



El saber de mis hijos
hará mi grandeza

UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL SUR
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**“ESPECTROSCOPIA RAMAN UNA ALTERNATIVA
EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

PRESENTAN

**MARÍA MILAGROS JOCOBI AYALA
LILIA DEL SOCORRO SOTOMEA CECENA**

NAVOJOA, SONORA

FEBRERO DEL 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de MARIA MILAGROS JOCOBI AYALA y LILIA DEL SOCORRO SOTOMEA CECEÑA, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.



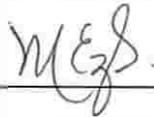
Q. MARIA BALVANEDAARECHIGA CARRILLO

PRESIDENTE



M.I. LUCIA ARMIDA CORRAL SOTOMAYOR

SECRETARIO



DRA. MARIA ELENA ZAYAS SAUCEDO

VOCAL

HECTOR CESAR ORNELAS VIZCARRA

SUPLENTE

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en este trabajo de Tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente, a los autores y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación es comunicación científica o divulgación científica de los datos contenidos en este trabajo de Tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación por escrito del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

AGRADECIMIENTO

Principalmente a Dios por darme la vida, y la fuerza de estudiar y trabajar al mismo tiempo, gracias por permitirme cumplir el objetivo que me propuse.

A mis padres Guadalupe Ayala López y José Jacobi Borbón, por darme la vida, su apoyo, sus consejos y su bendición, gracias por que siempre han confiado en mí.

A mi esposo, que en el momento que curse mi carrera siempre me apoyo con sus consejos y su compañía, gracias porque nunca me dejaste sola en los momentos difíciles que pase.

A mis hermanos, amigos y compañeros que estuvieron conmigo gracias.

Especialmente agradecida con la Dra. María Elena Zayas Saucedo, por el apoyo que nos brindó, por los momentos de atención que tuvo para nosotras, por la paciencia y la espera de este trabajo de tesis, por sus enseñanzas y conocimiento.

Gracias a los Maestros de la Universidad de Sonora por las enseñanzas que nos impartieron en clases.

MARIA MILAGROS JOCOBI AYALA

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios y a mis padres por haberme dado la vida, Lorenza Ceceña Camea mi mamá. Agradezco también a mi abuela Margarita Camea Huicho por su gran apoyo, a mis tías Dominga Lidia Ceceña Camea y Abrhana Ceceña Camea por su ayuda incondicional, así mismo a la Dra. María Elena Zayas Saucedo por trasmitirnos sus conocimientos y apoyarnos para poder titularnos, por su valiosa y gran ayuda gracias.

Agradezco también a los maestros que con sus enseñanzas y consejos logramos cumplir nuestro objetivo de terminar nuestros estudios.

LILIA DEL SOCORRO SOTOMEA CECEÑA

DEDICATORIA

Este presente trabajo se lo dedico a mis padres por el apoyo brindado durante toda mi vida.

A mi esposo por que me ha apoyado en los días laboriosos de este trabajo, por que siempre ha confiado en mí.

Le dedico en especial esta tesis a mi hija EMILY MARIAN por los momentos que me he separado de ella para escribir este trabajo de tesis.

MARIA MILAGROS JOCOBI AYALA

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico muy especialmente a la persona que confio en que terminaría mi carrera de Químico Biólogo Clínico, así como también fue el único que no me dio la espalda cuando más lo ocupe. Por tu ayuda y gran apoyo gracias a ti.

Mi esposo: Juan Jesús

También les dedico mi trabajo a mis hijos que me acompañaron durante mis estudios Jesús Orlando y Juan Esteban.

LILIA DEL SOCORRO SOTOMEA CECENA.

INTRODUCCION.

En el mundo molecular, los investigadores actúan como detectives que trabajan intensamente para desentrañar los misterios que rodean las células. Una de las herramientas, en esta tarea ha sido la espectroscopia Raman¹. Esta es una técnica espectroscópica que mide el único espectro Raman para cada tipo de molécula biológica. Como tal, la espectroscopia Raman tiene el potencial de proporcionar a los científicos con una biblioteca de espectros que pueden utilizarse para identificar la composición de una molécula desconocida. Sin embargo, esta técnica es limitada en el sentido de que no es capaz de manipular estructuras particulares, sin perturbar su ambiente único. La espectroscopia Raman es una técnica no destructiva que da respuesta en los campos de trabajo de las ciencias de la vida, una contribución importante deriva de que es una técnica que puede trabajar a presión atmosférica. Esta técnica proporciona información sobre compuestos bioquímicos de los tejidos, como los carbohidratos, proteínas, ADN, etc. El tipo de tejido y el estado determinan la composición.

Como en el estudio del cáncer, son primordiales las manchas histopatológicas en la diagnosis estándar, pero la distinción entre tejidos sanos y enfermos, a simple vista es muy compleja. Esta técnica ha estudiado el diagnóstico de los gliomas²; llegando no sólo a identificar el estado, si no incluso el estado de desarrollo de la tumoración, puesto que el alto contenido de ADN de un tejido será indicativo de la proliferación de las células, identificado con el rápido crecimiento asociado con el cáncer.

La espectroscopia Raman ya se utiliza en algunas industrias como la química y la farmacéutica por su asombrosa precisión, la gran ventaja es de que esta no es invasiva, y permite obtener resultados mucho mas rápido que los procedimientos clásicos y mucho más precisos. A partir de la lectura de los tejidos los científicos podrían determinar en cuestión de minutos la enfermedad.

En el mundo actual son cada vez más complejas y refinadas las técnicas de análisis biológicos, la espectroscopía ha mantenido su lugar en la vanguardia. Un tipo de espectroscopía en particular, espectroscopía Raman, ha demostrado ser especialmente útil en la presentación de un análisis detallado de una asombrosa variedad de muestras biológicas. Espectroscopía Raman es capaz de detectar y analizar muy pequeños objetos moleculares con alta resolución.

Recientemente, un derivado de la espectroscopía Raman, denominado Raman pinzas, ha permitido un mayor grado de capacidad analítica. Raman pinzas usa pinzas ópticas para suspender y manipular una molécula sin contacto directo, por lo que la molécula de espectros de Raman puede ser grabado mientras se está en su estado más natural. Como tal, los espectros recogidos son más reflejo de la verdadera naturaleza de la molécula en estudio y, por tanto, de más importancia. Incluso con los adelantos de hoy, tan sólo estamos empezando a arañar la superficie de una técnica que encierra la promesa de largo alcance y futuras aplicaciones.

Una de ellas sobre el terreno que se beneficiará en gran medida de Raman pinzas es virología³. La alta resolución, la falta de preparación de la muestra, y muy poco tiempo de la recopilación de datos requeridos, la tecnología ideal para su uso en el estudio de los virus y las células infectadas viralmente. Sin embargo, debido a la novedad del enfoque, esta revisión ha sido redactada de tal manera que los que no están familiarizados con la óptica de la física no pueden perderse y perder interés en una tecnología que posee este tipo de increíble potencial.

INDICE

	Página
DECLARACION INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTO	4
DEDICATORIA	6
INTRODUCCION	8
OBJETIVOS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
JUSTIFICACION	13
CAPITULO I ANTECEDENTES Y CARACTERISTICAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN	15
1 ANTECEDENTES.....	15
1.1 HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN	16
1.2 LIMITES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN.	19
1.3 RAMAN PINZAS.....	19
1.4 FUNDAMENTO DE LA TECNICA RAMAN.	20
CAPITULO II TIPO DE ENFERMEDADES QUE SE DETECTAN POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	23
2.1 OSTEOPOROSIS.	23
2.2 CARIES.....	23
2.3 CÁNCER DE MAMA.	25
2.4 CANCER CERVICOUTERINO.....	26

2.5 LEUCEMIA.....	29
2.5.1 TIPOS DE LEUCEMIA	29
CAPITULO III DIFERENCIA ENTRE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN Y LAS TECNICAS ACTUALES.....	31
3.1 DENSITOMETRÍA.....	31
3.2 TECNICA DE RADIOGRAFIA INTRAORAL.	31
3.3 DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA POR MAMOGRAFÍA.	32
3.4 DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA POR LA TECNICA ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	32
3.5 PAPANICOLAOU.....	34
3.6 ANÁLISIS DE SANGRE	34
CAPITULO IV TENDENCIAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN ANALISIS CLINICO A CORTO Y A LARGO PLAZO	37
4.1 PERSPECTIVAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN	37
4.2 ANÁLISIS RAMAN POLARIZADO.....	39
4.4 APLICACIONES ACTUALES DE LAS RAMAN PINZAS.....	41
4.5 FUTURAS APLICACIONES DE RAMAN PINZAS.....	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer los usos y aplicaciones de la Espectroscopia Raman en el diagnóstico clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar las enfermedades que pueden ser detectadas por espectroscopia Raman
- b) Analizar las ventajas de la espectroscopia Raman sobre las otras técnicas espectroscópicas de diagnóstico comúnmente usadas
- c) Discutir la viabilidad de esta nueva técnica
- d) Conocer los fundamentos de la técnica de espectroscopia Raman

JUSTIFICACION

La espectroscopia Raman es una técnica usada en química y física de la materia condensada para estudiar modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios y otros. Basándose en los fenómenos de dispersión inelástica o dispersión Raman, de la luz monocromática, generalmente de un láser en el rango de luz visible, el infrarrojo cercano, o el rango ultravioleta cercano. La luz láser interactúa con fotones u otras excitaciones en el sistema provocando que la energía de los fotones del láser experimente un desplazamiento hacia arriba o hacia abajo.

