

Caracterização molecular e bioquímica de lesões de tireoide

Biochemical and Molecular characteristics of thyroid lesions

Lazaro Pinto Medeiros Neto¹
 Airton Abraão Martin²
 Renata de Azevedo Canevari³
 Evandro Sobroza de Mello⁴
 Marina Alessandra Pereira⁵
 Claudio Roberto Cernea⁶
 Lenine Gargia Brandao⁷
 Andre Bandiera de Oliveira Santos⁸

RESUMO

Introdução: O diagnóstico óptico através da espectroscopia Raman é amplamente utilizado na indústria para estudo de composição de materiais e recentemente foi introduzido em análises de tecidos biológicos. É possível a caracterização de lesões através de alterações bioquímicas identificadas precocemente às alterações morfológicas. **Objetivo:** caracterizar e diferenciar tecidos normais de tumorais da tireoide pela técnica de espectroscopia Raman confocal. **Método:** Um total de 21 espectros de tecido de tireoide, sendo 8 normais e 13 tumorais (carcinoma papilífero), foram obtidos pela técnica de espectroscopia Raman confocal e processados pelos softwares Matlab 6.1, Origin 8.6 e OPUS[®]. A análise estatística para a separação das amostras baseados nas características bioquímicas de cada grupo foi realizada pelo programa Minitab[®]. **Resultados:** um importante aumento de intensidade de alguns modos vibracionais foi verificado nos espectros de câncer em relação ao normal. A análise multivariada possibilitou diferenciação de 100% para tecidos normais e de 84,6% para tumorais, o que equivale a uma proporção discriminante de 90,5%. **Conclusão:** A técnica de espectroscopia Raman se mostrou eficiente na detecção de alterações bioquímicas das lesões de tireoide e na diferenciação entre os tecidos.

Descritores: Glândula Tireoide; Análise Espectral Raman; Diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: Optical diagnostics by Raman spectroscopy is widely used in the industry to study material composition. Recently it has been introduced for the analysis of biological tissue. It is possible to characterize lesions through biochemical alterations identifying early morphological alterations. **Objective:** To characterize and differentiate normal tissue from thyroid cancer by confocal Raman spectroscopy. **Method:** A total of 21 spectra of tissue thyroid, 8 normal and 13 tumor (papillary carcinoma) were obtained by confocal Raman spectroscopy and processed by the software Matlab 6.1, Origin 8.6 and OPUS[®]. Statistical analysis for separating the biochemical characteristics based on samples from each group was performed by Minitab[®]. **Results:** A significant increase in intensity of some vibrational modes were observed in the spectra of cancer compared to normal. The multivariate analysis allowed differentiation of 100% of normal tissues 100% and 84.6% of the tumors, which corresponds to a discriminant ratio of 90.5%. **Conclusion:** Raman spectroscopy proved efficient in detecting biochemical thyroid lesions and differentiation between tissues.

Key words: Thyroid Nodule; Spectrum Analysis, Raman; Diagnosis.

INTRODUÇÃO

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica que utiliza uma luz laser para analisar a composição bioquímica de tecidos biológicos, com a finalidade de promover um diagnóstico óptico^{1,2}. Esse conhecimento teve início em 1928 com o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, que relatou pela primeira vez a existência de uma

radiação secundária da interação da luz com a matéria. Esta técnica passou a ser muito utilizada na indústria, porém somente há algumas décadas a técnica passou a ser aplicada a estudos envolvendo tecidos biológicos³⁻¹³.

O efeito Raman se dá pela excitação das moléculas do material pela incidência de um laser. No caso de tecidos biológicos, isso se dá normalmente no comprimento de onda de 785 nm, determinado por conseguir manter

1) Pós-graduando pela Universidade do Vale do Paraíba.

2) Professor Livre docente, coordenador do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba.

3) Professora Doutora da Universidade do Vale do Paraíba.

4) Professor Doutor do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo. Coordenador do Serviço de Patologia do ICESP - FMUSP.

5) Pesquisadora do Serviço de Patologia do ICESP - FMUSP.

6) Professor livre docente pela FMUSP, Professor Associado do Departamento de Cirurgia da FMUSP. Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP.

7) Professor Titular e Chefe da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP / ICESP-FMUSP.

8) Doutor em Ciências pela FMUSP. Médico assistente do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do ICESP-FMUSP.

