

Análisis espectral de imágenes histológicas en cáncer de mama: una revisión sistemática

Spectral analysis of histological images in breast cancer: a systematic review

Noelia C. Cardozo F^{1ab*}, Reimer A. Romero H^{2bc}

RESUMEN

Los sistemas de imágenes hiperespectrales (HSI) y multiespectrales (MSI) capturan información espacial y espectral, lo que permite analizar los aspectos bioquímicos y estructurales de los sistemas biofísicos. Esta revisión sistemática se propuso evaluar la precisión y la sensibilidad del uso de estas tecnologías para cuantificar las características histopatológicas de las lesiones mamarias en pacientes con cáncer de mama (BC). El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en la población femenina a nivel global. Siguiendo estrictamente las pautas PRISMA y el enfoque PICO, se examinaron 12 estudios. Estos trabajos evidenciaron el uso de diferentes sistemas de adquisición de imágenes espectrales (como el escaneo espacial y snapshot), métodos de procesamiento avanzado como la separación espectral (unmixing) y el uso de algoritmos que incluyen el aprendizaje supervisado y las redes neuronales artificiales que clasifican y analizan el tejido a nivel celular, regional y laminar. Finalmente, la revisión discute la correlación entre la información espectral, los marcadores tumorales (como HER2) y los factores clínico-

patológicos. Los resultados resaltan que las imágenes espectrales ofrecen un contraste y un desempeño superiores a los de las imágenes RGB convencionales.

Palabras clave: Hiperespectral, Multiespectral, Histopatología, Cáncer de mama

SUMMARY

Hyperspectral Imaging (HSI) and Multispectral Imaging (MSI) systems capture spatial and spectral information, enabling the analysis of the biochemical and structural properties of biophysical systems. This systematic review aimed to evaluate the precision and sensitivity of using these technologies to quantify the histopathological characteristics of breast lesions in patients with breast cancer (BC). Breast cancer is the most frequent type of cancer in the female population globally. In accordance with the PRISMA guidelines and the PICO approach, 12 studies were examined. These works demonstrated the use of different spectral imaging acquisition systems (such as spatial scanning and snapshot technology), advanced processing methods (such as spectral unmixing), and algorithms (including supervised learning and artificial neural networks) for classification and analysis at the cellular, regional, and laminar levels. Finally, the review discusses the

ORCID:

¹ [0009-0007-2568-1630](https://orcid.org/0009-0007-2568-1630)

² [0000-0001-8039-5898](https://orcid.org/0000-0001-8039-5898)

***Autor de correspondencia:** Noelia Cardozo, E-mail: noeliamariacardozoflores@gmail.com, dirección: Ciudad Jardín, Cagua, estado Aragua

Recibido: 28 de enero 2026

Aceptado: 3 de mayo 2026

- a. PhD, Escuela de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia - Venezuela
- b. PhD, Instituto de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la UC (IIMBUC), Valencia - Venezuela
- c. Departamento de Física. Facultad de Ciencias y Tecnología-UC, Valencia - Venezuela

correlations between spectral information, tumor markers (e.g., HER2), and clinicopathological factors. Results indicate that spectral images exhibit higher contrast and performance than conventional RGB images.

Keywords: *Hyperspectral, Multispectral, Histopathology, Breast Cancer*

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo más frecuente en la población femenina. A nivel global el cáncer de mama tiene unas tasas estandarizadas de incidencia y mortalidad de 47,8 y 13,6, respectivamente (1). La Sociedad Anticancerosa de Venezuela, reporta en su boletín del 2023 que para ese año las tasas estandarizadas de incidencia y mortalidad eran 51,63 y 20,88, respectivamente (2), por lo que en el país esta tasa de incidencia la ubica como la mayor en mujeres, por encima de cuello uterino (30,08) y pulmón (11,35).

El diagnóstico del cáncer de mama sigue un protocolo médico que combina distintas especializaciones y criterios; a su vez, ha recibido mucha atención por parte de científicos y tecnólogos, pues se persigue mejorar la precisión de los resultados, logrando así reducir la tasa de falsos positivos y falsos negativos.

