alfa (nivel de significancia) entonces la hipótesis nula es rechazada (se concluye que los datos no vienen de una distribución normal). Si el p-valor es mayor a alfa, se concluye que no se puede rechazar dicha hipótesis. Para corroborar la normalidad de los datos se utilizaron seis pruebas: Shapiro–Wilk, Anderson-Darling, Lillefors, Pearson, Shapiro-francia²⁶².

Para verificar la homocedasticidad de los datos, se realiza la prueba de Leven y Bartlett, en la que la hipótesis nula supone la igualdad de las varianzas.

CSED

Se presenta, el valor de p, F y los residuos para el análisis ANOVA de los datos de las pacientes relacionados con la banda de frecuencia de 150-160kHz, V= 512 y detector D1.

```

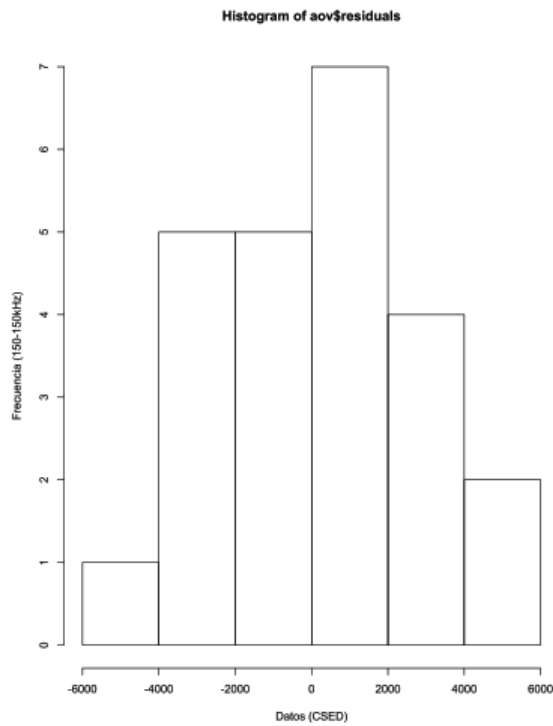
      Df      Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
x          1  47822399 47822399   6.243  0.0204 *
Residuals  22 168530524  7660478
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Los test de normalidad de los residuos muestran que $p > 0.05$, ver tabla 6.4, así que los residuos son normales. En las figuras 6.3.1 y 6.3.2 , se presenta para estos, el histograma, la densidad de distribución y los cuantiles.

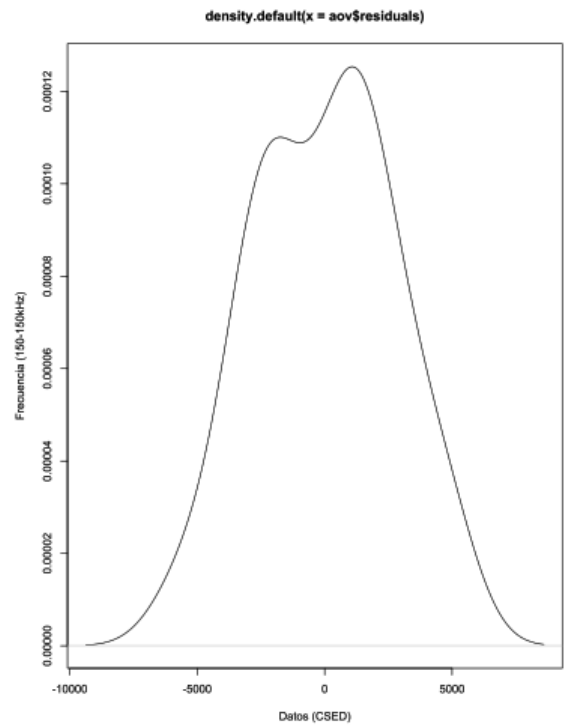
Test de normalidad de los datos y de los residuos, CSED

Test	p (datos)	p (residuos)
Shapiro-Wilk	0.52	0.804
Anderson-Darling	0.42	0.73
Lillefors	0.46	0.35
Pearson	0.45	0.64
Shapiro-francia	0.34	0.76

Histograma y distribución de probabilidad de los datos: CSED, Banda (150-160kHz), V=512, detector D1

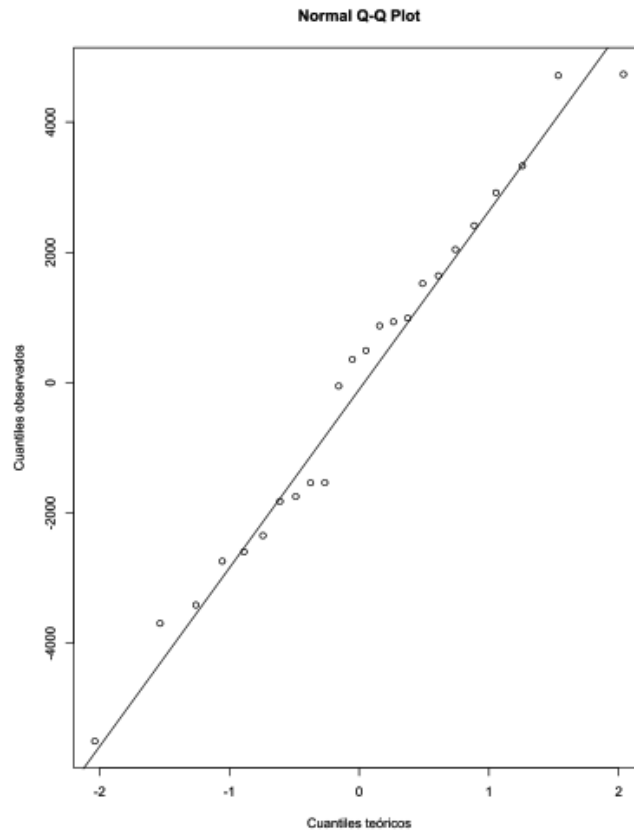


(a)



(b)

Gráfica de los residuos en cuantiles para los datos CSED, Banda (150- 160kHz), V=512, detector D1



Los resultados de los test de homocedasticidad obtienen un $p > 0.05$, aceptando la igualdad de las varianzas, este se presenta en la figura 6.3.3.

Test de levene y bartlett muestran la homocedasticidad de las varianzas: CSED, Banda (150-160kHz), V=512, detector D1

