

Detección Automatizada de Cáncer de Mama Basada en Espectroscopía Raman y el Clasificador de Mahalanobis

Automatic Detection of Breast Cancer Based on Raman Spectroscopy and the Mahalanobis Classifier

Dr. Francisco Javier Luna Rosas¹, Dr. Julio Cesar Martínez Romo¹, Dr. Carlos Alejandro de Luna Ortega²,
MC. Gricelda Medina Veloz³, MC. Valentín López Rivas¹,

¹Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Departamento de Sistemas y Computación
Avenida Adolfo López Mateos 1801 Oriente, C.P. 20256, Fraccionamiento Bona Gens, Aguascalientes, Ags.,
México. Tel (01-449) 9105002, Ext. 152, E-mail: fcoluna2000@yahoo.cpm.mx

²Universidad Politécnica de Aguascalientes, Departamento de Ingeniería Mecatrónica
Calle Paseo San Gerardo No. 207, C.P. 20342, Fraccionamiento San Gerardo, Aguascalientes, Ags., México.
Tel. (01-449)442-1400

³Universidad Tecnológica del Norte de Aguascalientes, Departamento de Tecnologías de Información
Av. Universidad 1001, C.P. 20400, Estación Rincón, Rincón de Romos, Aguascalientes, México.
Tel. (01-465)965-0030

Resumen

En este artículo presentamos un método para la detección automatizada de cáncer de mama, en el cual una señal Raman es clasificada viniendo de una biopsia de tejido sano (clase ω_1) o una biopsia de tejido dañado (clase ω_2); para este fin, creamos patrones de las clases ω_1 y ω_2 que representan picos Raman (marcadores de tejido sano y enfermo). Para llevar a cabo la detección aplicamos un clasificador de distancia mínima con métrica de Mahalanobis y a partir de este método se obtuvieron altas tasas de detección, corroborado al comparar los resultados del clasificador contra las clasificaciones previas del tejido realizadas por un patólogo experto. Esto provee a los especialistas con herramientas clínicas importantes para una rápida y eficiente detección automatizada de cáncer de mama. Consideramos que nuestro enfoque puede ser aplicado a otros órganos del cuerpo donde la detección y clasificación oportuna de cáncer puede ser difícil y de relevancia pronóstica, tales como estómago, páncreas entre otros.

Palabras clave: clasificador de Mahalanobis, cáncer de mama, espectroscopía Raman, sensibilidad, especificidad.

Abstract

In this paper we present a method for automatic Breast cancer detection, in which a Raman signal is classified as coming from a biopsy of healthy tissue (class ω_1) or biopsy of diseased tissue (class ω_2); to do so, we created patterns from the classes ω_1 y ω_2 that represent Raman peaks (markers of healthy and diseased tissue). To perform the classification we applied a minimum

distance classifier with Mahalanobis metric and from this method, we obtained high detection rates. The results were confirmed when we compare the classifier against the results from the classifications made by an expert pathologist. This provides the specialists with important clinical tools for a rapid and efficient automatic detection of breast cancer. We believe that our approach can be applied to other organs of the body where the detection and classification of cancer can be difficult and predicted relevance, such as stomach, pancreas and others.

Keywords: Mahalanobis, breast cancer, Raman spectroscopy, sensitivity, specificity.

Introducción

El cáncer es la 10^o causa de muerte en el mundo, se estima que el cáncer matará 83.2 millones de personas en el mundo antes del año 2015 [1]. Varios estudios de espectroscopía Raman sobre cáncer han sido reportados [2].

Aquí revisamos uno de los tres carcinomas más comunes: el cáncer de mama; los otros dos carcinomas (cáncer colo-rectal y cáncer cervicouterino), están fuera del alcance de este artículo.

Espectroscopía Raman y Cáncer de Mama. El cáncer de mama ha tenido una alta razón de ocurrencia en Estados Unidos entre la población femenina en el 2010 [2]. Numerosos estudios han investigado la aplicación de espectroscopía Raman sobre la detección de tejidos mamarios normales, precancerosos y cancerosos. Por ejemplo, Haka en [3] y sus colegas han demostrado la capacidad de la espectroscopía Raman para distinguir entre tejido mamario normal, benigno