Actualmente las áreas de biología y medicina están involucrándose en el uso de espectroscopia Raman para estudiar la materia orgánica como ha sido el caso de la identificación de la proteína priónica de carácter infeccioso que se ha detectado por la espectroscopia Raman. Esta técnica que por años se ha usado para la caracterización de materiales inorgánicos, está actualmente en desarrollo para hacerla extensiva a detecciones de enfermedades entre las cuales pueden citarse el cáncer de mama, caries, osteoporosis, leucemia entre otros. En los laboratorios de análisis clínicos se analiza la sangre de las personas para diagnosticar la leucemia. Esta técnica primero determina los niveles de glóbulos rojos, blancos y plaquetas en un análisis de sangre. Generalmente los glóbulos blancos pueden estar disminuidos, aunque su número también puede ser normal o elevado. Lo que será determinante, que al examinarlos al microscopio, se observarán glóbulos blancos muy inmaduros, blastos, que normalmente no están presentes en la sangre circulante.

Los glóbulos rojos y las plaquetas habrán disminuido en número, Para confirmar el diagnóstico se tomará una muestra de médula ósea, a través de una aspiración, y se analizarán las células presentes en ella. Esta última prueba le proporciona al paciente en estudio un gran dolor y estrés para confirmarle este tipo de enfermedad. Si se tuviera a la mano la técnica de espectroscopia Raman el paciente no sufriría gran dolor y sólo se le extraería una gota de sangre para darle

un diagnóstico de si posee o no posee leucemia convirtiéndose así en un estudio no invasivo y no doloroso así como también un diagnóstico rápido. Esto se considera una real justificación para estudiar y desarrollar un tema de actualidad, que produciría una ventaja para el paciente.

CAPITULO I ANTECEDENTES Y CARACTERISTICAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN

1 ANTECEDENTES

Existen diferentes tipos de dispersión raman, por ejemplo: la dispersión Raman espontánea es generalmente muy débil, y como resultado la principal dificultad de la espectrometría Raman es separar la luz débil dispersada inelásticamente de la luz intensa láser por dispersión de Rayleigh. Históricamente, los espectrómetros Raman utilizaban rejillas de difracción holográfica y múltiples etapas de dispersión para lograr un alto grado de rechazo láser. En el pasado, los detectores de elección para las configuraciones de dispersión Raman eran los fotomultiplicadores, lo que daba lugar a largos tiempos de adquisición. Sin embargo, la instrumentación moderna en casi todo el mundo emplea filtros de muesca o borde para rechazar el láser, así como espectrógrafos y detectores CCD.

Hay diferentes tipos avanzados de espectrometría Raman, como la de superficie potenciada, la polarizada, la estimulada, la de transmisión, la compensada espacialmente y la hiper-Raman.

En la actualidad hay muy pocos estudios de la espectroscopia raman relacionados con tejidos orgánicos, así podemos citar la patente relacionada con investigaciones de proteína prionica:

P. Carmona, J. Monreal, E. Monleón, M. Monzón y J. J. Badiolá⁴ (2004) inventaron un procedimiento para detectar proteína prionica infectiva por Espectroscopia raman láser en muestras de animales infectados por una encefalopatía spongiforme transmitible. La aplicación de este método puede ser extendido a estudios de sangre de borrego, humanos, ganado y pájaros entre otros.

J. Griffith⁵ (2007) ha desarrollado una investigación a cerca de la detección de enfermedades de cáncer y osteoporosis de manera instantánea por medio de espectroscopia raman, incluso durante la cirugía en la remoción de tumores se corta parte del tejido y se analiza por raman para saber hasta dónde remover el tejido anormal.

1.1 HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN

En 1923, Compton⁶, al estudiar la dispersión de rayos X por un bloque de grafito, descubrió que en los rayos dispersados existían dos componentes: uno que correspondía al rayo incidente y el otro cuya frecuencia estaba desplazada en una cantidad que dependía del ángulo de dispersión, pero era independiente de la longitud de onda inicial. A partir de ese año y hasta 1927 varios investigadores y entre ellos Smeka, Kramer y Heinsenberg y Dirac⁷, procuraron identificarlos.

En 1928, el físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman⁸ (Fig. 1) descubrió que la longitud de onda visible de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas difiere de la del haz incidente y, además, que los desplazamientos de la longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas causantes de la dispersión.

La espectroscopia Raman ha sido fortalecida por la incorporación del láser, un haz de excitación intenso aumenta la intensidad de la radiación dispersada; por lo tanto, la utilización de fuentes de láser aumenta la sensibilidad de la espectroscopia Raman.

La espectroscopia Raman es una técnica en la que la muestra se irradia con la radiación monocromática, generalmente láser y la radiación dispersada que generalmente es de mayor longitud de onda se mide de 90° a 180°.

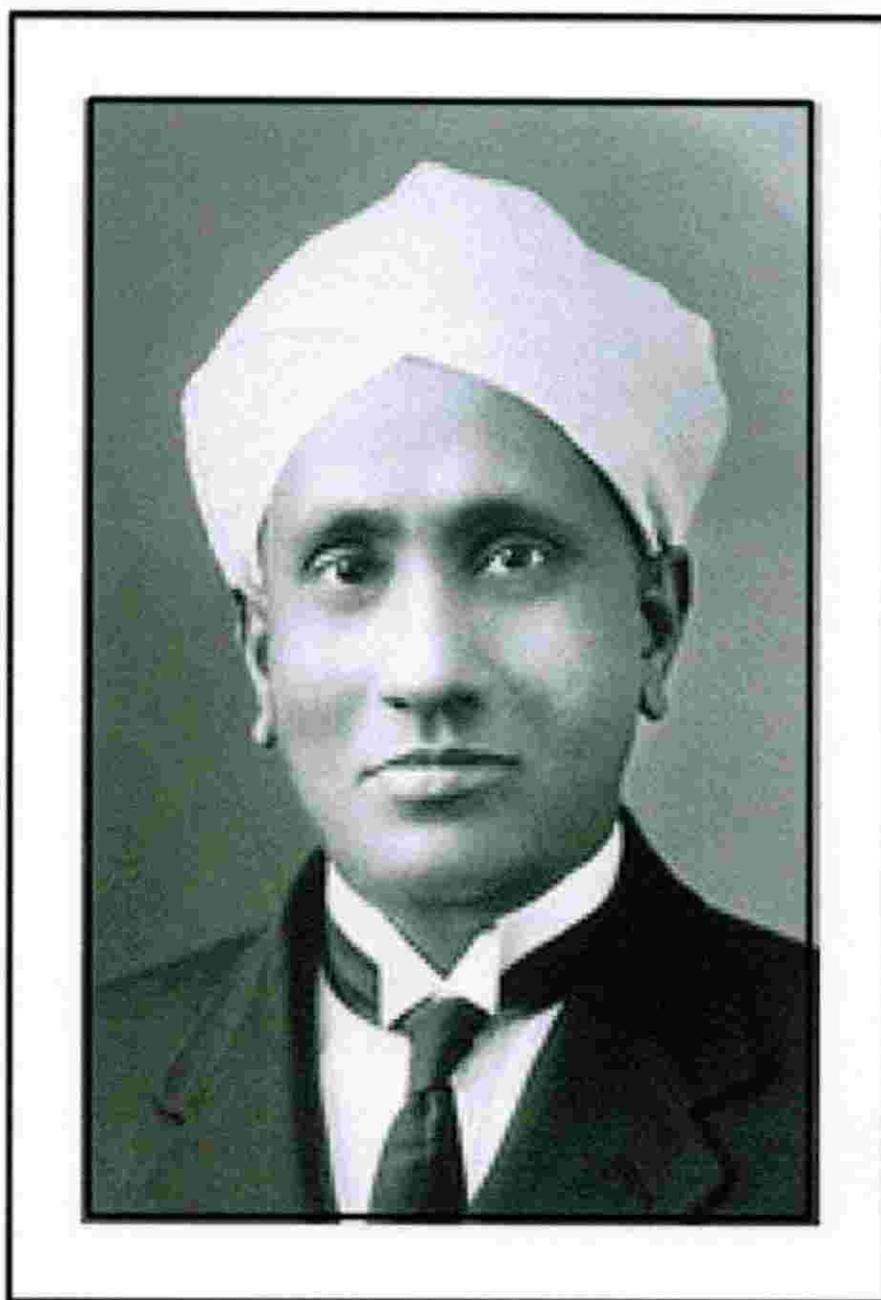


Figura 1. Chandrasekhara Venkata Raman

La utilidad principal de la espectroscopia Raman es el estudio de la forma del comportamiento de moléculas de alta simetría, o cromóforos dentro de la molécula, para las cuales no puede obtenerse suficiente información del espectro infrarrojo.