```
> bartlett.test(y,x)
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
> leveneTest(y,x)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

group	Df	F value	Pr(>F)
1	0.4233	0.522	
22			

data: y and x
Bartlett's K-squared = 0.0094004, df = 1, p-value = 0.9228

(a)

(b)

CSID

Se presenta, el valor de p, F y los residuos para el análisis ANOVA de los datos de las pacientes relacionados con la banda de frecuencia de 150-160kHz, V= 4096 y detector D1.

```

              Df      Sum Sq  Mean Sq  F value  Pr(>F)
x              1  33559404  33559404    4.763    0.04 *
Residuals    22 155021856   7046448
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

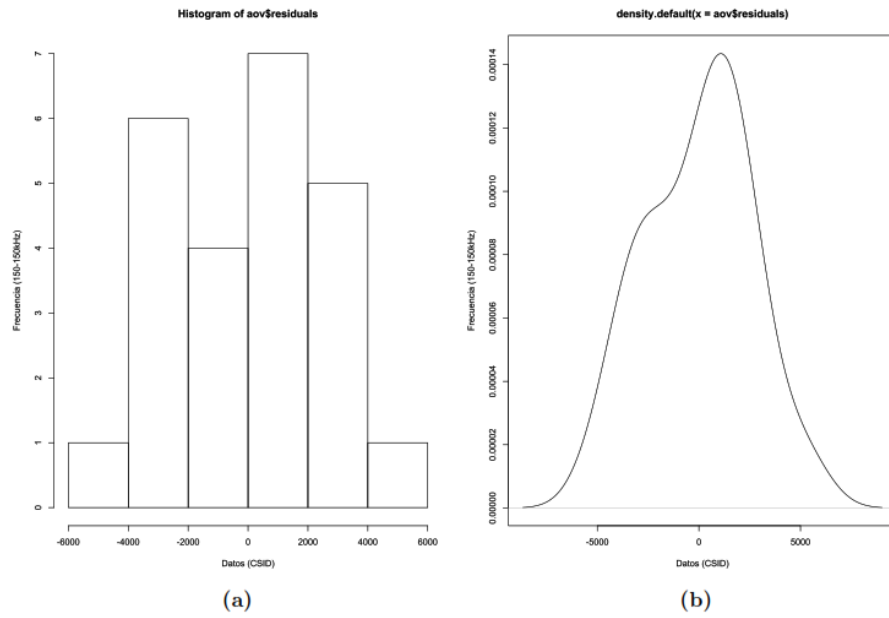
```