y maligno (en vivo), con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 96%. Tejidos mamarios normales, tejidos con cambios fibrosos, tejidos con fibroadenoma y tejidos con carcinoma infiltrante fueron examinados y clasificados. Espectros Raman de tejidos mamarios fueron confeccionados en un modelo para obtener componentes de tejidos mamarios individuales incluyendo grasa, colágeno, núcleo celular, citoplasma de células epiteliales, oxalato de calcio, hidroxapatita de calcio, depósitos de lípidos como colesterol y β -caroteno. Este enfoque está basado en la suposición de que la mezcla de un espectro Raman es una combinación lineal de los componentes anteriores. Variaciones en los coeficientes de fitting reflejaron los cambios morfológicos y químicos de tejidos mamarios debido a su carcinogénesis. Los coeficientes fitting de grasa y colágeno han sido identificados como parámetros claves usados para diferenciar el diagnóstico. Rehman y colaboradores, examinaron cuantitativamente las diferencias de espectros Raman en diferentes grados de carcinoma ductal invasivo y carcinoma ductal in situ. Para ambas patologías, la intensidad espectral de los picos Raman seleccionados se incrementó con el grado de avance, indicando el potencial de la espectroscopia Raman para cuantitativamente clasificar el carcinoma [4]. En vez de examinar tejidos de mama directamente, el grupo de Pichardo Molina [5] estudió ejemplos de suero de pacientes de cáncer de mama y demostró el uso de espectroscopia Raman para visualizar el diagnóstico invasivo. Siete bandas Raman fueron usadas para detección y las diferencias espectrales fueron observadas entre las muestras de suero de pacientes de cáncer de mama y de personas sanas. Usando análisis de componentes principales (PCA) y análisis de discriminación lineal (LDA), la sensibilidad y la especificidad fueron reportadas para ser 97% y 78%, respectivamente. Sin embargo los mecanismos moleculares de esas diferencias no fueron reportados. Las imágenes de espectroscopia Raman son capaces de visualizar las muestras sin etiquetado (por el uso de métodos exógenos que son capaces de entender varios componentes de tejido a través de la dispersión Raman, en contraste con los métodos endógenos que requieren colorantes inyectados o tomados para resaltar más claramente los límites entre los órganos y los tumores. Una mayor explicación sobre el tema puede ser encontrada en [6], [7]), además de la mucha información estructural y química que es proporcionada por el análisis de los espectros Raman. Por citar algún ejemplo Mariani y colaboradores han aplicado las imágenes Raman para la detección de fluctuaciones de lípidos en la membrana nuclear en células epiteliales senescentes de cáncer de mama [6]. En este estudio, las imágenes Raman fueron compuestas basadas sobre

la intensidad de picos Raman. Otro ejemplo es el que propuso Abramczyk en [7] y Surmacki [8], en su estudio presentan el análisis estadístico más confiable sobre espectroscopia Raman basados sobre datos de tejidos de mama normales, benignos y cancerosos de 146 pacientes. En estos artículos se presentan las primeras imágenes Raman de biopsia óptica (RI) de tejidos de mama normales y cancerosos del mismo paciente. Los resultados presentados, demuestran la habilidad de espectroscopia Raman para exactamente caracterizar tejidos de cáncer y distinguir entre tipos de tejidos normales (no cancerosos) y dañados (cancerosos). Los resultados proveen evidencia de que la composición de lípidos y carotenos de tejidos de mama cancerosos difieren significativamente de los tejidos de mama no cancerosos y deben ser un factor clave para los mecanismos que detectan cáncer. Marro y sus colaboradores [9], afirman que el contenido de lípidos de células dañadas debería ser usado como medida indirecta del progreso del cáncer. Para apoyar los resultados un análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales fue ejecutado evaluando la habilidad de la espectroscopia Raman para discriminar la transición de células epiteliales a mesénquima en células de tejido mamario. Los autores logran un alto nivel de sensibilidad (94%) y especificidad (100%).