Instituição: UNIVAP ICESP
 São Paulo / SP - Brasil.

Correspondência: Andre Bandiera de Oliveira Santos - Avenida Brigadeiro Luis Antonio, 4237 - São Paulo / SP - Brasil - CEP: 01401-002 - Telefone: (+55 11) 3887-5596 - E-mail: andre_bandiera@yahoo.com.br

Artigo recebido em 30/07/2013; aceite para publicação em 25/11/2013; publicado online em 23/12/2013.

Conflito de interesse: não há. Fonte de fomento: não há.

a integridade das células, sobre o material. No efeito Raman a frequência do fóton espalhado não é a mesma do fóton incidido (espalhamento inelástico), demonstrando que houve interação da energia do fóton com as moléculas do material, sendo a diferença entre a energia incidente e a espalhada a responsável pela vibração das moléculas. Esses sinais são captados por um detector CCD (*charge-coupled device*), em seguida processados, transformando o sinal coletado em espectros Raman, que se baseiam na intensidade da radiação espalhada em função de sua energia, que é dada na unidade de comprimento de onda ou cm^{-1} (14, 15).

A espectroscopia Raman foi estudada em alguns tipos de câncer e considerada eficaz na diferenciação de neoplasias, pela capacidade de analisar os componentes bioquímicos de diversos tecidos biológicos. Em alguns casos isso foi possível em tempo real e em técnicas minimamente invasivas⁽¹⁶⁻²⁴⁾.

Em um estudo prévio do nosso grupo, Teixeira et al⁽²¹⁾ analisaram uma série de tecidos de tireoide, incluindo amostras de carcinoma papilífero de tireoide, carcinoma folicular de tireoide, bócio e tecido normal de tireoide, em que foi possível realizar uma análise discriminante dos diversos tipos de tecidos analisados e um percentual de diferenciação de 72,5% entre os tecidos benignos e malignos. Este resultado demonstrou que a espectroscopia Raman é uma técnica que pode ser aplicada na análise de alterações de tecidos tireoideanos. Embora a técnica tenha apresentado um resultado importante, o percentual de diferenciação ficou abaixo do ideal. Isso pode estar relacionado com o fato de que a leitura da lâmina histológica foi realizada como um todo, enquanto a espectroscopia Raman faz sua leitura em pontos específicos de incidência do laser. Assim, neste trabalho, propomos um refinamento da metodologia empregada anteriormente, com a obtenção de tecido homogêneo a partir das amostras e a leitura histológica realizada especificamente no local da análise pela espectroscopia Raman confocal.

Portanto, o objetivo do estudo é caracterizar e diferenciar tecidos normais de tumorais da tireoide pela técnica de espectroscopia Raman confocal.

MÉTODO

Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o número 221.402/CEP/2013 que segue a resolução CNS/MS 196/96. As amostras dos tecidos da tireoide foram dissecadas para obtenção de tecido homogêneo conforme protocolo institucional, sendo 3 de tireoide normal e 5 de carcinoma papilífero.

As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos Nalgene® a -80°C , e para análise espectral, foram cortadas em uma espessura de $10\mu\text{m}$ no aparelho Leica® Modelo CM 1100. Os cortes do tecido foram colocados sobre lâminas de CaF₂ (fluoreto de cálcio), utilizadas por não possuírem sinais espectrais.

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi o espectrômetro Raman confocal modelo 3510 (Holan-

da). Para a excitação das amostras, utilizou-se o laser de 785nm, cuja potência foi de 20 mW. O sinal Raman foi coletado por um detector CCD. As amostras em lâminas de CaF₂ foram mantidas sobre refrigeração sendo retiradas somente no momento da análise Raman. As regiões onde foram feitas as obtenções dos espectros foram marcadas com lápis dermatográfico, garantindo que a análise histopatológica fosse realizada no mesmo local.

Os dados foram submetidos a tratamentos espectrais, sendo a subtração da fluorescência realizada pelo ajuste de uma curva polinomial através de uma rotina do *software* Matlab 6.1 e a normalização vetorial, realizada através do *software* OPUS®. Para a análise estatística, foi realizado a obtenção dos espectros médios de cada grupo, Normal e Carcinoma papilífero de tireoide (CPT), e em seguida, analisados utilizando-se o programa OriginPro 8 (OriginLAB).