Los test de normalidad de los residuos muestran que $p > 0.05$, ver tabla 6.5, así que los residuos son normales. En las figuras 6.3.4 y 6.3.5 , se presenta para estos, el histograma, la densidad de distribución y los cuantiles.

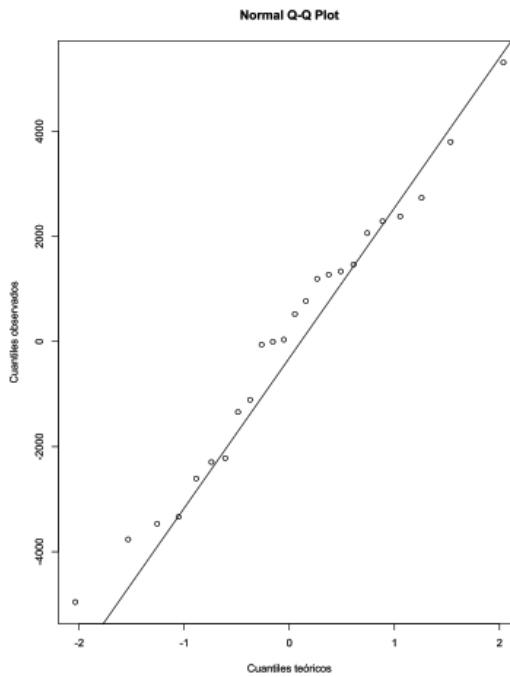
Test de normalidad de los datos y de los residuos, CSID.

Test	p (datos)	p (residuos)
Shapiro-Wilk	0.98	0.86
Anderson-Darling	0.98	0.69
Lillefors	0.88	0.55
Pearson	0.75	0.84
Shapiro-francia	0.99	0.87

Gráfica de los residuos en cuantiles para los datos CSID, Banda (150- 160kHz), V=4096, detector D1



Gráfica de los residuos en cuantiles para los datos CSID, Banda (150- 160kHz), V=4096, detector D1



Los resultados de los test de homocedasticidad obtienen un $p > 0.05$, aceptando la igualdad de las varianzas, estos se presenta en la figura 6.3.6.

Test de levene y bartlett muestran la homocedasticidad de las varianzas: CSID, Banda (150-160kHz), $V=4096$, detector D1

```

> leveneTest(y,x)
Levene's Test for Homogeneity of Variance
(center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 1  1.3071 0.2652
      22

```

(a)

```

> bartlett.test(y,x)
Bartlett test of homogeneity of
variances
data: y and x
Bartlett's K-squared = 0.78054,
df = 1, p-value = 0.377

```

(b)