Métodos de Análisis. Los espectros Raman obtenidos de muestras biológicas con frecuencia contienen cantidades significativas de fluorescencia, en muchas ocasiones las diferencias de espectros Raman de tejidos normales y tejidos enfermos son generalmente muy finas y a menudo se requieren algoritmos de procesamiento de datos eficientes para el análisis de datos y su interpretación. Los espectros Raman de tejidos están compuestos principalmente de dispersión Raman y de fluorescencia. Para eliminar la fluorescencia, usualmente se resta del espectro Raman una función polinomial que confeccione el perfil de fluorescencia [10]. A pesar de que no hay un consenso de orden óptimo de la función polinomial, polinomios del orden 4 y 5 son comúnmente empleados [10]. Los espectros Raman contienen varias bandas Raman traslapadas. Como resultado, es difícil visualizar, inspeccionar e interpretar datos espectrales. El análisis de métodos de espectros multivariados es a menudo usado para procesar los espectros Raman y facilitar la interpretación de datos. Estos métodos de análisis espectrales, son generalmente categorizados como supervisados y no supervisados. Para el análisis no supervisado, métodos como el análisis de Clusters y el Análisis de Componentes Principales (PCA) [5] son utilizados con frecuencia, estos métodos no requieren conocimiento a priori de las características de la clase pero el conocimiento es determinado por el mismo

análisis. En contraste con el análisis supervisado, en donde un número de clases y ejemplos representativos por cada clase es conocida a priori, como el caso de LDA [5], análisis por regresión y redes neuronales artificiales (ANNs) [2].

En este artículo presentamos un método para la detección automatizada de cáncer de mama, en el cual una señal Raman es clasificada viniendo de una biopsia de tejido sano (clase ω_1) o una biopsia de tejido dañado (clase ω_2), con el objetivo de mejorar la especificidad y sensibilidad; para hacer eso, creamos patrones de las clases ω_1 y ω_2 que representan picos Raman (marcadores de tejido sano y enfermo). Para llevar a cabo la detección aplicamos un clasificador de distancia mínima con métrica de Mahalanobis y altas razones de detección correctas fueron obtenidas. Para resaltar la originalidad de nuestra propuesta, comparamos con otros artículos (ver Tabla 1) relacionando: tipo de clasificador, sensibilidad y especificidad. Como puede observarse en la Tabla 1 ningún trabajo en la literatura describe la sensibilidad y especificidad, usando solamente bandas o picos para su detección, nosotros usamos el clasificador de Mahalanobis con una sensibilidad de 97.77% y especificidad de 100%.

Tabla 1. Trabajo relacionado, similar a nuestro trabajo en uno de los siguientes aspectos: clasificador, sensibilidad y especificidad.

Referencia (Año)	Clasificador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
[11] 2002	No	No	No
[3] 2005	Linear	94	96
[12] 2009	No	No	No
[13] 2013	SVM	62.5	100
[14] 2013	PCA	80	90.9
[9] 2014	MCR	94	100

Materiales y Métodos

Materiales y protocolo

Espectros Raman de Tejido Crudo (Dispersión Raman más Fluorescencia) fueron proporcionados por el Centro Universitario de los Lagos, de la Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Los espectros se tomaron de muestras de tejido mamario sano y con cáncer; las muestras fueron obtenidas de biopsias de varios pacientes diagnosticados con carcinoma ductal infiltrante y preservados en formalina; para obtener el espectro Raman, cortes histológicos fueron hechos sobre las muestras. El espectro Raman fue obtenido usando un sistema Raman Renishaw modelo 1000-B;

este sistema usa un diodo laser de $\lambda = 830$ nm y una rejilla de 600 líneas mm⁻¹. El láser fue centrado sobre las muestras con un microscopio Leica modelo DMLM (objective of 50x), en aproximadamente 35mW de potencia. Cada espectro fue coleccionado en la región de 680 a 1780 cm⁻¹, con una exposición de tiempo de 10s. Finalmente, la resolución de número de onda fue de 2 cm⁻¹ y el sistema Raman fue calibrado con un semiconductor de silicón en el pico Raman de 520 cm⁻¹. Con este entorno experimental 100 espectros Raman fueron registrados en zonas de tejido sano y dañado. Para remover la fluorescencia, en este trabajo, adoptamos el algoritmo de Vancouver (VRA) (Zhao 2007), porque éste evita posibles oscilaciones en puntos extremos del espectro que otros algoritmos insertan en el espectro Raman.

Resultados y Discusión

Resaltando Diferencias de Espectros Raman de Tejido Sano Vs Espectros Raman de Tejido Dañado

En esta sección presentamos los resultados de estudios Raman sobre tejidos de mama normal (no canceroso) y dañado (canceroso). Publicaciones anteriores han demostrado que los espectros Raman de tejido de mama normal son dominados por los lípidos y carotenos. Los espectros de tejido sano, muestran picos en las bandas 1004, 1080, 1158, 1259, 1266, 1304, 1444, 1518, 1660, 1750 y en tejido dañado (tumores cancerígenos, carcinoma ductal infiltrante) se pierde la intensidad de los picos. Una descripción más profunda sobre los métodos y su análisis se pueden encontrar en [5], [7], [8]. La Figura 1 a) y b) compara un espectro Raman de tejido de mama sano y dañado de un mismo paciente.