El cáncer de mama (BC) se caracteriza por su heterogeneidad, con características y comportamientos claramente distintos. Con el fin de optimizar las estrategias de tratamiento personalizadas, el enfoque clínico para tratar la BC depende en gran medida de una multitud de factores que pueden predecir y determinar la progresión de la enfermedad (3). Estos factores abarcan diversos elementos, como los datos clínicos, las propiedades histológicas y los marcadores moleculares (4). El avance de la clasificación molecular en los últimos diez años ha arrojado luz sobre los diversos perfiles moleculares del BC y ha aportado información más precisa sobre el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, la

aplicación práctica de las tecnologías moleculares en entornos clínicos se ve obstaculizada por la escasez de acceso y de disponibilidad.

La prueba de oro con la que queda determinada el estatus de neoplasia en la glándula mamaria (la existencia o no de una patología cancerígena) es la biopsia, esto es, una muestra de tejido extraído de la mama que pasa a manos del patólogo, quién le realiza cortes micrométricos para luego teñirla con hematoxilina & eosina (H&E), así se identifica y valora de una micrografía, las estructuras del tejido mamario según el grado histológico de Nottingham. Este es uno de los sistemas de graduación, con los que se cuantifica la formación tubular, el conteo mitótico y el pleomorfismo nuclear (5) y con ello queda determinado el grado histológico del cáncer, el cual tiene un valor diagnóstico, pero también puede alertar sobre el pronóstico del paciente.

En una muestra histopatológica, las estructuras de interés dentro del tejido (núcleos y citoplasma) a menudo no son fácilmente distinguibles, por lo que se requieren técnicas de tinción que las resalten. La tinción es crucial en histopatología ya que mejora el contraste y la visibilidad de los componentes celulares, facilitando que patólogos e investigadores identifiquen y analicen diferentes estructuras dentro de las muestras de tejido (6). El protocolo de tinción estándar más comúnmente utilizado en histopatología es la tinción con H&E. La hematoxilina, un colorante básico, se une a los componentes ácidos del tejido, en particular al ADN de los núcleos celulares, lo que da como resultado una coloración azul o púrpura. Del mismo modo, la eosina, un colorante ácido, se une a componentes básicos, como las proteínas, y tiñe estructuras como el citoplasma y el estroma en tonos de rosa (6).

Por otro lado, la inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica de tinción sofisticada utilizada en histopatología para detectar antígenos específicos en muestras de tejido. Implica el uso de anticuerpos que se unen a dichos antígenos, lo que permite visualizarlos al microscopio. En el contexto del cáncer de mama, la IHQ se emplea comúnmente para identificar la presencia de receptores como

el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Estos receptores desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama.

Además de detectar los receptores ER y PR, la IHQ se utiliza para evaluar la tasa de proliferación de las células tumorales. Por ejemplo, la proteína Ki-67, asociada con la proliferación celular, puede destacarse mediante técnicas de IHQ (6).

Las imágenes hiperespectrales (HSI) e imágenes multiespectrales (MSI), (HSI – siglas en inglés, MSI – siglas en inglés) son una representación no solo espacial, sino también espectral de los procesos de absorción y dispersión de la luz por los componentes del tejido. Así, en lugar de almacenar la información en un cubo de datos de dimensiones $N \times M \times 3$, como ocurre en las imágenes RGB (modelo de color *Red-Green-Blue*), donde solo existen tres bandas (rojo, verde y azul), una imagen espectral se organiza en un cubo $N \times M \times k$, donde k representa el número de bandas o capas espectrales adquiridas. Cada banda corresponde a una longitud de onda específica, lo que permite capturar variaciones espectrales finas que no son detectables por los sensores RGB convencionales. Este incremento en la dimensionalidad transforma la imagen en un volumen de datos que combina información espacial y espectral, lo que posibilita análisis avanzados como la clasificación de materiales, la segmentación basada en firmas espectrales y la reconstrucción de componentes no visibles. La diferencia fundamental entre las imágenes HSI y las MSI radica en la resolución espectral con que cada sistema opera; en el primero, se suele tener una resolución de 1-2 nm, en el segundo, entre 10 y 20 nm, lo que hace que k sea mucho mayor en las imágenes HSI que en las MSI. Los $N \times M$ píxeles que conforman la imagen tienen entonces la información asociada a los componentes tisulares/celulares de la región donde se encuentra el píxel, esta es usualmente llamada “firma espectral” (Figura 1).