La espectroscopia Raman es una ayuda importante a la espectroscopia infrarroja.

En la espectroscopia Raman existe una relación lineal entre la intensidad y la concentración, lo cual permite la determinación de los componentes mayores de las mezclas de un modo más sencillo que la espectroscopia infrarroja.

Desde su descubrimiento, generó un sostenido interés entre los físicos y químicos de la época. Sin embargo tenía muchas limitaciones, pues el efecto Raman era muy débil y requería entre algunas horas y varios días de exposición. Con la aparición de láser⁹ y posteriormente de detectores más sensibles la espectroscopia Raman ha encontrado un campo de aplicación más amplio.

Aunque hay similitudes impresionantes entre los espectros Raman y los espectros en el infrarrojo, hay suficientes diferencias entre las clases de grupos que son activos en uno u otro para hacer que las técnicas sean complementarias y no competitivas.

Una ventaja importante de la espectroscopia Raman reside en que en esta técnica el agua es un solvente muy útil. Además puesto que las señales por lo general están en la región visible o el infrarrojo cercano, se puede utilizar celdas de vidrio o de cuarzo, lo que evita el inconveniente de tener que trabajar con ventanas de cloruro de sodio o de otros materiales inestables en la atmósfera.

A pesar de esas ventajas, la espectroscopia Raman apenas empezó a ser utilizada por los químicos cuando se empezó a disponer de los rayos láser en los años sesenta. Lo cual facilitó la obtención de espectros. En los años recientes la espectroscopia Raman se ha vuelto una herramienta de rutina gracias a los rayos

láser, los detectores en serie y la disponibilidad de instrumentos modernos comerciales de costo moderado.

1.2 LIMITES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN.

Las capacidades analíticas de la espectroscopia Raman se ven limitados por su incapacidad para manipular, y por lo tanto, analizar a fondo las moléculas biológicas objeto de estudio sin hacer contacto físico.

Esta limitación se ha resuelto por espectroscopia Raman de acoplamiento con una tecnología llamada pinzas ópticas¹⁰. El nuevo método, denominado Raman pinzas, utiliza pinzas ópticas para manipular una muestra sin contacto con ella para que no sea modificada la espectroscopia Raman para el análisis.

1.3 RAMAN PINZAS.

Raman pinzas es una tecnología relativamente nueva. Las parejas espectroscopia Raman con pinzas ópticas permiten lograr que muestras desconocidas tengan control y resolución.

Pinzas ópticas es un sistema que concentra casi un láser infrarrojo sobre una muestra para solucionar el problema en una trampa óptica que pueda ser controlada.

La técnica, que fue desarrollada por primera vez por Arthur Ashkin¹¹. En 1986, tiene la capacidad para controlar los objetos con tamaños desde 5 nm a más de 100 nm, ya se trate de átomos, virus, bacterias, proteínas, células, u otras moléculas biológicas.

Tal vez lo más importante, que permiten las pinzas ópticas para el análisis de la muestra es que no se puede tocar físicamente, o se necesita absorber a una superficie, dejando a la muestra en un medio perturbado y estado más natural.

Como tal, pinzas Raman tiene la capacidad para analizar una molécula desde todos los ángulos y, por tanto, proporcionar información más precisa sobre la identidad, la estructura y conformación de la espectroscopia Raman puede por sí sola.

Pinzas ópticas ofrece más ventajas sobre la eliminación de luz y de fluorescencia, así como, en la ubicación de una molécula en lugar en una trampa óptica, lo que permite la mejor manera posible de excitación y la recaudación de los espectros de Raman.

Esta trampa óptica también permite Raman pinzas para separar fácilmente las moléculas aisladas de estudio, tales como su respuesta a diferentes condiciones y / o tratamientos.

Una solución al problema de inmovilizar micro partículas en suspensión consiste en las llamadas técnicas de pinzas ópticas que utilizan fuerza de radiación para lograr tal propósito.

Los sistemas de pinzas ópticas vienen desarrollándose desde mediados de los años 80 y han demostrado ser una potente herramienta en el campo de la biología y la medicina, un sistema de pinzas ópticas permite atrapar células individuales durante un tiempo razonable sin dañarlas permitiendo de este modo realizar un estudio preciso del comportamiento de dicha célula en diferentes circunstancias.

1.4 FUNDAMENTO DE LA TECNICA RAMAN.

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural.

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él, un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros

cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente.

1.5 EL EFECTO RAMAN

Es la interacción de la molécula con el fotón incidente en un evento de dispersión inelástica.

Ventajas de espectroscopia Raman:

- ❖ Es mínimamente invasiva, impidiendo biopsias innecesarias.
- ❖ Es no destructiva. Siempre y cuando la potencia y longitud de onda de excitación sean escogidas cuidadosamente para evitar daño en el tejido.
- ❖ Es una técnica respectivamente rápida en comparación con métodos de laboratorio estándares. Los espectros son adquiridos en tiempo real, reduciendo el tiempo en el diagnóstico médico. Esto va a beneficiar tanto al paciente como al médico ya que por su exactitud y rapidez se podrá saber si el paciente está enfermo o no, logrando así una mejor calidad de vida.
- ❖ Otras de las ventajas que tiene la técnica de espectroscopia Raman es de que se pueden trabajar muestras sólidas, líquidas y gases, así como también se puede trabajar a altas y bajas temperaturas.
- ❖ Se pueden utilizar recipientes de vidrios.

Desventajas de Espectroscopia Raman:

- ❖ Entre las desventajas de esta técnica está la debilidad inherente del efecto Raman. Adicionalmente la débil señal Raman puede estar sujeta a la fluorescencia¹² de fondo que puede ser 10 veces más intensa.
- ❖ Desventaja es cuando existe una alta absorción en las muestras, porque la luz incidente es absorbida en lugar de ser esparcida. Un ejemplo es que la intensidad Raman en la piel oscura es menor que en

la piel clara, esto se debe al hecho de que la piel oscura tiene más melanina que puede absorber más fotones y transferirlos en calor, mientras que el láser penetra más profundo en la piel clara y produce más esparcimiento Raman.

- ❖ En la espectroscopia Raman in situ se utilizan fibras ópticas de silicio que también producen señal Raman y de fluorescencia que interfiere con la señal Raman de los tejidos.

CAPITULO II TIPO DE ENFERMEDADES QUE SE DETECTAN POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

2.1 OSTEOPOROSIS.

Es conocida también como la enfermedad silenciosa por falta de síntomas, es una reducción de la masa ósea y de su resistencia mecánica, que se ha convertido en la principal causa de fracturas óseas en mujeres después de la menopausia y de ancianos en general.

Las quebraduras causadas por la osteoporosis¹³ pueden tener efectos prolongados: cuando se produce en la espina dorsal son la causa de una postura encorvada o la pérdida de estatura, cuando sucede en la cadera generalmente requiere de cirugía y muchas veces limitan la capacidad de la persona para trabajar y mantenerse activas.

La densitometría ósea (Fig. 2) consiste en la utilización de dosis bajas de rayos X para observar un área del cuerpo, como la cadera, la mano o el pie, en búsqueda de señales de pérdida de minerales o debilitamiento óseo.

2.2 CARIES.

Es una enfermedad microbiológica infecciosa¹⁴ cuyo resultado es la destrucción localizada de los tejidos duros calcificados dentarios, causada por la producción ácida de bacterias y manifestadas por el progresivo oscurecimiento y reblandecimiento de dichos tejidos y su posterior pérdida. Esta enfermedad es posiblemente una de las enfermedades crónicas más comunes del mundo. La restauración de los dientes cariados (Fig. 3) es muy necesaria, ya que la pérdida del diente puede conducir no sólo al deterioro estético si no a alteraciones del habla.



