Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Journal of the Institute of Science and Technology

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisinin Prostat Kanseri Teşhisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Mevlüt ALBAYRAK[1]

ÖZET: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) yöntemi, organik ve bazı durumlarda inorganik materyalleri tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir. Bu teknik, dalga boyuna karşı numune tarafından absorblanan kızılötesi radyasyonu ölçemeye yarar. Kızılötesi absorpsiyon bantları ise molekülün bileşenleri ve yapıları hakkında bilgi verir. Prostat kanseri, erkeklerde spermi besleyen ve taşıyan seminal sıvıyı üreten, ceviz şekilli küçük bir bez olan prostatta meydana gelen bir kanserdir. Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Erken teşhis edilen prostat kanseri, prostat bezi ile sınırlı olduğu zaman tedavi şansı daha başarılı olur. Prostat kanseri tümörlerini sağlıklı hücrelerden ayırmak ve karakterize etmek için kemometrik yöntem destekli, iyi bir doğruluk ve hassasiyete sahip basit, ucuz ve hızlı yeni bir alternatif FT-IR yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için, histopatolojik ölçümlerle belirlenen hem kanser hem de sağlıklı hücreleri içeren parafin bloklardan 20 mikron kalınlığında kesildi, lam üzerine yerleştirildi ve deparafinize edildi. Hem sağlıklı (n = 10) hem de kanserli dokular (n = 10) 50-4000 cm^{-1} dalga boyu arasındaki kızılötesi ışığa maruz bırakıldı. 20 örneğe 50-4000 cm^{-1} arasındaki kızılötesi ışığa karşı davranışlarını saptamak için temel bileşenler analizi (Principle Component Analysis, PCA) ileri bir formu olan ortogonal kısmi en küçük kareler analiz (Ortogonal Partial Least Square, O-PLS) algoritması uygulandı. Elde edilen spektrumlar MATLAB software PLS Toolbox paket programında değerlendirildi. Kanserli ve sağlıklı hücreleri ayırmak için O-PLS analizi yapıldı. Önerilen yöntemin hassaslığı ve özgüllüğü, Ortogonal Sinyal Düzeltme (Orthogonal Signal Correction, OSC) ön işlem yöntemi yardımıyla çok yüksek olduğu görüldü. Sonuç olarak, parafin bloklardan prostat kanser teşhisi için alternatif bir FT-IR yöntemi geliştirildi ve başarıyla uygulandı.

Anahtar Kelimeler: FT-IR Spektroskopisi, kalitatif analiz, prostat kanseri, kanser teşhisi.

Investigation of the Usability of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Diagnosis of Prostate Cancer

ABSTRACT: Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR) is an analytical technique used to identify in organic and some cases inorganic materials. This technique measures the absorption of infrared radiation by the sample material versus wavelength. The infrared absorption bands identify molecular components and structures. Prostate cancer is cancer that occurs in the prostate a small walnut shaped gland in men that produces the seminal fluid that nourishes and transports sperm. Prostate cancer is one of the most common types of cancer in men. Prostate cancer that is detected early when it's still confined to the prostate gland has a better chance of successful treatment. It is aimed to develop a new alternative chemometrics assisted method to separate and characterize prostat cancer tumors from healthy cells by simple, cheap and rapid FT-IR method with good accuracy and sensitivity. In order to perform such a study paraffin embedded blocks including both cancer and healthy cells which are labelled by the histopathologic measurements were cut to 20 microns thick were located on a microscope slide and deparafinized. Both healthy (n=10) and cancerous tissues (n=10) were exposured to infrared light between wavenumber of 50-4000 cm^{-1}. Orthogonal partial least square analysis (O-PLS) algorithm which is an advanced form of Principle Component Analysis (PCA) was applied to 20 samples to detect their behaviour against infrared light in between 50-4000 cm^{-1}. Obtained spectrums were evaluated on MATLAB software PLS Toolbox package program. O-PLS analysis were carried out in order to separate cancer and healthy tissues. Sensitivity and specificity of the proposed method is so high with the aid of Orthogonal Signal Correction (OSC) preprocessing method. As a result, an alternative FT-IR method for the diagnosis of prostate cancer from paraffin blocks has been developed and successfully applied.

Keywords: FT-IR Spectroscopy, qualitative analysis, prostate cancer, cancer diagnosis.