Las diferencias más pronunciadas pueden ser observadas en las regiones de las bandas 1158 y 1518 cm⁻¹ asignados a los carotenos y las regiones de las bandas 1444, 1660, 1750 cm⁻¹ que han sido asignados a los lípidos. Una inspección detallada en la Figura 1 demuestra que las bandas Raman de los carotenos son muy fuertes en tejidos sanos mientras que en tejidos dañados no son observadas. Las intensidades Raman de los picos de los lípidos son significativamente más pequeñas en tejido dañado que en tejido sano (bandas 1444, 1750, 1259, 1080).

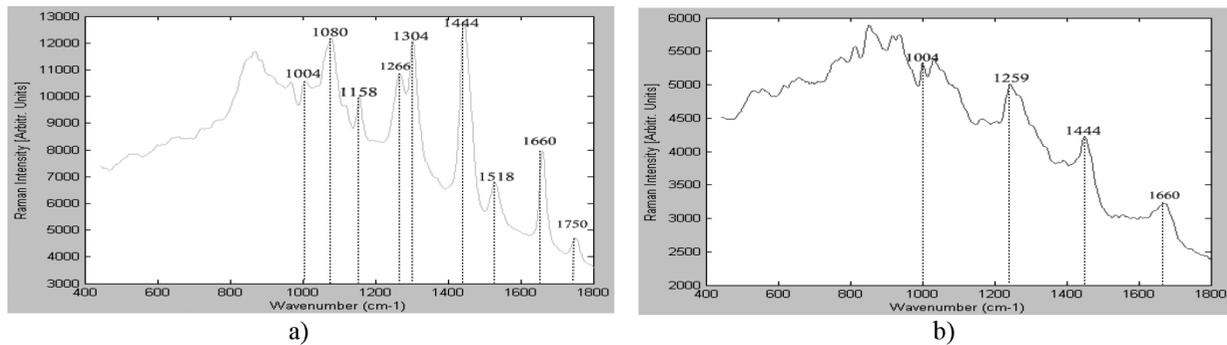


Figura 1. a) Espectros Raman de tejido de mama normal, b) Espectro Raman de tejido de mama dañado (Carcinoma Ductal Infiltrante) para un mismo paciente.

Análisis de Componentes Principales

Recientemente, métodos multivariados han sido aplicados a espectroscopía Raman para clasificar tejidos de cáncer de mama no canceroso y canceroso. En particular el análisis de componentes principales (PCA), ha sido usado para diferenciar tejido sano y dañado [5]. PCA es una técnica multivariada que actúa de manera no supervisada y es usada para analizar la estructura inherente de los datos. PCA reduce la dimensionalidad del conjunto de datos para obtener un conjunto alternativo de coordenadas: los componentes principales (PCs). PCs son combinaciones lineales de variables originales que son ortogonales y son diseñadas de tal forma que cada una cuenta con la máxima variabilidad del conjunto de datos [5].

Tabla 2. Vectores de características para 86 espectros Raman de tejido de mama sano y dañado.

Región de la Dispersión Raman										
Región (Número de Onda en cm ⁻¹)										
1750	1660	1518	1444	1304	1266	1259	1158	1080	1004	
0	1027.9	0	2011.2	0	0	469	0	0	403	
0	782.1	0	1704	0	0	447	0	0	251	
0	1597	0	3020	0	0	1154	0	0	1193	
...
0	2408	0	4551	0	0	2171	0	0	1398	
0	3070	0	5205	0	0	2004	0	0	1535	

Como cada uno de los espectros contiene una gran cantidad de información necesitamos PCA que ayude a extraer las características importantes o componentes. En el método PCA cada espectro Raman es representado como un vector de valores de intensidad correspondientes a cada longitud de onda. Para realizar el análisis de componentes multivariado (PCA), se obtuvieron las intensidades de los picos Raman tanto de tejido sano como de tejido dañado de una biopsia de un mismo paciente. Se formaron 86 vectores con una longitud de características ($l=10$), cada característica se basa en la intensidad de los picos de sus respectivos número de onda (cm⁻¹) como se muestra en la Tabla 2.