Figura 2. Equipo tradicional de estudio para densitometría

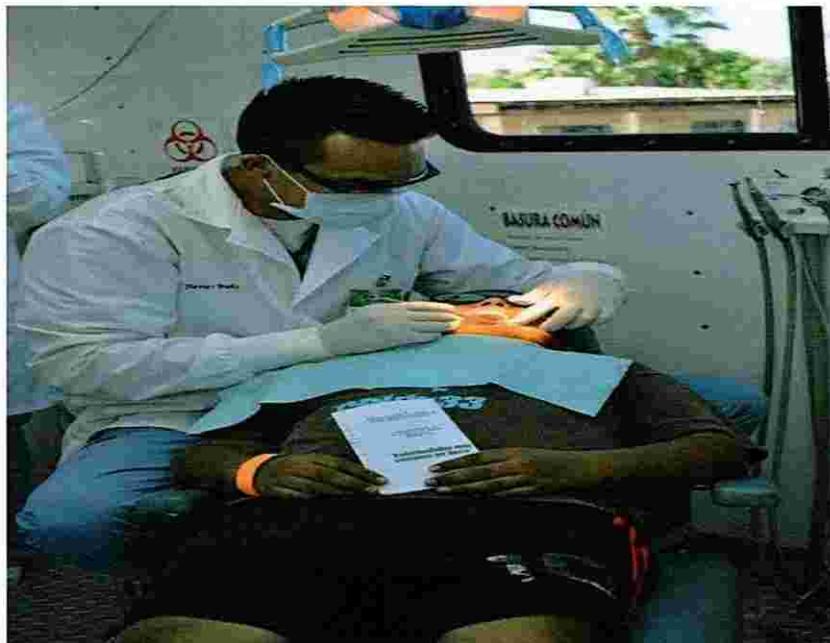


Figura 3. Restauración de dientes afectados por caries.

2.3 CÁNCER DE MAMA.

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública que aqueja a la ciudadanía, de acuerdo a los datos epidemiológicos el cáncer de mama es una de las primeras causas de mortalidad de la población femenina en los países industrializados. En Estados Unidos, por ejemplo una de cada nueve mujeres desarrollara un cáncer de mama a lo largo de su vida.

El cáncer de mama es un tumor maligno más frecuente en la mujer y la segunda causa de muerte por cáncer. Su máxima incidencia se da por encima de los cuarenta años, y aunque el cáncer de mama no es muy prevalente en las mujeres jóvenes, en la actualidad, debido al retraso creciente en la edad de la primera gestación, es posible ver un discreto aumento en series clásicas, encontrando una frecuencia de entre 1 de cada 3,000 y 1 de cada 10,000 embarazos. Este tumor es el más frecuente de los tumores malignos no ginecológicos en la mujer gestante, y el segundo de los tumores malignos en general, después del carcinoma de cuello uterino, de acuerdo con la Organización Mundial de la salud, esta situación se ha complicado y de no encontrarse mejores estrategias de prevención, para el año 2030 se estima se presentarán mundialmente 11.8 millones de muertes por causa de cáncer de mama. En 2006 los cánceres fueron la tercera causa de muerte en México, 63 888 personas fallecieron por éstos, el volumen representa el 12.9 % del total de muertes registradas. En 2010 este tipo de cáncer es la primera causa de muerte en las mujeres mexicanas¹⁵. Actualmente las instituciones de servicio de la salud han decretado este mes de octubre del 2013 la campaña "Piensa en Rosa" para que toda mujer a partir de los 40 años, se practique una mamografía y asiste a la clínica de mama en el lugar donde vive.

Es muy importante pronosticar a tiempo esta enfermedad que aqueja a la población y esto depende de la etapa en la cual se detecta la malformación. Por esta razón, mientras más pronto se descubre la enfermedad del cáncer, el

tratamiento es más eficaz en el paciente, especialmente para los cánceres mamario, cervicouterino y de ovario en las mujeres o de próstata y colorectal en los hombres.

Las técnicas que se utilizan actualmente para del diagnóstico de cánceres en clínicas son: obtención de imágenes (Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear, Colposcopia), biopsia de los tejidos y análisis bioanalítico de los fluidos corporales. (Fig. 4). A pesar de esto, todas estas técnicas, no son eficazmente sensibles y/o específicas para unas detecciones tempranas de la mayoría de los cánceres y sobre todo de los estados pre cancerígenas. Además, es difícil de hacer el diagnóstico de los cánceres analizando únicamente las alteraciones morfológicas en las células y tejidos. Algunos tumores sólidos solamente se detectan cuando su tamaño es de 1 cm o más de diámetro, lo que significa que su masa constituye millones de células y hay posibilidad de que otros órganos se infecten.

Todos estos problemas de enfermedad requieren que se desarrollen nuevos y mejores métodos de diagnóstico clínico. Aplicando los avances recientes en nanotecnología, estas innovadoras técnicas pueden ser una herramienta más poderosa y rápida para el diagnóstico de cánceres especialmente en etapas pre cancerígenas.

2.4 CANCER CERVICOUTERINO.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento anormal de células, que al desarrollarse de forma incontrolada, invaden los tejidos normales y los destruye, provocando una alteración en el funcionamiento del organismo. Esta inicia generalmente como una enfermedad localizada. Cuando ésta se presenta en los tejidos del cuello uterino, se le conoce como cáncer cervicouterino (Fig. 5), esta crece lentamente por un período de tiempo; durante el cual comienzan a aparecer células anormales, causando un fenómeno conocido como displasia. Para detectar el cáncer cervicouterino¹⁶ se lleva a cabo una prueba llamada Papanicolaou.



Figura 4. Preparación para la obtención de imágenes por mamografía.

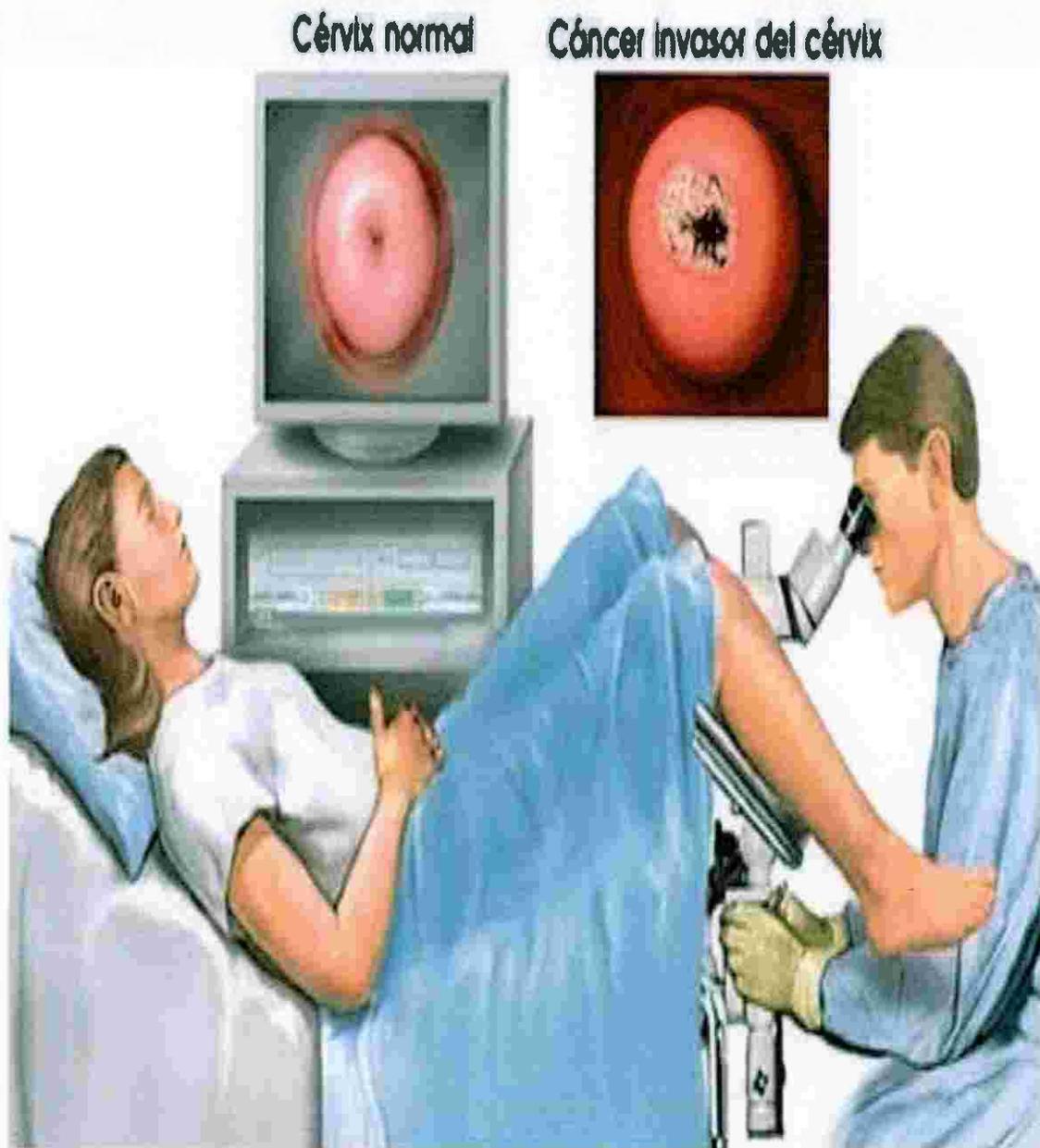


Figura 5. Colposcopia para detección de cáncer cervicouterino.