En una imagen espectral, cada píxel representa la intensidad de la luz detectada por la cámara en

una longitud de onda específica. Esta colección de valores de píxel a distintas longitudes de onda constituye la firma espectral del material presente en la escena, similar a una huella digital única para su identificación. La firma espectral obtenida a partir de los datos espectrales sirve como identificador distintivo de diferentes estructuras celulares dentro de la escena capturada (7).

En imágenes hiperespectrales (HSI) e imágenes multiespectrales (MSI), existen dos modos de detección primarios basados en cómo la luz interactúa con el tejido: la reflexión y la transmisión. Estos modos determinan cómo se captura la información espectral de la muestra. La información espectral obtenida mediante tecnologías HSI/MSI típicamente se relaciona con el esparcimiento y la absorción de la luz en la muestra. Esta información también puede utilizarse para mediciones de fluorescencia, lo que proporciona información sobre la composición y las propiedades de la muestra. Las HSI/MSI, también conocidas como espectroscopía de imágenes, tienen la capacidad única de capturar información espacial y espectral a través de una amplia gama de longitudes de onda, que se extiende más allá del rango de sensibilidad visual humana, de 380 a 740 nm. Esta cobertura espectral más amplia permite un análisis detallado de las muestras (8). A diferencia de las imágenes RGB tradicionales, que solo capturan tres bandas espectrales correspondientes a la sensibilidad del ojo humano a la luz azul, verde y roja, las HSI/MSI pueden capturar información en múltiples bandas espectrales. Este rango espectral ampliado permite un análisis más completo de las características de la muestra.

La óptica tisular implica la interacción de la luz con los tejidos biológicos, en la que el esparcimiento se debe a variaciones espaciales del índice de refracción. La absorción de luz en los tejidos está influenciada por cromóforos como la sangre, la melanina, las proteínas, los aminoácidos y el agua, cuyas absorciones conducen a la generación de calor o luminiscencia. Las imágenes de fluorescencia pueden utilizarse para investigar tejidos y diagnosticar enfermedades en tiempo real, sin agentes exógenos, mediante fluoróforos

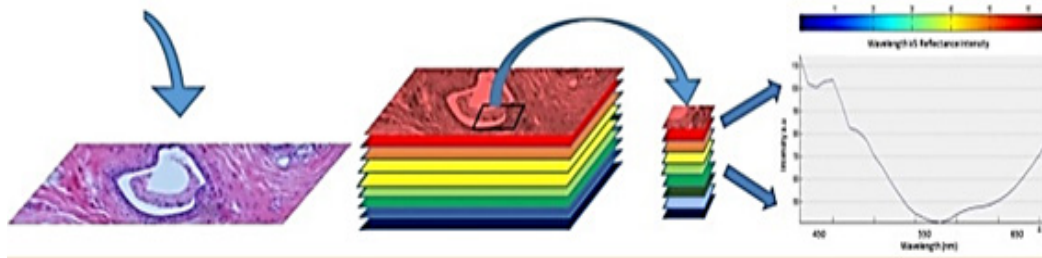


Figura 1. Escena multiespectral de un corte histológico y su firma espectral. Tomado de Khouj y col. (7)

intrínsecos como el colágeno, la elastina, el NADH y los lipopigmentos, que desempeñan un papel clave. Los cambios en la morfología tisular y en los estados patológicos pueden afectar las señales de espacimiento y absorción, por lo que las imágenes de reflectancia, transmitancia y fluorescencia resultan valiosas para detectar alteraciones en las propiedades del tejido (9).