Una vez que se obtuvieron los vectores de características de los 86 espectros basados en las intensidades de los picos Raman, se procedió a realizar una reducción de dimensiones, sobre los vectores de características que describen los espectros Raman de tejido mamario sano, así como de tejido mamario dañado (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de componentes principales en tres dimensiones.

Espectro	pc1	pc2	pc3
1	523	-425	131
2	1223	-602	290
3	2137	-877	295
...
...
85	-1028	-503	3
86	-1053	-448	17

La Figura 2, muestra la distribución de los nuevos vectores de características de los 86 espectros Raman en el espacio tridimensional de los 3 primeros componentes principales, obtenidos de diferentes partes de una biopsia de cáncer de mama.

Algoritmo de Clusterización K-Means.

Generalmente, el análisis de PCA por sí solo, no provee la respuesta del significado que tiene cada componente PCA, ya que el PCA no agrupa (Clustering) sólo reduce dimensiones. K-means es un algoritmo de agrupamiento, que sigue una forma fácil para dividir una base de datos dada en k grupos (fijados a priori). La idea principal es definir k centroides (uno para cada grupo de la base de datos) y situarlos en la clase de su centroide más cercano. El próximo paso es recalculer el centroide de cada grupo y volver a distribuir todos los objetos según el centroide más cercano. El proceso se repite hasta que ya no hay cambios en los grupos de un paso al siguiente. Una inspección detallada del algoritmo puede observarse en [15].

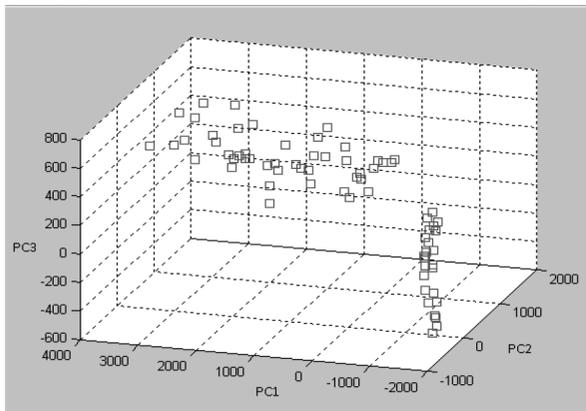


Figura 2. PCA en tres dimensiones obtenido de las intensidades de los picos detectados en 86 espectros Raman.

Aplicamos el algoritmo K-means para encontrar la distribución de dos clases, en nuestro caso estas dos clases serán tejido mamario sano y tejido mamario dañado. Por comodidad cada clase será expresada como ω_1 y ω_2 respectivamente.

ω_1 = Tejido mamario sano.

ω_2 = Tejido mamario dañado.

Tabla 4. Estructura para los Vectores de Características.

Clase	Vector	Espectro	pc1	pc2	pc3
ω_1	1	82	-1025	489	85
ω_1	2	83	-1074	815	30
ω_1	3	84	-1081	827	46
...
ω_1	43	85	-1028	503	3
ω_1	44	86	-1053	448	17
ω_2	45	1	523	-425	131
ω_2	46	2	1223	-602	290
ω_2	47	3	2137	-877	295
...
ω_2	85	85	-1028	-503	3
ω_2	86	86	-1053	-448	17

El algoritmo K-means luego de 10 iteraciones agrupó 44 vectores de características en la clase ω_1 y 42 en la clase ω_2 (Tabla 4). En la primera columna de la Tabla 3, se muestra la clase a la que pertenece cada vector de características de los espectros Raman de tejido sano y dañado. La distribución de ambas clases se muestra en la Figura 3, como podemos observar en la Figura 3, las muestras corresponden a uno de dos grupos característicos, los círculos del lado izquierdo y derecho son separados acorde al tejido sano y dañado.

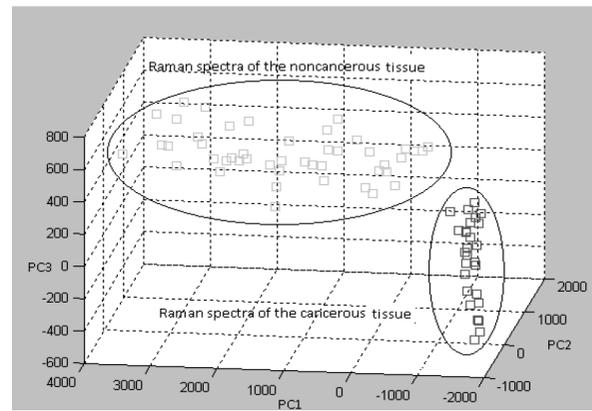


Figura 3. Agrupación de 86 espectros Raman con tejido de mama sano (lado izquierdo) y tejido de mama con Carcinoma Ductal Infiltrante (lado derecho).