El Papanicolaou se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula de madera pequeña, para raspar suavemente el exterior del cuello uterino, con el fin de recoger células. Éstas son examinadas en el laboratorio para dar un resultado, que debe de ser leído por un médico de manera oportuna. Generalmente en México, los resultados de estos exámenes llegan a ser

entregados después del mes, en el mejor de los casos; lo que hace que la prueba pierda cierta efectividad en la prevención del cáncer cervicouterino.

2.5 LEUCEMIA.

Es la producción descontrolada de leucocitos que es debida a mutaciones cancerosas de una célula mielógena o linfógena. Que suele caracterizarse por un número mucho mayor de leucocitos anormales en la sangre circulante.

2.5.1 Tipos de leucemia.

a) Leucemias linfocíticas.

Se deben a la producción cancerosa de células linfoides¹⁷, que habitualmente comienzan en un ganglio linfático u otro tejido linfático y se extienden a otras zonas del cuerpo.

b) Leucemia mieloide.

Comienza por la producción cancerosa de células mielógena jóvenes en la medula ósea (Fig. 6) y después se extiende por todo el cuerpo de manera que los leucocitos se producen en muchos tejidos extramedulares, en especial en los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado.

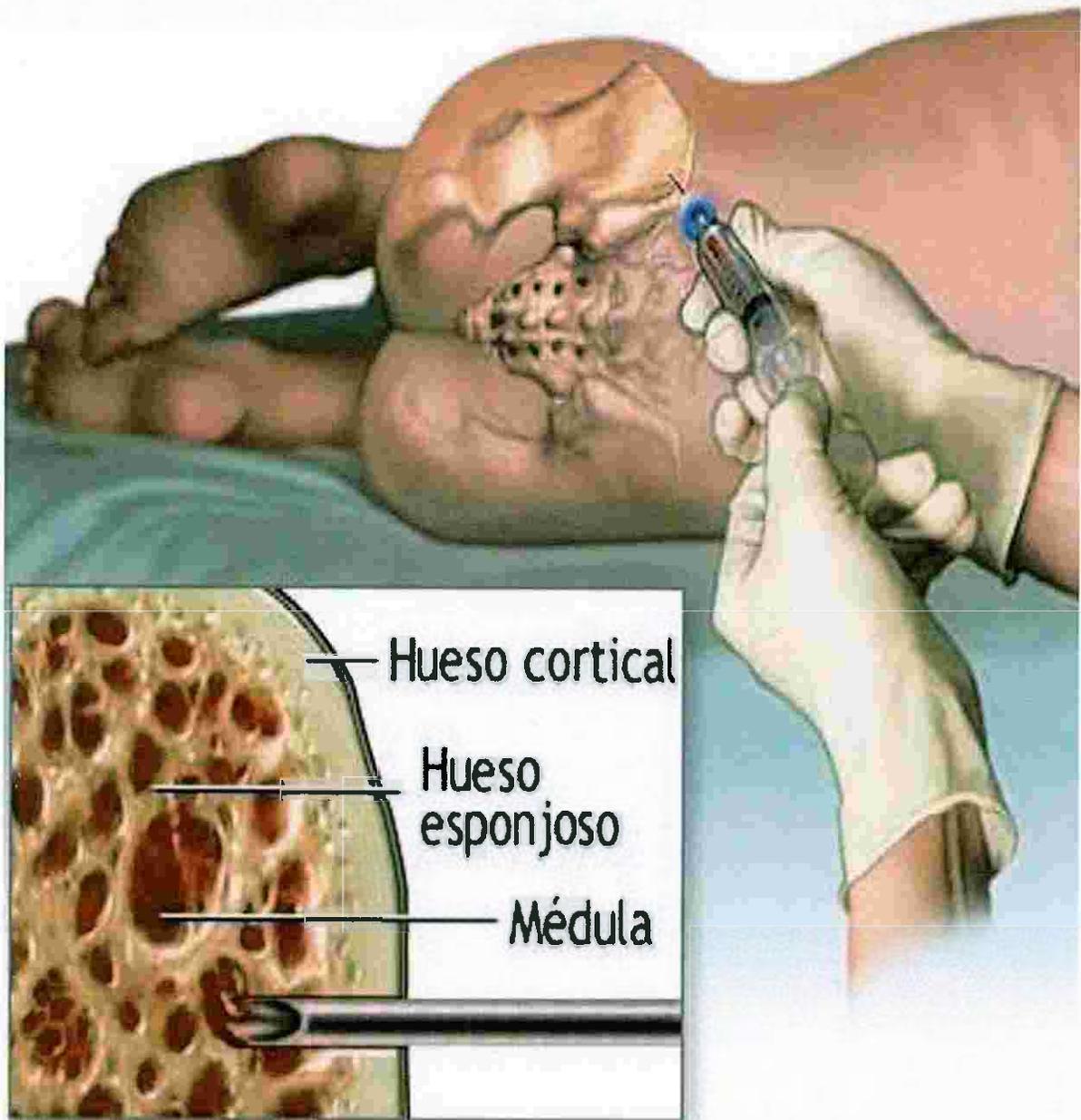


Figura 6. Biopsia de células de la medula ósea.

CAPITULO III DIFERENCIA ENTRE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN Y LAS TECNICAS ACTUALES.

3.1 DENSITOMETRÍA.

Existen distintas técnicas para valorar la masa ósea y todas ellas implican la irradiación del paciente. Una de las técnicas es la tomografía computada que también estudia al hueso en tres dimensiones pero aún no se sabe que tan bueno es este método para predecir fracturas, tiende a sobre-diagnosticar y es más costoso. Se utiliza también ultrasonido cuantitativo pero aún no se ha definido correctamente qué evalúa.

Hay otros métodos llamados periféricos que estudian muñecas y tobillos irradiando menos al paciente. Estos métodos tienen limitaciones, falta uniformar criterios para el diagnóstico.

Ya sea que se utilice un método que irradie al paciente o uno periférico, el estudio debe completarse con radiografías para detectar factores de error y con pruebas de laboratorio. Por lo tanto, es importante contar con un método complementario no invasivo y que no someta al paciente a dosis de radiación.

3.2 TECNICA DE RADIOGRAFIA INTRAORAL.

La película se coloca por porlatino/lingual de los dientes, de ahí su denominación retroalveolar permitiendo el registro del diente en su totalidad y del alveolo óseo vecino.

Se realizan con tres técnicas.

a) Técnica de la bisectriz

Es la más conocida, en ella se hace pasar el rayo central a través del ápice del diente y que incida perpendicularmente a la bisectriz¹⁸ del ángulo formado por superficie de la película y del eje longitudinal del diente, con lo que este queda representado a escala real.

b) Técnica paralela.

Consiste en colocar la película paralelamente al eje del diente valiéndose para ello de un soporte o paralelizador.

El rayo central atraviesa perpendicularmente el eje mayor del diente por su zona media y llega también perpendicularmente a la placa, por la mitad de la longitud del diente.

a) Técnica del ángulo recto.

La película se coloca en un soporte que se une firmemente a la carcasa, en ángulo recto. El rayo central incidirá entre las raíces de los dos premolares.

3.3 DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA POR MAMOGRAFÍA.

Es la técnica radiológica¹⁹ de estudio de la glándula mamaria. El objetivo de la exploración es diferenciar con claridad los tejidos fibrosos. Glandular y adiposo (grasa) de la mama. Normalmente, las dos radiografías que se realizan de cada una de las mamas son la oblicua medio lateral (proyección básica) y la craneocaudal (proyección complementaria).