La tecnología HSI y MSI son herramientas que han permitido un avance importante en el desarrollo de la instrumentación para el análisis de sistemas biológicos macroscópicos y microscópicos, tales como los que se realiza en el censo remoto (10), la investigación en alimentos (11) y en aplicaciones médicas (9). Las investigaciones en el área médica, específicamente oncológica, han conducido a trabajos en el diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello (12–14), cáncer de piel (15,16), próstata (17) etc.

Esta revisión sistemática se centra en las investigaciones que abordan los aspectos histopatológicos y el uso de los sistemas HSI y MSI para el diagnóstico de BC en pacientes femeninas. Atendemos esta revisión según el protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), así mismo, se estableció el objetivo del trabajo guiado por la respuesta PICO (Participantes, Intervención, Comparación, Outcome-Desenlace); sin embargo, no se realizó una revisión sobre estudios clínicos donde se realicen intervenciones sobre las pacientes, en cambio, se consideraron los métodos y protocolos de diagnóstico soportados con HSI y MSI, de tal forma que puedan ser comparados entre ellos o entre las imágenes convencionales RGB histopatológicas. De igual modo, se prestó

especial atención a: i) los aspectos de adquisición y su relación con los algoritmos de análisis de imágenes HSI/MSI, ii) los aspectos clínicos e histopatológicos como factores de riesgo.

METODOLOGÍA

Esta revisión responde a las pautas PRISMA (18), éste es un protocolo con el que se orientan las revisiones sistemáticas bajo una metodología que incluye una descripción de las fuentes de información a utilizar, la estrategia de búsqueda, los criterios de elegibilidad de los manuscritos, un informe sobre cómo se realizó la selección de los estudios y el protocolo que deben seguir los investigadores al revisar los manuscritos seleccionados para la revisión sistemática.

Fuentes de información y búsqueda

La revisión se enfocó en dar respuesta a la pregunta PICO (Población, Intervención, Comparación y Outcome (Desenlace)), que originalmente guía la estructura de las preguntas en revisiones de estudios con carácter fundamentalmente clínico; sin embargo, cabe la posibilidad que la intervención se interprete como el uso de una prueba o técnica para el diagnóstico de una enfermedad. De esta forma definimos nuestra pregunta como: ¿Qué nivel de precisión/sensibilidad se ha encontrado con el uso de HSI/MSI para cuantificar las características histopatológicas de lesiones mamarias en pacientes femeninas con/sin diagnóstico de cáncer de mama?. Las fuentes de información consultadas fueron los repositorios

PubMed, Scopus y Web of Science. Las consultas se delimitaron temporalmente entre 2004 y 2024. Para una búsqueda eficiente se usaron palabras clave delimitadas por los operadores lógicos (OR y AND), estas fueron: (“*Breast Cancer*” OR “*Breast Neoplasm*”) AND (“*Hiperspectral imaging*” OR “*Multispectral imaging*”) AND (“*histopathology*” OR “*histology*”). Sin embargo, a estas palabras se incluyeron las derivaciones que proporcionó MeSH (*Medical Subject Headings*) en PubMed; esto permitió enriquecer aún más el vocabulario y tener un mayor alcance en los resultados.

Con estos parámetros de búsqueda se obtuvieron 179 artículos (97 en PubMed, 60 en Scopus y 22 en WoS). Luego de rechazar los casos duplicados, este número se redujo a 123 artículos, para los cuales se realizó un cribado basado en los siguientes criterios de exclusión: i) artículos de revisión, ii) estudios de espécimen o de piezas resecadas intraoperatorias (no histología), iii) infrarrojo cercano (NIR – sigla en inglés), iv) fluorescencia, lo que permitió calificar un total de 12 artículos en esta revisión sistemática (Figura 2).