El círculo del lado izquierdo representa exclusivamente tejido de mama normal. El círculo del lado derecho representa tejido dañado. Una vez agrupados los datos se procede a verificar los 86 espectros Raman; espectros Raman de tejido de mama normal pueden ser observados en la Figura 4 y espectros Raman de tejido de mama dañado pueden observarse en Figura 5.

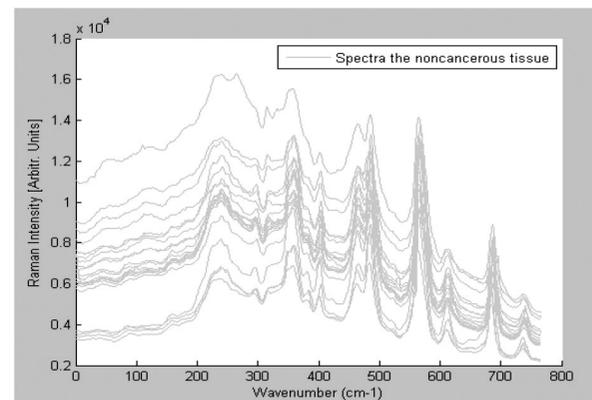


Figura 4. Espectros Raman de tejido de mama sano resultado del Algoritmo de Agrupación de Clases K-medias.

Las Figuras 4 y 5 muestran diferencias marcadas en los espectros Raman de tejido sano y dañado. Los picos Raman de las bandas 1004, 1080, 1158, 1259, 1266, 1304, 1444, 1518, 1660, 1750 que han sido asignados a los lípidos y carotenos son evidentemente diferentes en tejidos de mama sano y dañado. Esta diferencia se aprecia de igual manera en la forma general del espectro.

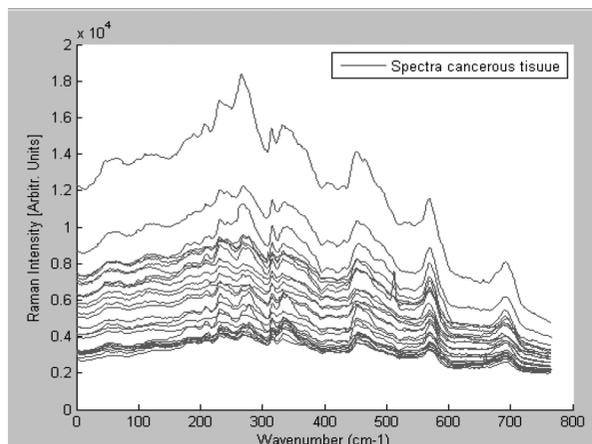


Figura 5. Espectros Raman de tejido de mama con cáncer resultado del Algoritmo de Agrupación de Clases K-medias.

Como existen muchas diferencias marcadas en los espectros Raman de tejido de mama sano y dañado consideramos un clasificador con distancia mínima con métrica de Mahalanobis [15].

Clasificador de Distancia Mínima de Mahalanobis.

En este apartado se mostrarán los resultados del clasificador de distancia mínima de Mahalanobis o, simplemente, clasificador de Mahalanobis, obtenidos al evaluar los 45 vectores de características de espectros Raman de tejido sano pertenecientes a la clase ω_1 y los 45 vectores de los espectros de tejido dañado asociados a la clase ω_2 , aplicando la técnica de validaciones cruzadas. Para evaluar el porcentaje correcto de detección se realizó la matriz de confusión siguiente:

Tabla 5. Matriz de Confusión.

Class	ω_1	ω_2
ω_1	VN _(1,1)	FP _(1,2)
ω_2	FN _(2,1)	VP _(2,2)

Donde:

VN (*Verdaderos Negativo*). La enfermedad no está presente y se diagnostica como sano.

FP (*Falsos Positivo*). La enfermedad no está presente y se diagnostica enfermo.