En radiología mamaria se utilizan técnicas de bajo voltaje (25-30 KV) por que las radiaciones menos energéticas muestran mas diferencias de absorción entre la grasa y los tejidos blandos. No obstante al reducirse el kilo voltaje disminuye el poder de penetración del haz de radiación y, por consiguiente, se hace necesario un aumento de la exposición

3.4 DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA POR LA TECNICA ESPECTROSCOPIA RAMAN.

En la actualidad, el cáncer es un problema de salud que aqueja a la ciudadanía en general y existen diferentes técnicas para su detección, sin embargo, el resultado definitivo lo define el estudio patológico de una biopsia extraída. La necesidad de reducir el número de biopsias de tejido benigno junto con la mala experiencia que le queda al paciente y los altos costos médicos que

implican, han motivado a investigadores a explorar técnicas espectroscópicas para mejorar el diagnóstico del cáncer de mama. Y que esta técnica pueda diferenciar lesiones benignas de malignas y así poder explotar al máximo esta novedosa y muy útil técnica. (Fig. 7)

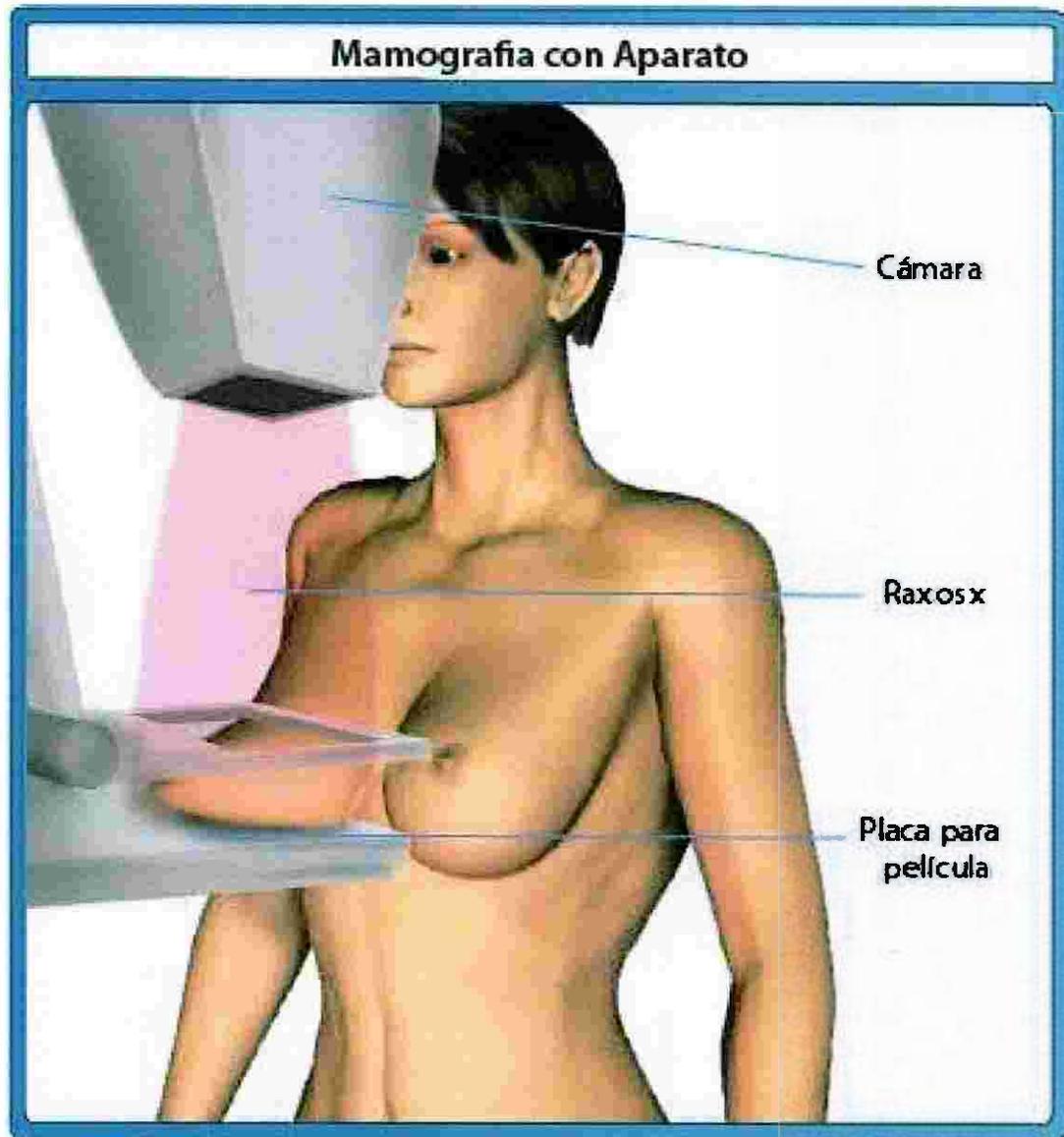


Figura 7. Análisis de la mama por mamografía

Para esto existe una técnica llamada espectroscopia Raman que consisten en diferenciar los tipos generales de células malignas se muestran en cambios específicos en la cantidad y/o conformación de los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos. La espectroscopia Raman nos permitirá encontrar estos cambios a través de las variaciones estructurales de los picos del espectro, que corresponden a vibraciones moleculares específicas de los componentes mencionados. Así, esta técnica proporciona información detallada de la composición química de un tejido a nivel molecular, lo que lo convierte en una herramienta clínica muy prometedora para el diagnóstico de una variedad de patologías, mediante un simple análisis de sangre.

3.5 PAPANICOLAOU.

Es una prueba que realiza el ginecólogo para saber precozmente si la mujer corre peligro de padecer cáncer de matriz. Para ello tomara un pequeña muestra (un raspadito indoloro) de la mucosa al fondo de la vagina y lo mandara analizar para saber si las células son normales o anormales²⁰, unos días más tarde se dará el resultado.

En el peor de los casos, si hay alguna anomalía, esto permite tratamientos curativos a tiempo, por que de otro modo la enfermedad puede progresar sin síntomas, extenderse por el cuerpo y percatarnos cuando sea demasiado tarde. El Papanicolaou se lo deben de realizar todas las mujeres a partir de cuándo tienen relaciones sexuales (tenga la edad que tenga) por lo menos una vez al año.

3.6 ANÁLISIS DE SANGRE

Después de que se extrae una muestra de sangre en el consultorio del médico para analizarla, los resultados de los análisis en el laboratorio no se hacen esperar. Los médicos dependen de estas pruebas de laboratorio para diagnosticar y observar el desarrollo de las enfermedades que pueda presentar el paciente. Algunos análisis miden los componentes y funciones de la sangre en sí; otros

analizan las sustancias en la sangre para determinar como están funcionando otros órganos. (Fig. 8)

El análisis más común es el conteo de la sangre, que no es más que una evaluación básica de los componentes celulares en la sangre. Máquinas automáticas que han sido diseñadas especialmente para esta función realizan esta prueba en un minuto (aproximadamente), a partir de una sola gota de sangre. Además de determinar el número de células sanguíneas y plaquetas, el porcentaje de cada tipo de célula sanguínea y el contenido de hemoglobina. Este análisis de conteo de células sanguíneas toma en consideración el tamaño y la forma de los glóbulos rojos. Si estos son anormales, pueden estar fragmentados o adoptar la forma de lágrimas o agujas. El identificar exactamente el tamaño y forma de los glóbulos rojos puede ayudar al médico a diagnosticar una condición: desde una deficiencia de hierro (anemia causada por la deficiencia de hierro en la hemoglobina) hasta una deficiencia de ácido fólico o vitamina B-12 (anemia perniciosa).



Figura 8. Equipo Raman para el estudio del cáncer de mama.

CAPITULO IV TENDENCIAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN ANALISIS CLINICO A CORTO Y A LARGO PLAZO

4.1 PERSPECTIVAS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopia Raman ofrece varias ventajas para el análisis microscópico. Dado que se trata de una técnica de dispersión, las muestras no necesitan ser fijadas o seccionadas. Los espectros Raman pueden ser obtenidos a partir de un volumen muy bajo ($<1 \mu\text{m}$ de diámetro); estos espectros permiten la identificación de especies presentes en ese volumen. El agua no interfiere de manera apreciable. Por lo tanto, la espectroscopia Raman es adecuada para el examen microscópico de minerales, materiales como cerámica, polímeros, células y proteínas. Un microscopio Raman consiste de un microscopio óptico estándar con un láser de excitación, un monocromador y un detector sensible (como un dispositivo de carga acoplada (CCD), o un tubo fotomultiplicador (PMT).

En visualización directa, todo el campo de visión se examina por dispersión sobre una pequeña gama de números de onda (turnos Raman). Por ejemplo, un número de onda característico para el colesterol podría ser utilizado para registrar una distribución de colesterol en un cultivo celular usando una caja petri.