CSEI

Se presenta, el valor de p, F y los residuos para el análisis ANOVA de los datos de las pacientes relacionados con la banda de frecuencia de 10-50kHz, $V= 2048$ y detector D1.

```

              Df      Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
x              1 1.009e+09 1.009e+09    6.29  0.02 *
Residuals     22 3.529e+09 1.604e+08
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Los test de normalidad de los residuos muestran que $p > 0.05$, ver tabla 6.6, así que los residuos son normales. En las figuras 6.3.7 y 6.3.8 , se presenta para estos, el histograma, la densidad de distribución y los cuantiles

Test de normalidad de los datos y de los residuos, CSEI.

Test	p (datos)	p (residuos)
Shapiro-Wilk	0.067	0.56
Anderson-Darling	0.17	0.62
Lillefors	0.58	0.90
Pearson	0.64	0.37
Shapiro-francia	0.063	0.26

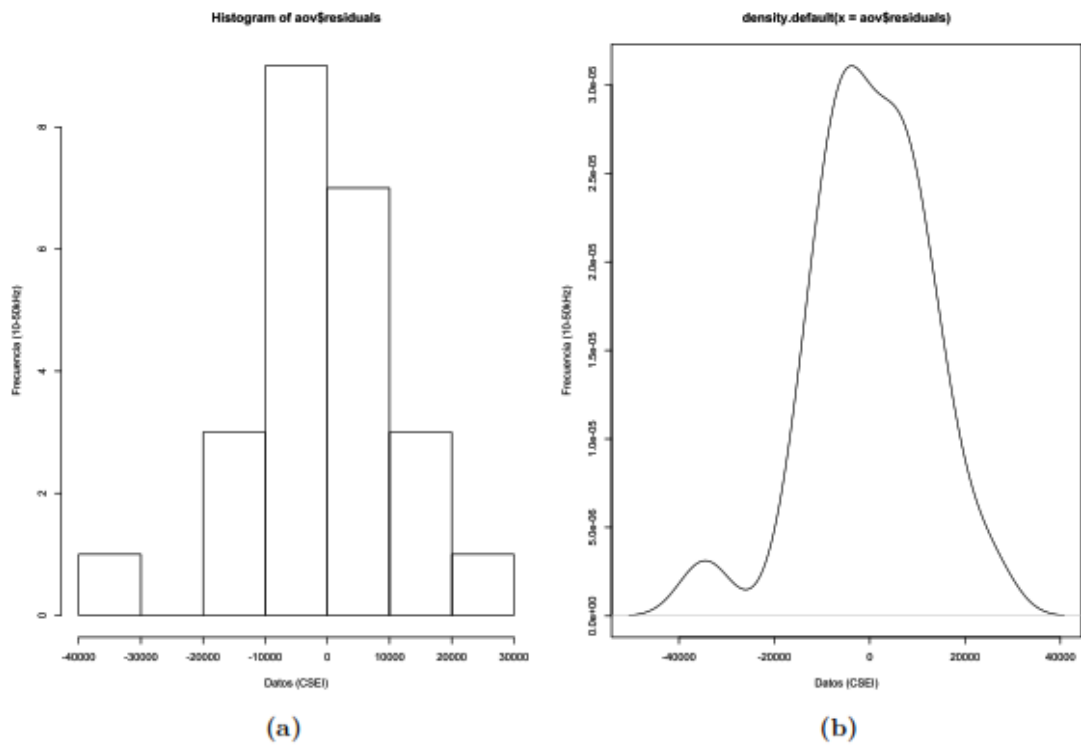


Figura 6.3.7: Histograma y distribución de probabilidad de los datos: CSEI, Banda (10-50kHz), V=2048, detector D1

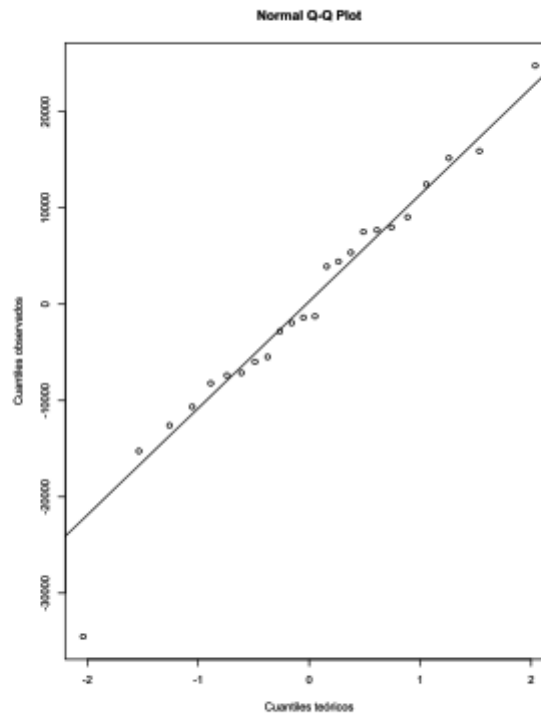


Figura 6.3.8: Gráfica de los residuos en cuantiles para los datos CSEI, Banda (10-50kHz), V=2048, detector D1

Los resultados de los test de homocedasticidad obtienen un $p > 0.05$, aceptando la igualdad de las varianzas, estos se presenta en la figura 6.3.9.

				<code>> bartlett.test(y,x)</code>	
<code>> leveneTest(y,x)</code>				Bartlett test of homogeneity of	
Levene's Test for Homogeneity of Variance				variances	
(center = median)					
	Df	F value	Pr(>F)	data: y and x	
group 1	1	0.8712	0.3607	Bartlett's K-squared = 2.4058, df =	
	22			1, p-value = 0.1209	
(a)				(b)	

Figura 6.3.9: Test de levene y bartlett muestran la homocedasticidad de las varianzas: CSEI, Banda (10-50kHz), V=2048, detector D1

ANEXO D. MODELOS Y CURVA ROC

Modelo 1

Estimación logit