[1] Mevlüt ALBAYRAK (0000-0001-8673-6577), Atatürk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Erzurum, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Mevlüt ALBAYRAK, m_albayrak25@hotmail.com

* Bu çalışma 9-12 Mayıs 2018 tarihinde Antalya da düzenlenen "3rd International Conference on Advances in Natural & Applied Science" (ICANAS 2018) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / *Received:* 03.06.2018
Kabul tarihi / *Accepted:* 04.09.2018

Cilt/*Volume*: 8, Sayı/*Issue*: 4, Sayfa/*pp*: 223-227, 2018
ISSN: 2146-0574, e-ISSN: 2536-4618 DOI: 10.21597/jist.430052

GİRİŞ

Prostat kanseri, erkeklerde spermi besleyen ve taşıyan seminal sıvıyı üreten, ceviz şekilli küçük bir bez olan prostatta meydana gelen bir kanserdir (Anonim., 2018). Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Erken teşhis edilen prostat kanseri, prostat bezi ile sınırlı olduğu zaman tedavi şansı daha başarılı olur (Partin ve ark., 1997; Taylor ve ark., 2010; Anonim., 2018). Prostat kanseri belirtileri ileri prostat kanseri durumları harici zordur. Prostat kanseri belirtileri daha çok ileri prostat kanseri durumlarında daha sık görülür. Prostat kanseri teşhisinde ilk olarak plazmadaki prostat spesifik antijen (PSA) seviyesine bakılır. Diğer bir yöntem dijital rektal muayene (DRE) dir (Catalona ve ark., 1994; Pinthus ve ark., 2007; Anonim., 2018). Doktor tarafından prostat kanser şüphesi konulduğunda en etkili yöntem prostattan biyopsi örneğinin alınmasıdır (Catalona ve ark., 1997; Pinthus ve ark., 2007; Anonim., 2018). Alınan biyopsi örneği patoloji laboratuvarlarında günler süren bir histopatolojik işlemlerden geçerek patolog tarafından patolojik tanı konulur. Bu çalışmada histopatolojik işlemlerin çok uzun zaman almasından dolayı hem histopatolojik işlemleri doğrulayıcı hemde prostat teşhisinde alternatif bir yöntem olarak Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, FT-IR) yönteminin kemometri destekli olarak kullanılabilirliği araştırıldı. FT-IR spektroskopi yönteminde doku boyaması gibi herhangi bir ön işleme gerek duyulmaması (Petibois ve Deleris, 2006) analizin çok kısa, ucuz ve basit olması FT-IR yönteminin kullanılabilirliğini artıran üstün özelliklerinden bir kaçıdır. FT-IR yöntemi, organik ve bazı durumlarda inorganik materyalleri tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir. Bu teknik, dalga boyuna karşı numune tarafından absorblanan kızılötesi radyasyonu ölçemeye yarar. Kızılötesi absorpsiyon bantları ise molekülün bileşenleri ve yapıları hakkında bilgi verir. Günümüzde kanser teşhisinde FT-IR spektroskopisinin uygulanabilirliği hiçbir zararlı kimyasal madde kullanılmadığı için çevreye dost bir alet olarak adlandırılıp kullanımı yaygın hale gelmiştir (Ly ve ark., 2008; Mackanos ve Contag, 2010; Khanmohammadi ve Garmarudi, 2011). FT-IR spektroskopisi üçüncü nesil bir kızılötesi spektroskopisidir. Kızılötesi (infrared) spektroskopisine titreşim spektroskopiside denilir. Bunun nedeni kızılötesi ışınların molekülün titreşim hareketleri tarafından absorblanmasıdır. Farklı örnekler, farklı moleküler bağlar veya moleküler bağların farklı konfigürasyonlarını içerdiğinden FT-IR spektroskopisi numune içindeki moleküller hakkında kimyasal bilgi elde etmemizi sağlar (Baker ve ark., 2008). Fourier dönüşüm adı matematiksel bir işlemden gelir ve asıl spektrumdaki ham veriyi dönüştürmede gereklidir (Mantsch ve Chapman, 1996; Anonim., 2015). Kemometrik yöntemler, materyal sistemler hakkında gerekli bilgileri elde etmede matematiksel ve istatistiksel yöntemleri kullanan bir disiplin olarak tanımlanır (Otto, 2016). Literatür araştırmasında prostat kanserinin teşhisinde kemometri eşliğinde FT-IR yönteminin kullanıldığı (Siqueira ve ark., 2017; Talari ve ark., 2017; Siqueira, 2017; Paraskevaidi ve ark., 2018) çalışmalara ulaşılmıştır. Bu çalışmada parafine gömülü kanserli ve normal prostat dokularının teşhisinde herhangi bir histolojik boyama kullanmadan kemometri eşliğinde hızlı ve basit bir alternatif yöntem olarak FT-IR spektroskopisinin geliştirilmesi ve uygulanabilirliği araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda histopatolojik değerlendirilmeleri tamamlanarak raporlanmış 10 kanserli ve 10 normal olmak üzere toplam 20 adet parafine gömülü prostat dokuları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından sağlandı. Çalışmamız Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulu tarafından 08.12.2016 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.00/146 sayı nolu etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi. Elde edilen parafin bloklar 20 mikron kalınlığında Leica RM2255 mikrotom ile kesilerek pozitif yüklü lamlara alındı. 15 dakika 60 derecedeki etüv de bekletildikten sonra ksilol ile deparafinizasyon yapıldı. % 70, % 80 ve % 95 lik alkolden geçirildi.