Para a classificação dos espectros Raman, utilizamos a Análise de Componentes Principais (PCA), método matemático que separa as variáveis originais de um grupo de acordo com as suas semelhanças e métodos discriminativos como a análise de discriminante linear, por meio dos programas Minitab® e OPUS®.

Para a confirmação dos espectros coletados de cada região pelo Raman confocal foi realizada a análise histológica pontual do local de análise pelo método de coloração por hematoxilina-eosina (HE).

RESULTADOS

A Figura 1 apresenta os espectros médios de tecidos com CPT e tecido normal. Observam-se diferenças de intensidade no tecido tumoral em algumas regiões espectrais, mais especificamente nas regiões de: 1600 a 1500 cm^{-1} , 1380 a 1160 cm^{-1} , 1000 a 950 cm^{-1} , 800 a 700 cm^{-1} e de 450 a 400 cm^{-1} , e para o tecido normal, nas regiões de 1410 a 1380 cm^{-1} , 1070 a 1020 cm^{-1} , 950 a 800 cm^{-1} e 670 a 500 cm^{-1} , o que demonstra uma mudança na conformação bioquímica das moléculas para este tecido, permitindo diferenciação das lesões de tireoide (Tabela 1).

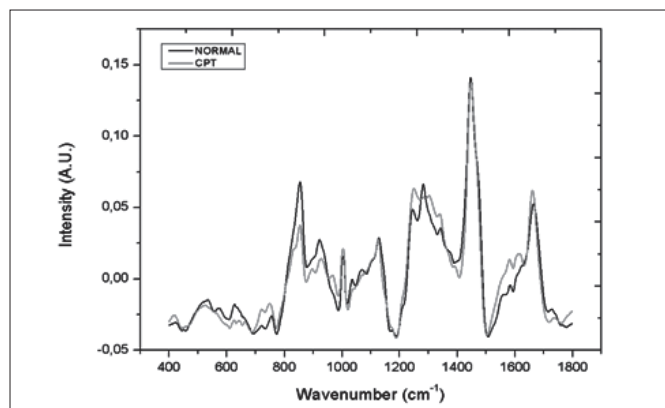


Figura 1. Espectro médio das amostras de tecido normal e câncer (CPT) de tireoide. Note que o traçado do gráfico é muito semelhante, mas permite diferenciação entre os comprimentos de onda, como por exemplo maior intensidade em 722 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} , correspondendo a DNA e RNA em tecidos tumorais, respectivamente

Tabela 1. Principais picos encontrados na comparação do tecido tumoral e tecido normal com suas respectivas atribuições.