```
Call:
glm(formula = Clasificacion2 ~ ., family = binomial(link = "logit"),
    data = conjuntos[[1]], control = list(maxit = 1000))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.0700  -0.4396   0.5682   0.7738   1.6477

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -5.181e+00  1.615e+00  -3.208  0.001335 **
X0.1kHz.log.   1.358e-03  5.166e-04   2.628  0.008594 **
X1.10kHz.log.  -2.471e-04  1.891e-04  -1.306  0.191397
X10.50kHz.log.   6.244e-05  3.877e-05   1.611  0.107258
X100.150kHz.log -2.580e-05  2.158e-05  -1.195  0.231952
X150.160kHz.log  2.499e-04  7.216e-05   3.462  0.000535 ***
X50.100kHz.log. -2.502e-05  1.727e-05  -1.449  0.147345

---
Signif. codes:
  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 488.03  on 403  degrees of freedom
Residual deviance: 408.12  on 397  degrees of freedom
AIC: 422.12

Number of Fisher Scoring iterations: 5
```

Matriz de confusión, sensibilidad y especificidad

Confusion Matrix and Statistics

	Reference	
Prediction	0	1
0	9	8
1	41	114

Accuracy : 0.7151
95% CI : (0.6414, 0.7812)
No Information Rate : 0.7093
P-Value [Acc > NIR] : 0.4712

Kappa : 0.1421
McNemar's Test P-Value : 4.844e-06

Sensitivity : 0.18000
Specificity : 0.93443
Pos Pred Value : 0.52941
Neg Pred Value : 0.73548
Prevalence : 0.29070
Detection Rate : 0.05233
Detection Prevalence : 0.09884
Balanced Accuracy : 0.55721

'Positive' Class : 0

Modelo 2

Estimación logit