Bütün lamlar distile su ile yıkanarak havada kurutuldu ve aynı gün Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) bulunan VERTEX 70v FT-IR (Bruker Optics Ltd., Coventry, UK) spectrometri cihazı kullanılarak FT-IR analizleri gerçekleştirildi. Pozitif yüklü lam üzerine alınmış 20 mikron kalınlığındaki toplam 20 örnek FT-IR spektroskopi cihazı ile 1 dakika gibi çok kısa sürede spektrumları alındı. Spektrumları alınan tüm örnekler daha sonra kemometrik olarak değerlendirilerek tümörlü ve tümörsüz prostat dokuları birbirinden ayrıldı. Normal de histopatolojik olarak bir prostat dokusunun değerlendirilerek kanser ya da sağlıklı olup olmadığı teşhisini koymak en iyi şartlarda yaklaşık 3 gün sürmektedir. Bu süre vakanın kompleksliği ve iş yoğunluğu gibi olumsuz etkiler göz önünde bulundurulduğunda 20 güne kadar çıkmaktadır (Anonim, 2018). FT-IR spektroskopisi yönteminde ise alınan spektrumların birbiriyle karşılaştırılması suretiyle

dokunun tümörlümü yoksa tümörsüz mü olduğu çok kısa sürede analiz edilmiştir. Bir spektrumun bant bölgeleri spektrumu anlamak için çok önemlidir. Farklı frekanslar her bir moleküler titreşiminin farklı tiplerini göstermede farklı piklerle ilişkilidir. FT-IR analizleri 50-4000 cm^{-1} dalga sayısı arasında gerçekleştirildi. Fakat bir spektrumun kimyasal olarak en çok teşhis edilebilen bölgesi parmak izi de denilen 900 cm^{-1} ile 1800 cm^{-1} dalga sayısı arasındaki bölge olduğundan ve prostat dokularının spektrum data değerlendirilmesi analiz süresini kısaltmak ve kısa sürede spektrumu değerlendirebilmek için Movasachi ve ark., 2008; Dorling KM, 2012; Siqueira LFS ve ark., 2017 çalışmalarındaki gibi 900-1800 cm^{-1} dalga sayısı arasındaki parmak izi bölgesinde yapıldı. Tarama ve çözünürlük değerleri sırasıyla 64 ve 4 olarak ayarlandı. 1866 faklı dalga sayısı tarandı ve 20 faklı doku örneği için analiz edildi. Bütün sonuçlar MATLAB R2015a ve PLS toolbox (Eigenvector Research Inc) tarafından kemometrik olarak değerlendirildi.

Genel olarak PLS algoritması aşağıdaki formülle açıklandı:

$$X = TPT + E = \sum tf\ pıf + E$$

$$Y = UQT + F = \sum uf\ qıf + F$$

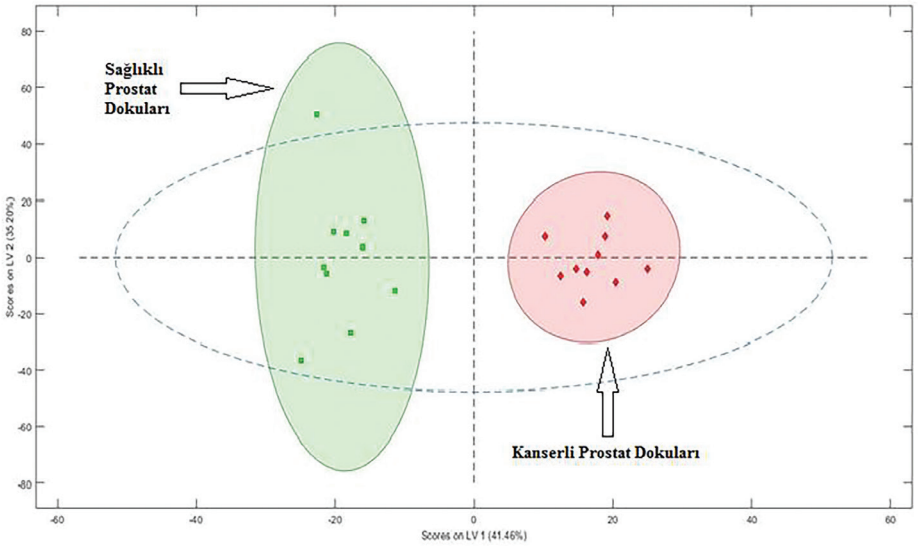
P ve Q, yükleme matrisleri iken, T ve U skor matrisleridir. Artık matrisler ise sırasıyla E ve F olarak açıklanmıştır. Elde edilen veriler Ortogonal Sinyal Düzeltme (OSC) yaklaşımı ile ön-işlemden geçirildi. OSC yaklaşımı genel olara önemli verileri saklayıp istenmeyen interferasyonları ortadan kaldırmaya yarar. Genel olarak OSC modelinin formülü aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$X = t_{osc}\, p_{osc} + X_1$$