El otro enfoque es la visualización hiperespectral o las imágenes químicas, en las que miles de espectros Raman son adquiridos por todo el campo de visión. Los datos pueden ser utilizados para generar imágenes que muestran la ubicación y la cantidad de distintos componentes. Tomando el ejemplo del cultivo celular, una imagen hiperespectral podría mostrar la distribución de colesterol, así como de proteínas, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Las técnicas sofisticadas de procesamiento de imágenes y señales pueden utilizarse para ignorar la presencia de agua, los medios de cultivo y otros interferentes que participan como parte del estudio.

La microscopía Raman y en particular, la microscopía confocal²¹, disponen de una resolución espacial muy alta. Por ejemplo, las resoluciones laterales y de profundidad son de 250 nm y 1,7 μm , respectivamente, utilizando un micro espectrómetro con focal Raman con la línea de 632,8 nm de un láser de Helio-Neon (láser que emite en el rojo) con una abertura de 100 μm de diámetro.

Dado que las lentes objetivo de los microscopios enfocan el rayo láser a varios micrómetros de diámetro, el resultado del flujo de fotones es mucho mayor que los que se logran en las configuraciones Raman convencionales. Esto tiene el beneficio añadido de una mayor desactivación de la fluorescencia. Sin embargo, el alto flujo de fotones también puede causar la degradación de la muestra, y por esta razón algunas configuraciones requieren un sustrato que conduzca térmicamente (lo que actúa como un disipador de calor) a fin de mitigar este proceso.

Mediante el uso de la micro espectrometría Raman, se pueden medir los espectros Raman, que son resultados en vivo en el tiempo y el espacio, de regiones microscópicas de la muestra. Como resultado de esto, puede eliminarse la fluorescencia del agua, el medio y los intermediarios. En consecuencia, este tipo de espectrometría es apropiada para examinar proteínas, células y órganos.

Para muestras biológicas y médicas, la microscopía Raman generalmente utiliza láseres de infrarrojo cercano (laser diodos de 785 nm y 1064 nm). Esto reduce el riesgo de dañar la muestra mediante la aplicación de alta potencia. Sin embargo, la intensidad del Raman en infrarrojo cercano es baja (debido a la dependencia ω^{-4} de la intensidad de dispersión Raman), y la mayoría de detectores requieren mucho tiempo de registro. En la actualidad se dispone de detectores más sensibles, por lo que esta técnica es apropiada para uso general. La microscopía Raman de muestras inorgánicas, tales como rocas, cerámicas y polímeros, puede utilizar una gama más amplia de longitudes de onda de excitación.

4.2 ANÁLISIS RAMAN POLARIZADO

La polarización de la luz dispersada Raman también contiene información útil. Esta propiedad puede medirse utilizando un láser de excitación polarizado y un analizador de polarización. Los espectros adquiridos con el analizador, tanto en perpendicular como en paralelo al plano de excitación, pueden ser utilizados para calcular el coeficiente de despolarización. El estudio de la técnica es pedagógicamente útil en la enseñanza de las conexiones entre la teoría de grupos, la simetría, la actividad Raman y los picos en el espectro Raman correspondiente.

La información espectral que se deriva de este análisis da una idea sobre la orientación molecular y la simetría vibracional. En esencia, permite al usuario obtener valiosa información relativa a la forma molecular, por ejemplo, en química sintética o análisis polimórfico. A menudo se utiliza para entender la orientación macromolecular en entramados cristalinos, cristales líquidos o muestras de polímeros.

4.3 VARIACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Se han desarrollado diversas variaciones de la espectrometría Raman. El propósito habitual es aumentar la sensibilidad (por ejemplo, una mayor superficie Raman), esto se usa para mejorar la resolución espacial (microscopía Raman).

* Espectrometría Raman de superficie mejorada (SERS). Normalmente se hace en un coloide de plata o de oro, o en un sustrato que contiene plata u oro. Los plasmones de superficie de plata y oro son excitados por el láser, lo que resulta en un aumento en los campos eléctricos que rodean el metal. Teniendo en cuenta que las intensidades Raman son proporcionales a la intensidad del campo eléctrico, hay un gran aumento de la señal medida (de hasta 10 y 11 N/C=newton/coulombio). Este efecto fue observado por Fleischman²², pero siempre prevaleció la explicación propuesta por Van Duyne²³ en 1977.

* Hiper-Raman, un efecto no lineal en el que los modos vibracionales

interactúan con el segundo armónico del haz de excitación. Para ello se requiere una potencia muy alta, pero permite la observación de los modos vibracionales que son normalmente "silenciosos". A menudo se basa en una potenciación de tipo SERS.

* Espectrometría Raman de resonancia, la longitud de onda de excitación es equivalente a una transición electrónica de la molécula o cristal, a fin de que los modos vibracionales asociados con el estado electrónico excitado se vean muy potenciados. Esto es útil para el estudio de moléculas grandes, como los polipéptidos, que pueden mostrar cientos de bandas en los espectros Raman "convencionales". También es útil para asociar los modos normales con sus cambios de frecuencia esperados.

* Espectrometría Raman espontánea. Utilizada para el estudio de la dependencia a la temperatura de los espectros Raman de las moléculas.

* Espectrometría Raman de pinzas ópticas (OTRS) (Fig. 9). Se utiliza para estudiar partículas individuales, e incluso procesos bioquímicos en células individuales atrapadas por pinzas ópticas.

* Espectrometría Raman estimulada, un pulso de dos colores transfiere la población desde el estado basal a un estado excitado rovibracional, si la diferencia de energía se corresponde a una transición Raman permitida. Dos fotones de ionización ultravioleta, aplicados después de la transferencia de población (pero antes de la relajación), permite registrar el espectro Raman.

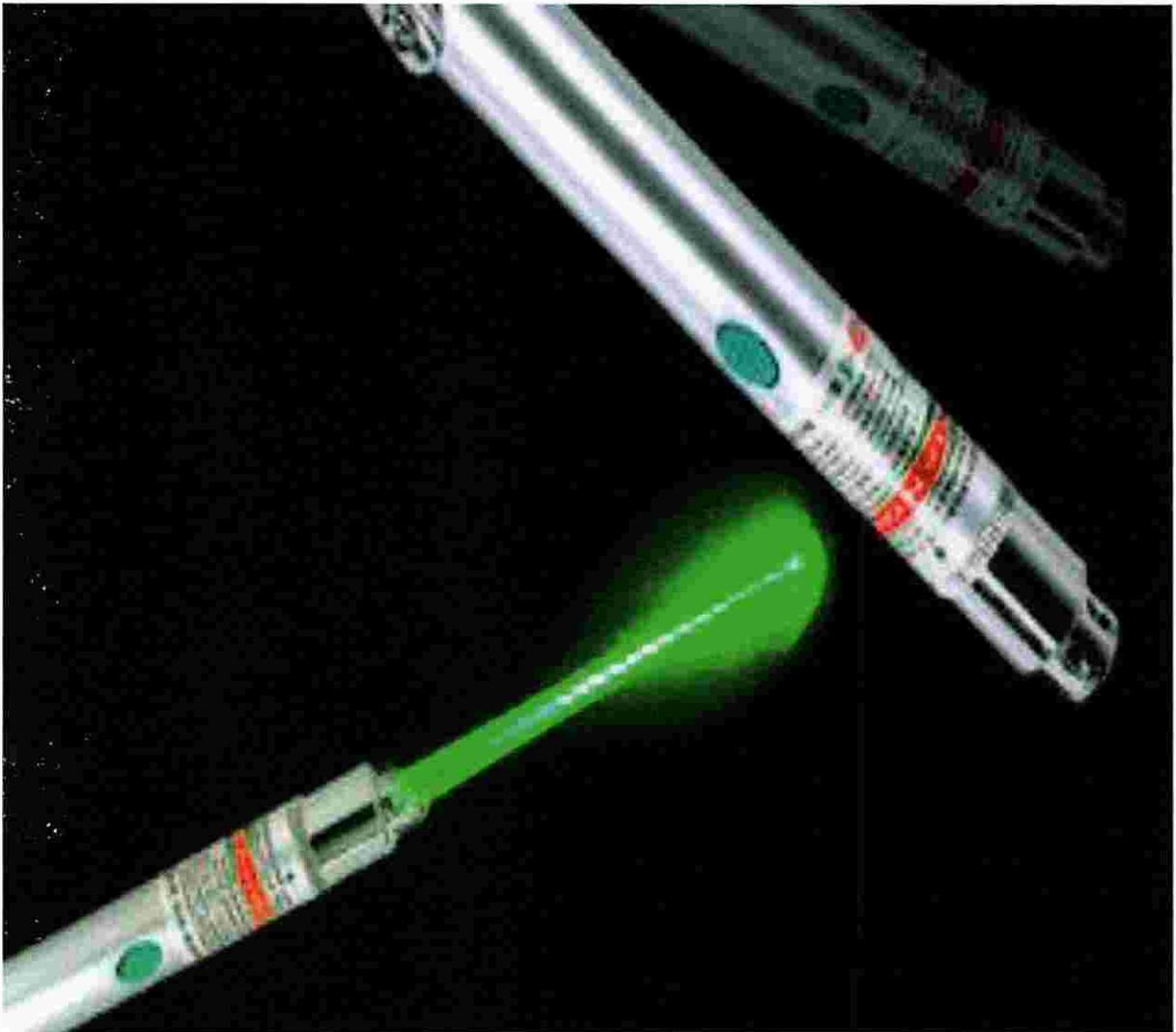


Figura 9. Pinzas ópticas láser, para manipular átomos y partículas.