TECIDO TUMORAL – CPT		
PICO	ATRIBUIÇÃO	REFERENCIA
1754 cm ⁻¹	C=O (lipídeos)	LAKSHIMI <i>et al.</i> , 2002
1620 cm ⁻¹	Triptofano, Triptofano e/ou β -sheet	CHENG <i>et al.</i> , 2005
1581 cm ⁻¹	C-C estiramento (*) □(C=C), Fenilalanina (**)	*NAUMANN, 1998 **HUANG <i>et al.</i> , 2003
1547 cm ⁻¹	Triptofano	STONE <i>et al.</i> , 2002, 2004
1370 cm ⁻¹	Banda de sacarídeo	KRAFFT <i>et al.</i> , 2005
1336 cm ⁻¹	Guanina	RUIZ-CHICA <i>et al.</i> , 2004
1305 cm ⁻¹	Deformação CH ₂ (lipídeo), adenina, citosina	STONE <i>et al.</i> , 2004
1230 cm ⁻¹	Vibração estiramento do Fosfato antissimétrico, Amida III (surge da junção do estiramento C-N e N-H <i>bonding</i>) pode ser misturado com vibrações de cadeias laterais	DUKOR, 2002
1208 cm ⁻¹	ν (C-C6H ₅), triptofano, fenilalanina (assinatura de proteína) (*) Triptofano (**) A, T (bases de DNA/RNA) - Amida III (proteína) (***)	*HUANG <i>et al.</i> , 2003 **CHENG <i>et al.</i> , 2005 ***CHAN <i>et al.</i> , 2006
1001 cm ⁻¹	Fenilalanina	MALINI <i>et al.</i> , 2006
980 cm ⁻¹	Vibração ribose, modos distintos de RNA	CHAN <i>et al.</i> , 2006
744 cm ⁻¹	T (modos de bases DNA/RNA)	CHAN <i>et al.</i> , 2006
722 cm ⁻¹	DNA	BINOY <i>et al.</i> , 2004
420 cm ⁻¹	Colesterol	KRAFFT <i>et al.</i> , 2005
TECIDO NORMAL		
PICOS	ATRIBUIÇÃO	REFERENCIA
1390 cm ⁻¹	Banda CH ₃	STONE <i>et al.</i> , 2004
1063 cm ⁻¹	C-C conformação aleatória - skeletal stretch	FAOLAIN <i>et al.</i> , 2005
1239 cm ⁻¹	Amide III	FAOLAIN <i>et al.</i> , 2005
1037 cm ⁻¹	Colágeno	ANDRUS e STRICKLAND, 1998
920 cm ⁻¹	C-C estiramento do anel de prolina/glicose/ácido láctico(*) C-C, anel pralina (assinatura do colágeno) (**)	*STONE <i>et al.</i> , 2002, 2004 ** CHAN <i>et al.</i> , 2006
902 cm ⁻¹	Monossacarídeos (β -glucose), (C-O-C) modo <i>skeletal</i> , Dissacarídeo (maltose)	SHETTY <i>et al.</i> , 2006
856 cm ⁻¹	Prolina, hidroxiprolina, tirosina, Aminoácido de cadeias laterais de prolina e hidroxiprolina, (C-C) vibração do colágeno <i>backbone</i> hidroxiprolina (colágeno tipo I) (*) Estiramento C-C, prolina (assinatura de colágeno) (**)	* CHENG <i>et al.</i> , 2005 **FRANK <i>et al.</i> , 1995
668 cm ⁻¹	C-S estiramento de cistina (colágeno tipo I) (*) T, G (DNA/RNA) (**)	* STONE <i>et al.</i> , 2002 * CHENG <i>et al.</i> , 2005 **NOTINGHER <i>et al.</i> , 2004
637 cm ⁻¹	ν (C-S) <i>gauche</i> (aminoácido metionina)	SHETTY <i>et al.</i> , 2006
580 cm ⁻¹	Fosfatidilinositol	KRAFFT <i>et al.</i> , 2005
535 cm ⁻¹	Colesterol éster	KRAFFT <i>et al.</i> , 2005

Fonte: *Raman Spectroscopy of Biological Tissues* (25).

A fim de promover a separação espectral para fins de diagnóstico, aplicou-se análise multivariada conhecida como Análise de componentes principais (PCA), que tem como fundamentação a separação dos dados espectrais em grupos por meio de grau de similaridade, permitindo assim que ocorra uma discriminação entre os espectros. A análise se baseou na comparação entre os dados de tecido normal com os de tecido tumoral, realizado em todo o intervalo espectral, onde valores próprios para

cada componente foi obtido, e são estes valores que determinam o grau de variação presente em cada componente (Tabela 2).

Após a análise dos dados pela PCA, foi realizada a discriminação dos espectros utilizando a análise de discriminante linear sobre os escores obtidos nos quatro primeiros PCAs dos tecidos tumorais e normais. Foram confrontados 8 espectros de tecido normal e 13 espectros de tecido tumoral, gerando um valor de 21 espectros

Tabela 2. *Eigenvalue* PCA da comparação entre tecido normal e tumoral.

Normal x CPT	Eigenvalue	Variabilidade	Acumulada
PC1	0,03647	68,5%	---
PC2	0,00875	16,4%	85%
PC3	0,00409	7,7%	92,7%
PC4	0,00167	3,1%	95,8%

a serem discriminados pela técnica. Os valores obtidos demonstram que houve uma excelente separação dos espectros de acordo com suas características comuns, onde foram discriminados corretamente 19 dos 21 espectros analisados chegando a um valor de 100% na diferenciação dos tecidos normais e de 84,6% para os espectros do tecido tumoral, o que garantiu uma proporção de discriminação entre os diferentes tecidos analisados de 90,5% (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Nesse trabalho está demonstrada a utilidade da espectroscopia Raman na discriminação do tecido tumoral e normal de tireoide. A análise bioquímica permitiu também a observação de maior quantidade de DNA e RNA em tecidos tumorais, assim como de aminoácidos como triptofano e fenilalanina.