```
Call:
glm(formula = Clasificacion2 ~ ., family = binomial(link = "logit"),
    data = conjuntos[[2]], control = list(maxit = 1000))
```

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.04098  -0.00004   0.00004   0.00009   2.43861
```

```
Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  1.643e+01  4.235e+03   0.004  0.99690
X0.1kHz.log.  2.633e-03  1.187e-03   2.219  0.02647 *
X1.10kHz.log. -5.791e-04  5.095e-04  -1.137  0.25573
X10.50kHz.log.  7.639e-05  9.620e-05   0.794  0.42712
X100.150kHz.log. -1.711e-04  5.296e-05  -3.230  0.00124 **
X150.160kHz.log.  8.271e-04  1.939e-04   4.265  2e-05 ***
X50.100kHz.log.  2.535e-05  3.451e-05   0.735  0.46260
Edad23        -2.205e+01  4.235e+03  -0.005  0.99585
Edad24        -1.394e+00  5.808e+03   0.000  0.99981
Edad25         5.729e-01  6.195e+03   0.000  0.99993
Edad29        -3.445e+00  5.080e+03  -0.001  0.99946
Edad34        -2.252e+01  4.235e+03  -0.005  0.99576
Edad35        -2.039e+00  5.629e+03   0.000  0.99971
Edad42        -1.701e+01  4.235e+03  -0.004  0.99680
Edad47        -2.178e+01  4.235e+03  -0.005  0.99590
Edad49        -1.644e+00  6.019e+03   0.000  0.99978
Edad50        -1.509e+00  5.073e+03   0.000  0.99976
Edad51        -2.398e+00  5.825e+03   0.000  0.99967
Edad52        -4.176e+01  6.003e+03  -0.007  0.99445
Edad55        -4.243e+01  5.661e+03  -0.007  0.99402
Edad57        -4.368e+01  5.943e+03  -0.007  0.99414
Edad60        -1.428e+00  5.758e+03   0.000  0.99980
```

```
---
Signif. codes:
  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 488.03 on 403 degrees of freedom
Residual deviance: 145.27 on 382 degrees of freedom
AIC: 189.27
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 19
```

Matriz de confusión, sensibilidad y especificidad

Confusion Matrix and Statistics

	Reference	
Prediction	0	1
0	42	6
1	8	116

Accuracy : 0.9186
95% CI : (0.8672, 0.9548)
No Information Rate : 0.7093
P-Value [Acc > NIR] : 1.39e-11

Kappa : 0.8003
McNemar's Test P-Value : 0.7893

Sensitivity : 0.8400
Specificity : 0.9508
Pos Pred Value : 0.8750
Neg Pred Value : 0.9355
Prevalence : 0.2907
Detection Rate : 0.2442
Detection Prevalence : 0.2791
Balanced Accuracy : 0.8954

'Positive' Class : 0

Modelo 3.

Estimación logit

```
Call:
glm(formula = Clasificacion2 ~ ., family = binomial(link = "logit"),
    data = conjuntos[[3]], control = list(maxit = 1000))
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.02620	-0.00004	0.00004	0.00009	2.43861

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	1.633e+01	4.245e+03	0.004	0.99693	
X0.1kHz.log.	2.684e-03	1.212e-03	2.215	0.02677	*
X1.10kHz.log.	-5.935e-04	5.142e-04	-1.154	0.24843	
X10.50kHz.log.	7.879e-05	9.689e-05	0.813	0.41607	
X100.150kHz.log.	-1.717e-04	5.311e-05	-3.233	0.00122	**
X150.160kHz.log.	8.283e-04	1.941e-04	4.268	1.97e-05	***
X50.100kHz.log.	2.618e-05	3.472e-05	0.754	0.45087	
Edad23	-2.204e+01	4.245e+03	-0.005	0.99586	
Edad24	-1.401e+00	5.820e+03	0.000	0.99981	
Edad25	6.017e-01	6.192e+03	0.000	0.99992	
Edad29	-3.463e+00	5.090e+03	-0.001	0.99946	
Edad34	-2.253e+01	4.245e+03	-0.005	0.99577	
Edad35	-2.062e+00	5.640e+03	0.000	0.99971	
Edad42	-1.699e+01	4.245e+03	-0.004	0.99681	
Edad47	-2.177e+01	4.245e+03	-0.005	0.99591	
Edad49	-1.660e+00	6.027e+03	0.000	0.99978	
Edad50	-1.520e+00	5.082e+03	0.000	0.99976	
Edad51	-2.416e+00	5.833e+03	0.000	0.99967	
Edad52	-4.174e+01	6.011e+03	-0.007	0.99446	
Edad55	-4.241e+01	5.670e+03	-0.007	0.99403	
Edad57	-4.371e+01	5.950e+03	-0.007	0.99414	
Edad60	-1.423e+00	5.762e+03	0.000	0.99980	
channel	-5.499e-02	2.518e-01	-0.218	0.82712	

Signif. codes:

0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 488.03 on 403 degrees of freedom
Residual deviance: 145.22 on 381 degrees of freedom
AIC: 191.22

Number of Fisher Scoring iterations: 19

Matriz de confusión, sensibilidad y especificidad

Confusion Matrix and Statistics

	Reference	
Prediction	0	1
0	42	7
1	8	115

Accuracy : 0.9128
95% CI : (0.8602, 0.9504)
No Information Rate : 0.7093
P-Value [Acc > NIR] : 6.129e-11

Kappa : 0.7873
McNemar's Test P-Value : 1

Sensitivity : 0.8400
Specificity : 0.9426
Pos Pred Value : 0.8571
Neg Pred Value : 0.9350
Prevalence : 0.2907
Detection Rate : 0.2442
Detection Prevalence : 0.2849
Balanced Accuracy : 0.8913

'Positive' Class : 0

Modelo 4.

Estimación logit