4.4 APLICACIONES ACTUALES DE LAS RAMAN PINZAS.

El potencial de Raman pinzas es asombroso. La técnica tiene todas las promesas de espectroscopia Raman, incluido el potencial de identificar casi cualquier molécula biológica y la enfermedad, y añade que a la vez un mayor nivel de control y capacidad analítica, así como la capacidad de observación de una muestra en su estado natural. Como tal, Raman pinzas es probable que supere la espectroscopia Raman en el uso de análisis biológico.

Hasta la fecha, sólo un puñado de moléculas biológicas y procesos, incluidos los glóbulos rojos de la sangre, las lipoproteínas, componentes de la membrana celular y activación de las células T, se han estudiado con pinzas Raman.

Raman pinzas también ha sido empleada en el estudio de la enfermedad no sólo en la identificación de bacterias patógenas, las esporas que discierne, sino también en las células infectadas por virus. Por lo tanto, aunque Raman pinzas aún no puede ir acompañada de fibra óptica a la alimentación humana *en el tejido vivo* de análisis, su capacidad para manipular una muestra físicamente sin que entren en contacto con ella ha permitido un cierto grado de análisis detallado que no es posible con espectroscopia Raman sólo.

4.5 FUTURAS APLICACIONES DE RAMAN PINZAS.

Es probable que en un futuro no muy lejano, que esta tecnología permitirá a los científicos a ir más allá de su actual capacidad de distinguir células de las células sanas para poder distinguir entre distintas células infectada. Dada una detallada biblioteca de espectros, un investigador podría incluso ser capaz de caracterizar un desconocido virus de la estructura, componentes, y lítico o estado latente de la infección. Por otra parte, la técnica de pinzas ópticas que permitirá el estudio de las más temperamentales líneas celulares, tales como 293, que mueren con más facilidad al contacto físico. Todas estas capacidades analíticas darían al virólogo un compromiso mucho más claro para estudiar los virus.

CONCLUSIONES

La espectroscopia Raman es una técnica que detecta enlaces vibracionales, tanto en química orgánica como en química inorgánica. Por lo tanto se ha extendido a la caracterización de tejido vivo estudiado por los procesos biológicos y anatómicos de los investigadores médicos. En la actualidad las técnicas de identificación celular, bacterial y de virus requieren de estudios más profundos, rápidos y no invasivos para brindarle comodidad al paciente al momento de la detección de la enfermedad.

La espectrometría Raman ofrece varias ventajas ya que a partir de volúmenes menores de 1 μm^3 permite la identificación de especies presentes en ese micro volumen de muestra. Con esto es posible detectar la distribución de colesterol, así como de proteínas, ácidos nucleicos y ácidos grasos.

Hoy en día esta técnica espectroscópica marca la tendencia y los retos que los químicos biólogos clínicos deben adoptar para facilitar y detectar a tiempo las enfermedades, dejando atrás las técnicas convencionales que requieren de tiempos considerables para obtener los resultados.

En un futuro no lejano Raman pinzas es probable que supere la espectroscopia Raman en el uso de análisis biológicos. Ya que la capacidad para manipular una muestra físicamente, sin que entre en contacto con ella ha permitido un cierto grado de análisis detallado que no es posible hacerlo con espectroscopia Raman.

BIBLIOGRAFIA.

1. A. Skoog, S. R. Crouch, F. J. Holler, "Principios de Análisis Instrumental" Editores Lengage learning, 6ta edición, 2008, Pág. 493-495.
2. R. Ávila Rodríguez, I. Compeán Martínez, M. B. Silva Cázares, J. González Contreras. "Utilización de la Espectroscopia Raman para Caracterización de Displasias Provenientes del Cuello Uterino." Ed. Eumed.net, Tlatemoani, Revista Académica de Investigación. 2012, N° 10, Pag. 10.
3. J. P. Lambert, A. G. Whitman, O. F. Dyson and S. M. Akula "Espectroscopia Raman la Puerta de Entrada de Mañana en Virología" Virology Journal, 2006, 3:51-51
4. P. Carmona, E. Monleón, M. Monzón, J.J. Badiola, J. Monreal, "Raman Analysis of Prion in Blood Cell Membranes from Naturally Affected Scrapie Sheep". Chemistry & Biology, volume 11, Issue 6, June 2004, Pages 754-759.
5. J. Griffith "Raman Spectroscopy Promises to Detect Ailments such as Cancer and Osteoporosis" Analytical Chemistry, American Chemical Society, June 1, 2007, Pages 3975-3978.
6. R. Eisberg, R. Resnick, "Física Cuántica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos y partículas." Ed. Limusa-Wiley, 1992. Pag. 55, ISBN: 13-978-968-18-0419-0.
7. M. E. Flores, J. E. Figueroa, "Física Moderna" Ed. Pearson-Prentice Hall, 2007, pag. 173, ISBN: 978-970-26-0789-2.
8. K. Nakamoto "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compound Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry" 5ta edition. John Wiley & Sons, Inc. 1997. pag.6, ISBN0-471-16394-5,
9. J. Fernández, F. Cussó, R. González y J. García Solé, "Láseres Sintonizables de Estado Sólido y Aplicaciones". Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid, 1989, pag. 11, ISBN: 84-7447-239-7.
10. I. Ricardez, E. Orozco, J. Hernández. "Pinzas Ópticas, una Herramienta Eficaz para Micro manipulación" Faraute Ciens. y Tec., 3(1): 25-30, 2008. Pag. 27.
11. A. Ashkin "Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles Using Lasers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 4853-4860.
12. S. Bellucci, L. L. Blumetti, J. C. Cortes y col. "Remington Farmacia" ed. Médica Panamericana, 2003, pg. 721, ISBN: 950-06-1866-4.

13. A. Van, P. Abizanda, C. Alastuey y Col. "Tratado de Geriatria para Residentes" Ed. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. 2006. Pag. 711, ISBN: 84-689-894-5.
14. Edwina A. M. Kidd, "Essentials of Dental Caries" Third Edition, Ed. Oxford. 2005. Pag 3, ISBN: 019852978-3.
15. J. Robles-Castillo, E. Rubalcaba-Limón, A. Maffuz, S. Rodríguez-Cuevas, "Cáncer de Mama en Mujeres Mexicanas de 40 Años" Revista Ginecol. Obstet Mex. 2011:79(8) 482-488.
16. J. Ramírez-Aguilera, M. P. Díaz Monry, C. E. Yerena-Aguilar, R. Ortiz-López, "Prevalencia de Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo 52 y 66, en Muestras Endocervicales de Población Químicamente Sana con Papanicolaou Normal de la Ciudad de Jalapa, Ver. Mex." Bioquimia, Vol. 34. Num. 1. 2009. Pag. 101.
17. P. J. Delves, M. J. Seamus, D. R. Burto, I. M. Roitt, "Inmunología Fundamentos" 11ª Edición. Ed. Médica Panamericana. 2006. Pag. 441, ISBN: 978-950-06-0899-2.
18. C. Diez Cubas, "Radiología Oral para Dentistas e Higienistas de la Sanidad Pública" Ed. Visión-net. 2008. Pag.35. ISBN:84-9828-195-6.
19. Debra M. Ikeda, "Radiología de Mama" Edit. Elsevier-Mosby. 2005. Pag. 1. ISBN: 8480867396.
20. C. Lacruz, I. J. Fariña, "Citología Ginecológica: de Papanicolaou a Bethesda". Ed. Complutense. 2003. Pag. 197. ISBN: 84-7491-717-4.
21. A. J. Vázquez Vaamonde, J. J. De Damborenea González. "Ciencias y Ingeniería de la Superficie de los Materiales Metálicos". Ed. CSIC. 2001. Pag. 567. ISBN: 84-00-07920-5.
22. G. Aruldinas, "Molecular Structure and Spectroscopy" Edit. PHI, 2007, Pag. 371. ISBN: 978-81-203-3215-7.
23. S. Kawata, V. M. Shalaev. "Tip Enhancement" Edit. Elsevier, 2007. Pag. 31. ISBN-13: 978-0-444-52058-6.