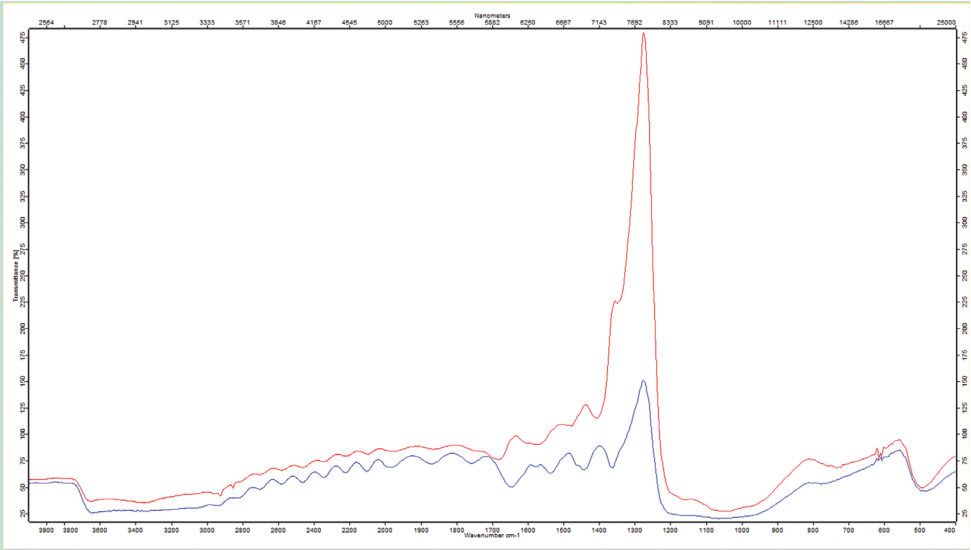
Bu formülde, Tek OSC bileşenleri t_{osc} ve p_{osc} olarak açıklanmıştır. X_1, filtre edilen OSC matristir. Bu matematiksel fonksiyon ile ham FT-IR spektrum verileri filtrelenmiş ve daha yüksek hassasiyetli ve özgüllüğü ile kümelenmiştir. FT-IR analizleri her bir numune için 1 dakika gibi çok kısa sürede ve herhangi bir kimyasal madde kullanılmadan çevreye dost bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Elde edilen verilerin OSC yaklaşımı ile ön-işlemden geçirildikten sonra yöntemin hassasiyetinin ve özgünlüğünün çok yüksek olduğu gözlendi. Yöntemin korelasyon katsayısının (R^2) 0.9869, hata değerinin (RMSEC) 0.102464, hatanın varyansının (RMSECV) ise 87.4941 olduğu görüldü. Ön-işlem sonrası kanserli ve sağlıklı prostat dokuları arasındaki farklılıkları gözlemlemek ve ayırmak için ortogonal kısmi en küçük kareler (Orthogonal - Partial Least Squares, O-PLS) algoritması kullanıldı. Bu yaklaşım, sınıf farklılıklarından çıkarılan verileri yorumlayarak oluşturulan genel bir sınıflandırma algoritmasıdır (Worley ve Powers, 2013). Şekil 1. Modeli açıklamak için ortalama sınıflandırma hatasının düşük olduğu 3 gizli değer (Latent Variables, LVs) seçildi. Şekil 1' de LVs 2 nin bir fonksiyonu olarak LVs 1 dağılım grafiği verilmiştir. Şekil 1. e göre sonuçların çok doğru olduğu görülmektedir. Hiçbir sapma olmadan çok doğru ve kesin bir sonuçla kanserli prostat dokularının sağlıklı prostat dokularından ayrıldığı çok açık bir şekilde görülmektedir. Bu sonuçlarla yöntemin doğruluk ve kesinliğinin oldukça yüksek olduğunu ve analiz esnasında herhangi bir interferasyonun olmadığını gözlendi. Kanserli ve normal prostat dokularından elde edilen spektrum ise Şekil 2. de verilmiştir. Elde edilen spektrumlardan bir kaç farklılığın olduğu gözlendi. Bu spektrumların değerlendirilmesinde en göze çarpan fark 1240 cm^{-1} dalga sayısında nükleik asitlerdeki fosfodiester gruplarının (Andrus ve Strickland, 1998) farklılığından kaynaklanan bandlardan oluştuğu gözlenmektedir. Bu bandlar kanserli prostat dokularında normal prostat dokularına nazaran oldukça düşük görülmektedir. İkinci olarak göze çarpan farklılık 1659 cm^{-1} dalga sayısındaki amit I bandında (C-O gerilme (76%), C-N gerilme (14%), CCN deformasyonu (10%)) görülmekte ve muhtemelen proteinlerin faklı sekonder yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Dorling KM, 2012). Kanserli ve sağlıklı prostat dokuları arasındaki bir diğer spektrum farklılığı ise Baker M ve arkadaşlarının da (2008) çalışmalarında belirttiği ve yine spektrumlarda da görüldüğü gibi 1510-1580 cm^{-1} dalga sayısındaki Amit II bandında (NH bükülme (43%), C-N gerilme (29%), CO bükülme (15%), C-C gerilme (9%), N-C gerilme (8%)) farklılık gösterdiği ve 1200-1400 cm^{-1} dalga sayısındaki Amit III bandında (NH bükülme (55%), C-C gerilme (19%), C-N gerilme (15%), CO bükülme (11%), PO_2^- bükülme, RNA ve DNA dan kaynaklanan) farklılık gösterdiği görülmektedir. FT-IR spektroskopisinde sağlıklı ve patolojik dokular arasındaki spektral ayırım veya değerlendirme genellikle amit absorpsiyon oranları üzerinden yapılmaktadır (Petibois C ve Deleris G; 2006). Elde edilen verilerin literatüre uyumlu çıkması yöntemin güvenilirliğini ve ölçümler sırasında herhangi bir interferasyonun olmadığını da ortaya koymuştur.



Şekil 1. Kanserli ve sağlıklı prostat dokularının LVs 2' nin bir fonksiyonu olarak LVs 1' deki dağılımı



Şekil 2. Kanserli (mavi) ve sağlıklı (kırmızı) prostat dokularından elde edilen spektrum

SONUÇ

FT-IR spektroskopi yöntemi günümüzde çevreye dost yeşil analitik kimya aleti olarak tanımlanır ve kanser teşhisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılır (Khanmohammadi ve Garmarudi, 2011). Çevreye dost bir cihaz olması; analiz esnasında herhangi bir kimyasal maddenin kullanılmamasından ileri gelir. Yöntemin, invaziv olmaması, numuneye tahribat yapmaması, hızlı ve basit oluşu gibi diğer avantajları da vardır. Histopatolojik işlemler kanser teşhisinde referans yöntem olarak kabul edilir. Fakat bu işlemler dokuların parafine gömülmesi, hematoksilen-eozin boyama gibi çok uzun zaman alan basamaklardan oluşur. Bundan dolayı da histopatolojik işlemler sonrası dokulardan kanser teşhisinin verilmesi çok uzun zaman alır.