As amostras desse projeto foram obtidas de modo a selecionar áreas de tecido tireoideano de modo mais homogêneo possível, classificadas pela histologia como normais e CPT, diminuindo a influência de outros tipos histológicos no material. O corte dos tecidos biológicos congelados pelo criomicrotomo evitou a presença de materiais contaminantes como, por exemplo, a parafina. A técnica micro Raman confocal com comprimento de onda em 785nm permitiu análise pontual sobre o tecido, analisado histologicamente no local de aplicação do laser, correlacionando as estruturas com os dados espectrais.

Baseado no conhecimento de que as alterações bioquímicas precedem alterações morfológicas, verificou-se por meio da média espectral de cada grupo, que o tecido tumoral apresentou diferenças de intensidade em relação ao tecido normal, mas manteve uma semelhança em picos característicos. Este fato permite afirmar que existem pequenas diferenças no tecido tumoral quando comparado ao tecido sadio.

Na figura 1, as principais regiões espectrais que sofreram alterações corroboram com as de outros estudos, como a região de amida I ($\cong 1600$ a 1700 cm^{-1})^(25,26) e amida III ($\cong 1200$ a 1400 cm^{-1})⁽²⁷⁾, moléculas componentes de proteínas, esperadas em neoplasias devido a intensa proliferação celular; e a região de DNA/RNA ($\cong 700$ a 850 cm^{-1})⁽²⁸⁾ explicada pela grande quantidade de material nuclear devido o aumento de mitoses. As regiões de amida I e amida III são consideradas as mais importantes na diferenciação de tecidos normais e tumorais

Tabela 3. Valores obtidos pela análise de discriminante linear

	Nº Amostras	Discriminadas	Proporção
Normal	8	8	100%
Tumoral	13	11	84,6%
Proporção			
Final Correta			90,5%

em outros trabalhos envolvendo espectroscopia Raman e neoplasias.^(10,29)

O espectro médio do tecido tumoral permitiu verificar a presença de certos componentes com intensidades aumentadas como o triptofano (1620 cm^{-1} , 1547 cm^{-1} , 1208 cm^{-1}), a fenilalanina (1208 cm^{-1} , 1001 cm^{-1}) e outros ácidos nucleicos (1336 cm^{-1} , 1305 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , 744 cm^{-1} , 722 cm^{-1}) e de componentes com baixas intensidades como fosfolipídeos (1390 cm^{-1} , 580 cm^{-1}) e prolina (920 cm^{-1} , 856 cm^{-1}) quando comparados com o espectro médio do tecido normal, semelhante a outros estudos⁽²⁹⁾, os quais sugerem que em tecidos tumorais observa-se uma mudança na intensidade destes componentes, com uma grande instabilidade das cadeias de lipídeos. A presença de hormônios no tecido tireoideano, possibilita a presença de lipídeos nos espectros normais e patológicos. Foi observada, porém, a presença de grande quantidade destes componentes em tecidos tumorais relacionada a metástases⁽³⁰⁾. O espectro de lipídeos esteve aumentado em CPT em nosso estudo (1754 cm^{-1} , 1305 cm^{-1}).

Outra importante ferramenta utilizada para discriminar os espectros obtidos é a análise de discriminante linear, cujo princípio é separar os dados em grupos e subgrupos, caso existam. Em nosso trabalho, a separação pela análise de discriminante linear, foi realizada entre dois grupos, normal e tumoral. Dos 21 espectros analisados, chegamos a um total de 100% de diferenciação para os espectros normais (8:8) e 84,6% para espectros tumorais (11:13), cujo valor de discriminação final equivale a 90,5%, demonstrando uma grande eficácia na diferenciação dos tipos teciduais. Este valor é superior ao estudo anterior de nosso grupo⁽²¹⁾, cuja análise multivariada mostrou um resultado de 70,5% de discriminação entre tecidos normais e tumorais.

Os valores de discriminação do presente estudo foi superior ao anterior, realizada pela técnica de espectroscopia Raman com transformada de Fourier (Raman-FT), devido a possibilidade da técnica Raman confocal aplicada neste estudo, permitir uma análise pontual do tecido, comparando a histologia do local analisado com os espectros Raman obtidos. E corroborando com outros pesquisadores⁽³¹⁾, nosso resultado apresentou uma excelente sensibilidade e especificidade na discriminação. Assim como para outros tipos de câncer, acreditamos que a espectroscopia Raman possa contribuir ao conhecimento do câncer da tireoide conforme evolui a técnica e suas aplicações.