```
Call:
glm(formula = Clasificacion2 ~., family = binomial(link = "logit"),
     data = conjuntos[[4]], control = list(maxit = 1000))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.13698 -0.00003  0.00003  0.00011  2.48782

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  1.640e+01  4.217e+03  0.004  0.99690
X0.1kHz.log.  3.482e-03  1.357e-03  2.565  0.01031 *
X1.10kHz.log. -8.305e-04  5.499e-04 -1.510  0.13095
X10.50kHz.log. 1.169e-04  1.032e-04  1.133  0.25712
X100.150kHz.log. -1.816e-04  5.659e-05 -3.210  0.00133 **
X150.160kHz.log. 8.720e-04  2.042e-04  4.270 1.96e-05 ***
X50.100kHz.log. 2.337e-05  3.714e-05  0.629  0.52927
Edad23       -2.218e+01  4.217e+03 -0.005  0.99580
Edad24       -1.601e+00  5.742e+03  0.000  0.99978
Edad25        3.470e-01  6.139e+03  0.000  0.99995
Edad29       -3.614e+00  5.021e+03 -0.001  0.99943
Edad34       -2.288e+01  4.217e+03 -0.005  0.99567
Edad35       -2.395e+00  5.622e+03  0.000  0.99966
Edad42       -1.685e+01  4.217e+03 -0.004  0.99681
Edad47       -2.204e+01  4.217e+03 -0.005  0.99583
Edad49       -1.902e+00  5.980e+03  0.000  0.99975
Edad50       -1.755e+00  5.049e+03  0.000  0.99972
Edad51       -2.736e+00  5.804e+03  0.000  0.99962
Edad52       -4.198e+01  5.932e+03 -0.007  0.99435
Edad55       -4.262e+01  5.624e+03 -0.008  0.99395
Edad57       -4.426e+01  5.882e+03 -0.008  0.99400
Edad60       -1.526e+00  5.705e+03  0.000  0.99979
channel      -8.155e-02  2.569e-01 -0.317  0.75092
zoneCIEI(1M) -4.191e-01  8.459e-01 -0.495  0.62033
zoneCIID(1M) -5.911e-01  8.802e-01 -0.672  0.50186
zoneCIII(1M) -2.943e-01  8.192e-01 -0.359  0.71939
zoneCSED(1M)  2.477e-01  9.091e-01  0.273  0.78522
zoneCSEI(1M) -1.641e+00  9.103e-01 -1.803  0.07141 .
zoneCSID(1M) -4.069e-01  8.629e-01 -0.472  0.63719
zoneCSII(1M) -2.300e-01  8.320e-01 -0.276  0.78222
---
Signif. codes:
  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 488.03  on 403  degrees of freedom
Residual deviance: 140.36  on 374  degrees of freedom
AIC: 200.36