Kemometri yardımlı FT-IR spektroskopisi, dokuların durumunu tahmin etmek için kullanılan çok hızlı ve doğru bir tekniktir. Bu çalışmada OSC yaklaşımı ile yöntemin hassasiyetinin ve özgünlüğünün çok yüksek olduğu gözlendi. O-PLS algoritması kullanılarak kanserli ve sağlıklı prostat dokuları arasındaki farklılıklar gözlemlenerek referans

yöntem olarak kabul edilen histopatolojik sonuçlarla karşılaştırıldığında FT-IR spektroskopik yönteminin çok doğru ve kesin bir şekilde kanserli ve normal prostat dokularını analiz esnasında herhangi bir kimyasal madde kullanmadan ve çok kısa sürede birbirinden ayırdığı görüldü. Sonuç olarak, kemometri yardımlı FT-IR spektroskopi yönteminin hızlı, basit, güvenilir ve çevreye dost bir yöntem olduğu, kanserli ve normal prostat dokularının teşhisinde histopatolojik yöntemlere alternatif olabilecek önemli bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Kanserli ve normal parafine gömülü prostat dokularını sağladığı için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na ve FT-IR ölçümlerin yapılmasını sağlayan Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine (DAYTAM) desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

Andrus PGL, Strickland RD, 1998. Cancer grading by Foruier Transform Infrared Spectroscopy. Biospectroscopy, 4(1):37-46.

Anonim, 2015. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates (Erişim Tarihi: 12.05.2018).

Anonim, 2018. American Cancer Society, Prostate cancer, https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer.html (Erişim Tarihi: 11.05.2018).

Baker M, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Gardner P, Clarke NW, 2008. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. British journal of cancer, 99(11): 1859-1866.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, M'Liss AH, Scardino PT, Flanigan RC, DeKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, Waters WB, MacFarlane MT, Southwick PC, 1994. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. The Journal of Urology, 151(5): 1283-1290.

Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK, 1997. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination: enhancement of specificity with free PSA measurements. Jama, 277(18): 1452-1455.

Dorling KM, 2012. The development FT-IR imaging fort the study of human prostate cancer biopsies. Faculty of engineering and physical sciences of Manchester University of UK, Doctora Thesis, (Printed).

Khanmohammadi M, Garmarudi AB, 2011. Infrared spectroscopy provides a green analytical chemistry tool for direct diagnosis of cancer. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30(6): 864-874.

Ly E, Piot O, Wolthuis R, Durlach A, Bernard P, Manfait M, 2008. Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies. Analyst, 133(2): 197-205.

Mackanos MA, Contag C H, 2010. Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy. Trends in biotechnology, 28(6): 317-323.

Mantsch HH, Chapman D, 1996. Infrared spectroscopy of biomolecules. Wiley Publications, New York, USA.

Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DI, 2008. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, 43(2): 134-179.

Otto M, 2016. Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry. Third edition, John Wiley-VCH, pp. 2, 28-44, 231, Weinheim-Germany.

Paraskevaidi M, Martin-Hirsch PL, Martin FL, 2018. ATR-FTIR Spectroscopy Tools for Medical Diagnosis and Disease Investigation. In Nanotechnology Characterization Tools for Biosensing and Medical Diagnosis (pp. 163-211). Springer, Berlin, Heidelberg.

Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD, 1997. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer: a multi-institutional update. Jama, 277(18): 1445-1451.

Petibois C, Deleris G, 2006. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. Trends in Biotechnology, 24(10): 455-462.

Pinthus JH, Pacik D, Ramon J, 2007. Diagnosis of prostate cancer. In Prostate Cancer (pp. 83-99). Springer, Berlin, Heidelberg.

Siqueira LFS, 2017. Multivariate classification and Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FT-MIR) in cancer prostate tissue. Chemistry Postgraduate Program of Fedaral University of Rio Grande Do Norte, Doctora Thesis, (Printed).

Siqueira LFS, Júnior RFA, de Araújo AA, Morais CL, Lima KM, 2017. LDA vs. QDA for FT-MIR prostate cancer tissue classification. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 162: 123-129.

Talari ACS, Martinez MAG, Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU, 2017. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, 52(5): 456-506.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin, Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL, 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer cell, 18(1): 11-22.

Worley B, Powers R, 2013. Multivariate analysis in metabolomics. Current Metabolomics, 1 (1): 92–107.