FN (*Falso Negativo*). La enfermedad está presente pero no se detectó.

VP (*Verdadero Positivo*). La enfermedad está presente y se detectó.

Tomando en consideración la matriz de confusión descrita previamente podemos evaluar la *sensibilidad* de este clasificador para detectar caso positivos en pacientes enfermos (porcentaje de enfermos correctamente identificados) y la *especificidad* que nos indica la capacidad de nuestro clasificador para dar como casos negativos los casos realmente sanos (porcentaje de sanos correctamente identificados).

$$\text{Sensibilidad} = [VP / (VP + FN)] * 100. \quad (\text{Ec } 1)$$

$$\text{Especificidad} = [VN / VN + FP] * 100. \quad (\text{Ec } 2)$$

La Tabla 6 muestra la sensibilidad y la especificidad, como resultado de evaluar los 45 vectores de la clase ω_1 y los 45 vectores de la clase ω_2 aplicando el clasificador de Mahalanobis, se obtuvo la matriz de confusión en base a las distancias de cada uno de los vectores de características de ambas clases respecto a los prototipos de las clases ω_1 y ω_2 .

Tabla 6. Sensibilidad, especificidad y la predicción exacta a través del Clasificador de Mahalanobis.

Clase	Errores (18 bandas + Mahalanobis)		Especificidad	Sensibilidad
	Sano Como Dañado (FP)	Dañado Como Sano (FN)		
ω_1	0/45	0/45	100%	
ω_2	1/45	1/45		97.77%

En la Figura 6 a) se puede observar que las distancias de los vectores de características de la clase ω_1 son menores cuando se evalúan con respecto a su misma clase que con respecto a la clase ω_2 , por ello, este clasificador tiene el 100% de especificidad (VN); adicionalmente, al observar los vectores de características de la clase ω_2 al ser evaluados en contra de ambas clases se asigna un vector a la clase ω_2 debido a que su distancia es menor respecto al prototipo de la clase ω_1 , Figura 6 b), esta es la razón por la cual el clasificador obtiene el 97.77% de sensibilidad.

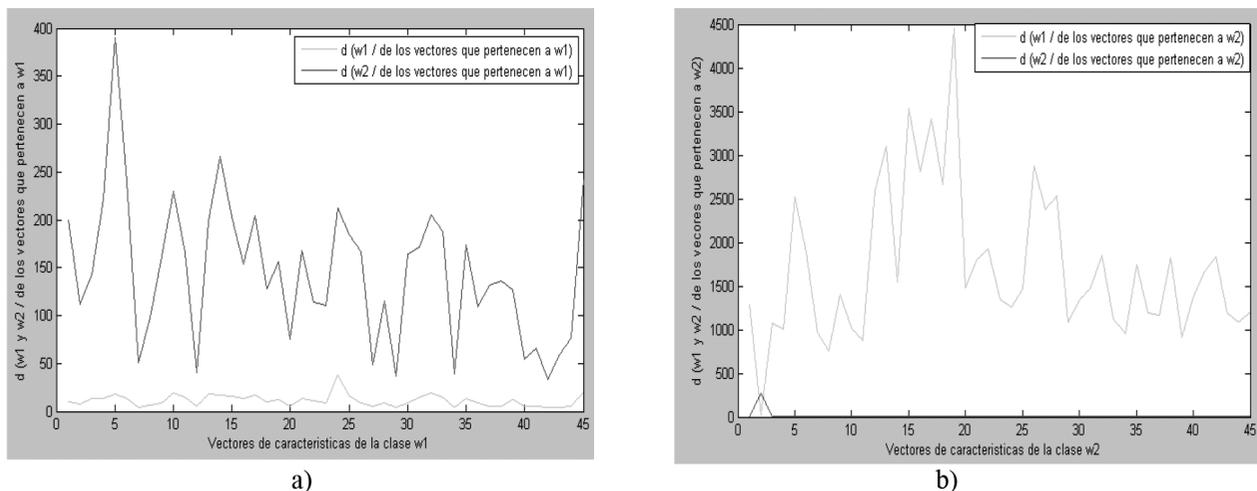


Fig. 6. a) Distancia de los vectores de características de la clase ω_1 vs las clases ω_1 y ω_2 , b) Distancia de los vectores de características de la clase ω_2 vs las clases ω_1 y ω_2 .