Number of Fisher Scoring iterations: 19
```

Matriz de confusión, sensibilidad y especificidad

Confusion Matrix and Statistics

	Reference	
Prediction	0	1
0	39	9
1	11	113

Accuracy : 0.8837
95% CI : (0.8261, 0.9275)
No Information Rate : 0.7093
P-Value [Acc > NIR] : 3.824e-08

Kappa : 0.7147
McNemar's Test P-Value : 0.8231

Sensitivity : 0.7800
Specificity : 0.9262
Pos Pred Value : 0.8125
Neg Pred Value : 0.9113
Prevalence : 0.2907
Detection Rate : 0.2267
Detection Prevalence : 0.2791
Balanced Accuracy : 0.8531

'Positive' Class : 0

Modelo 5.

Estimación logit

```
Call:
glm(formula = Clasificacion2 ~ ., family = binomial(link = "logit"),
     data = conjuntos[[5]], control = list(maxit = 1000))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.15173  -0.00003   0.00003   0.00012   2.48616

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  1.660e+01  4.204e+03  0.004  0.99685
X0.1kHz.log.  3.392e-03  1.323e-03  2.565  0.01032 *
X1.10kHz.log. -8.064e-04  5.435e-04 -1.484  0.13793
X10.50kHz.log.  1.129e-04  1.023e-04  1.104  0.26956
X100.150kHz.log. -1.803e-04  5.623e-05 -3.208  0.00134 **
X150.160kHz.log.  8.695e-04  2.038e-04  4.265  2e-05 ***
X50.100kHz.log.  2.195e-05  3.680e-05  0.598  0.55094
Edad23        -2.219e+01  4.204e+03 -0.005  0.99579
Edad24        -1.582e+00  5.727e+03  0.000  0.99978
Edad25         2.971e-01  6.145e+03  0.000  0.99996
Edad29        -3.581e+00  5.009e+03 -0.001  0.99943
Edad34        -2.287e+01  4.204e+03 -0.005  0.99566
Edad35        -2.352e+00  5.608e+03  0.000  0.99967
Edad42        -1.688e+01  4.204e+03 -0.004  0.99680
Edad47        -2.204e+01  4.204e+03 -0.005  0.99582
Edad49        -1.877e+00  5.971e+03  0.000  0.99975
Edad50        -1.736e+00  5.037e+03  0.000  0.99972
Edad51        -2.706e+00  5.795e+03  0.000  0.99963
Edad52        -4.200e+01  5.924e+03 -0.007  0.99434
Edad55        -4.264e+01  5.611e+03 -0.008  0.99394
Edad57        -4.421e+01  5.876e+03 -0.008  0.99400
Edad60        -1.557e+00  5.706e+03  0.000  0.99978
zoneCII(1M)   -4.128e-01  8.466e-01 -0.488  0.62582
zoneCIID(1M)  -5.924e-01  8.808e-01 -0.673  0.50124
zoneCIII(1M)  -3.043e-01  8.190e-01 -0.372  0.71020
zoneCSED(1M)   2.505e-01  9.103e-01  0.275  0.78320
zoneCSEI(1M)  -1.632e+00  9.100e-01 -1.793  0.07298
zoneCSID(1M)  -4.093e-01  8.633e-01 -0.474  0.63540
zoneCSII(1M)  -2.526e-01  8.294e-01 -0.305  0.76072
---
Signif. codes:
  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 488.03  on 403  degrees of freedom
Residual deviance: 140.46  on 375  degrees of freedom
AIC: 198.46

Number of Fisher Scoring iterations: 19
```

Matriz de confusión, sensibilidad y especificidad

Confusion Matrix and Statistics

	Reference	
Prediction	0	1
0	40	11
1	10	111

Accuracy : 0.8779
95% CI : (0.8194, 0.9228)
No Information Rate : 0.7093
P-Value [Acc > NIR] : 1.164e-07

Kappa : 0.7057
McNemar's Test P-Value : 1

Sensitivity : 0.8000
Specificity : 0.9098
Pos Pred Value : 0.7843
Neg Pred Value : 0.9174
Prevalence : 0.2907
Detection Rate : 0.2326
Detection Prevalence : 0.2965
Balanced Accuracy : 0.8549

'Positive' Class : 0