RESULTADOS

Adquisición de imágenes HSI/MSI, procesamiento y análisis

Las tecnologías HSI y MSI que se conocen hasta ahora se diferencian por la forma en que adquieren o construyen la imagen, se distinguen cuatro sistemas: escaneo espacial, escaneo espectral, escaneo espacial-espectral y tecnología snapshot. En los sistemas de escaneo espacial se emplean elementos ópticos para difractar la luz entrante en posiciones fijas en un sensor, lo que limita la resolución espacial. Dos tipos principales son los sistemas de escoba y de escoba pulsador (pushbroom), con tiempos de adquisición limitados por la velocidad de escaneo y la tasa de fotogramas de la cámara. Los sistemas de escaneo espectral emplean elementos ópticos para filtrar la radiación incidente y capturar información espacial a una sola longitud de onda en un tiempo determinado. Los ejemplos incluyen LCTF (*Liquid Crystal Tunable Filter*) y AOTF (*Acousto-Optic Tunable Filter*), con resolución espectral limitada por el ancho de banda del filtro, pero con alta resolución

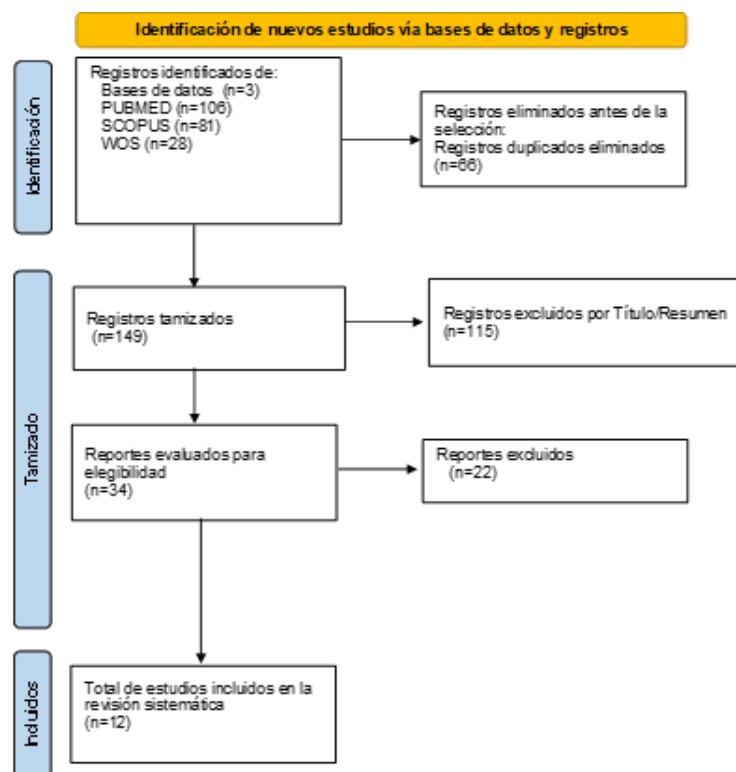


Figura 2. Diagrama de flujo PRISMA para la búsqueda y selección de trabajos

espacial, alcanzable con cámaras monocromáticas convencionales. Los sistemas de escaneo espacial-espectral (o *snapscan*) capturan rebanadas diagonales del cubo hiperespectral mediante filtros HSI dispuestos en líneas paso a paso. Al adquirir imágenes rápidamente, se combina una alta resolución espacial con información hiperespectral detallada. Por último, la tecnología *snapshot* aborda la limitación de la adquisición en tiempo real de otros sistemas HSI mediante la captura de cubos hiperespectrales 3D completos en cada toma. Sin embargo, las resoluciones espectral y espacial de las cámaras instantáneas son menores que las de otras tecnologías HSI.

En este sentido, en esta revisión se encontraron cuatro (4) artículos que utilizaron el sistema de escaneo espacial (*pushbroom*), seis (6) trabajos implementaron el sistema espectral y sólo uno utilizó el sistema *snapshot* (Cuadro 1). No se manifiesta por ninguno de los autores el criterio o los criterios que lo llevaron a escoger el tipo de tecnología implementada en su investigación; sin embargo, algunos diseños permiten realizar comparaciones entre la tecnología convencional y los sistemas espectrales, o entre los sistemas MSI y HSI.

Las limitaciones de una HSI adquirida con un sistema *snapscan* (escaneo espectral y espacial) quedaron en evidencia en el trabajo de Quintana y col. (19) al compararlo con un sistema HSI-*pushbroom*, este último mostró una mejora de aproximadamente 25% en la resolución espacial; asimismo, los detalles espectrales resultaron evidentes en las curvas espectrales a los distintos aumentos de campo implementados en este estudio comparativo (x5, x10, x20 y x50).