Conclusiones

En este artículo presentamos un método para la detección automatizada de cáncer de mama, en la cual una señal Raman sirve para clasificar biopsias de tejido sano (clase ω_1) y tejido dañado (clase ω_2). Un importante aspecto es la generación de características utilizando PCA; en el método PCA cada espectro Raman fue representado como un vector de valores de intensidad correspondientes a cada longitud de onda, que representan los picos Raman tanto de tejido sano como de tejido dañado. El análisis de PCA por sí solo, no provee la respuesta del significado que tiene cada componente PCA, ya que el PCA no agrupa (Clustering) solo reduce dimensiones. Aplicamos el algoritmo K-means para encontrar la distribución de dos clases, en nuestro caso estas dos clases fueron tejido sano y tejido dañado. Por comodidad cada clase fue expresada como ω_1 y ω_2 respectivamente, después de detectar las clases intentamos un clasificador de distancia Euclídea de Mahalanobis y altas tasas de detección correctas fueron obtenidas.

Referencias

- [1] World Health Statistics, (2014). "World Health Organization 2014" (<http://www.who.int/en/>).
- [2] Qiang Tu, MS, Chang Chang, (2012). Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, 545–558.
- [3] Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS, (2005). Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:12371-6.
- [4] Rehman S, Movasaghi Z, Tucker AT, Joel SP, Darr JA, Ruban AV, et al., (2007). Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *J Raman Spectroscopy*; 38:1345-51.
- [5] Pichardo-Molina JL, Frausto-Reyes C, Barbosa-Garcia O, Huerta-Franco R, Gonzalez-Trujillo JL, Ramirez-Alvarado CA, et al., (2007). Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers Med Sci*; 22:229-36.
- [6] Mariani MM, Maccoux LJ, Matthaus C, Diem M, Hengstler JG, Deckert V., (2010). Micro-Raman detection of nuclear membrane lipid fluctuations in senescent epithelial breast cancer cells. *Anal Chem*; 82:4259-63.
- [7] Abramczyk Halina, Beata Brozek-Pluska, Jakub Surmacki, Joanna Jablonska-Gajewicz, Radzislav Kordek., (2012). Raman 'optical biopsy' of human breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 108 74 :81.
- [8] Surmacki Jakub, Musial Jacek, Kordek Radzislav and Abramczyk Halina. Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis. *Molecular Cancer* 2013, 12:48.
- [9] Marro M., Nieva C. Sanz-Pamplona R., Sierra A., (2014). Molecular monitoring of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells by means of Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1785 :1795.
- [10] Tu Q, Eisen J, Chang C., (2010). Surface-enhanced Raman spectroscopy study of indolic molecules adsorbed on gold colloids. *Journal of Biomedical Optics*; 020512:15.

- [11] Shafer-Peltier, K. E., Haka, A. S., Fitzmaurice, M., Crowe, J., Myles, J., Dasari, R. R., Feld, M. S., (2002). Raman microspectroscopic model of human breast tissue: Implications for breast cancer diagnosis in vivo. *J. Raman Spectrosc.* 33, 552 :563.
- [12] Chowdary, M. V. P.; Kaylan-Kumar, K., Mathew, S., Rao, L., Murali-Krishna, C., Kurien, J., (2009). Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: a spectral deconvolution study. *Biopolymers*, 91(7), 539 :546.
- [13] Barman, I., Chari-Dingari, N., Saha, A., McGee, S., Galindo, L. H., Liu, W., Plecha, D., Klein, N., Rao-Dasari, R., Fitzmaurice, M. (2013). Application of Raman spectroscopy to identify microcalcifications and underlying breast lesions at stereotactic core needle biopsy. *Cancer Res.* 73(11), 3206 :3215.
- [14] Zhou, Y., Liu, C., Li, J., Zhou, L., He, Sun, Y., Pu, Y., Zhu, K., Liu, Y., Li, Q., Cheng, G., Alfano, (Feb. 2-7, 2013). "R. R." In Proc. SPIE 8577, *Optical Biopsy XI, California*
- [15] Koutroumbas K. and Theodoridis S., (1999). *Pattern Recognition*, 1st ed. California, E. U. A.: Academic Press.
- [13] Kumar, V., Petersen, A., y Leone, R.P., (2007). How Valuable Is Worth of Mouth? in *Harvard Business Review*, Vol. 85, No. 10, p. 139-146.

Artículo recibido: 4 de enero de 2014

Aceptado para publicación: 10 de febrero de 2015