CONCLUSÃO

A técnica de espectroscopia Raman confocal apresentou excelentes resultados na diferenciação entre tecidos normais e tumorais, mostrando ser uma técnica promissora. O percentual de discriminação alcançado foi superior ao previamente encontrado por nosso grupo. Foi caracterizada espectros característicos de tecido tumoral com aumento de DNA, RNA, triptofano e fenilalanina.

REFERENCIAS

- Koljenovic S, et al. Detection of Meningioma in Dura Mater by Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2005; 77(24):7958-7965.
- Harris AT, et al. Raman spectroscopy and advanced mathematical modeling in the discrimination of human thyroid cell lines. *Head & Neck Oncology*. 2009;1(38).
- Puppels GJ, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature*. 1990;347(6290):301-303.
- Puppels GJ, et al. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Experimental cell research*. 1991;195(2):361-367.
- Manoharan R, Wang Y, Feld MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta*. 1996;52: 215-249.
- Stone N, et al. Raman Spectroscopy for Early Detection of Laryngeal Malignancy: Preliminary Results. *The laryngoscope*. 2000;110(10): 1756-1763.
- Kujawa J, et al. Cell survival, DNA, and protein damage in B14 cells under low-intensity near-infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomedicine and laser surgery*. 2004;22(6):504-508.
- Chan JW, et al. Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophysical Journal*. 2006;90:648-656.
- Keller MD, et al. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. *Disease markers*. 2008;25(6):323-337.
- Harris AT, et al. Raman spectroscopy in head and neck cancer. *Head & Neck Oncology*. 2010;2(6):2-6.
- Kamemoto LE, et al. Near-Infrared Micro-Raman Spectroscopy for in Vitro Detection of Cervical Cancer. *Applied Spectroscopy*. 2010;64(3):255-261.
- Saha A, et al. Raman spectroscopy: a real-time tool for identifying microcalcifications during stereotactic breast core needle biopsies. *Biomedical optical express*. 2011;2(10):2792-2803.
- Leslie DG, et al. Identification of Pediatric Brain Neoplasms Using Raman Spectroscopy. *Pediatric Neurosurgery*. 2012;48:109-117.
- Hogiu SW, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy - from single cells to humans. *Current opinion in Biotechnology*. 2009;20(1):63-73.
- Brauchle E, Schenke-Layland K. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnology Journal*. 2013;8:288-297.
- Naumann D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2001;36(2-3):239-298.
- Nunes LO. Estudo do carcinoma basocelular ex vivo por espectroscopia FT-Raman. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.
- Bitar RA. Estudo de Tecido Mamário Humano por Espectroscopia FT-Raman. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.
- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43(134-179).
- Harris AT, et al. Raman spectroscopy and advanced mathematical modeling in the discrimination of human thyroid cell lines. *Head & Neck Oncology*. 2009;1(38).
- Teixeira CSB, et al. Thyroid tissue analysis through Raman spectroscopy. *Analyst*. 2009;134:2361-2370.
- Bergholt MS, et al. In vivo diagnosis of gastric cancer using Raman endoscopy and ant colony optimization techniques. *International Journal of Cancer*. 2010;128:2673-2680.
- Huang Z, et al. In Vitro Imaging of Thyroid Tissues Using Two-Photon Excited Fluorescence and Second Harmonic Generation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28(1):129-133.
- Lopes PC, et al. Discriminating adenocarcinoma from normal colonic mucosa through deconvolution of Raman spectra. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16.
- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2007;42:493-541.
- Ruchita SD, Agrawal YK. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*. 2011;57: 163-176.
- Liu KZ, et al. Infrared spectroscopy diagnosis of thyroid tumors. *Journal of Molecular Structure*, v. 661-662, p. 397-404, 2003.
- Jess PRT, et al. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *International Journal of Cancer*. 2007;121(12):2723-2728.
- Huang Z, et al. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2003;107:1047-1052.
- Le TT, Hull TB, Cheng JX. Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer*. 2009;9(42).
- Stone N, et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discussion*. 2004;126:141-157.