Las imágenes obtenidas por cualquiera de los sistemas espectrales deben procesarse para su análisis posterior. El procesamiento generalmente requiere algoritmos matemáticos que van desde los de complejidad sencilla, como el cálculo de la densidad óptica (DO), hasta los de mayor complejidad, como la normalización de color y la separación espectral (*unmixing*, en inglés). Con la densidad óptica se obtiene una medida de la absorbancia de la luz que atraviesa un tejido; así, si este presenta una alta concentración de

elementos absorbentes (cromóforos), mayor será la absorbancia. De igual forma, a mayor concentración de tintes (H&E, por ejemplo), mayor será la cantidad de luz que absorberá esa muestra (20).

La separación multiespectral es el método más utilizado para el análisis de datos HSI/MSI en esta revisión. Los trabajos que coinciden en esta opción también lo hacen en cuanto al uso de marcadores tumorales (Cuadro 2). También coinciden en el tipo de equipo comercial que implementan. El método de separación espectral implica un ajuste por mínimos cuadrados, que es esencialmente una regresión lineal, en la que se compara un conjunto de formas espectrales predefinidas (denominadas biblioteca espectral) con el espectro obtenido de la muestra. La precisión y la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante este proceso dependen de la disponibilidad de representaciones precisas de las características espectrales de los fluoróforos o cromóforos presentes en la muestra. Esto subraya la importancia de contar con ejemplos bien definidos de formas espectrales para los fluoróforos o cromóforos que se espera que estén presentes en la muestra para lograr resultados precisos y cuantitativos (21).

En esta revisión sistemática se encontraron dos trabajos, Liu y col. (22) y Liu y col. (23) en los que se correlacionó la densidad óptica en tejidos teñidos con la expresión de los marcadores tumorales, en el primero pudieron observar una mejor correlación entre patólogos en la DO, obtenida con las imágenes MSI que con las obtenidas con imágenes RGB; esto pudiera contrastar con la apreciación generalizada en torno a las asociación que hay entre la concentración de antígenos y la intensidad de los cromógenos, cuando un cromógeno se vuelve demasiado oscuro hace inviable el análisis cuantitativo de la imagen, lo que se recomienda (24,25) es mantener un DO total inferior a 0,6 unidades; también afirma que la comparación entre la intensidad de la tinción y la concentración del antígeno en el tejido representa otro desafío, que a menudo se complica por variables preanalíticas como la duración de la fijación, el tiempo transcurrido hasta la fijación y la edad de la muestra, entre otras.

Cuadro 1. Características de los sistemas de adquisición de esta revisión

Técnica de adquisición	Fuente óptica/Sensor	Rango Espectral	#Bandas	Aumento	Resolución espacial	Fuente
MSI/RGB LCTF	Luz blanca	420nm-720nm (paso 20 nm)	15	x100	1360 × 1024 pixels	Liu y col., 2016 (22)
HSI pushroom	espectrómetro/CCD	400-1000 (paso 2,8)	826	x20		Quintana-Ortega y col., 2022 (28)
MSI/RGB spectral cámara					0,12 nanom/ px	Balkenhol y col., 2021 (34)
HSI pushroom	Lámpara halógena 12 V - 100 W	400-1000 (2,8 nm)	826	x20		Ortega y col., 2020 (32)
RGB / HSI - CF -Campo oscuro	luz blanca / LQTF / CMOS	420-730	311	-	-	Chua y col., 2022 (21)
HSI snapshot	12V-100W LL halógeno	461 - 641	31	x40	443x313 100 microm x 80 micro	Khouj y col., 2018 (7)
MSI/RGB LCTF	12V100W halogen bulb / pushbroom / CCD	420nm-720nm (paso 20 nm)	20	x100 x400	1360 × 1024 pixels	Liu y col., 2016 (23)
MSI	NA	410-750 nm	10	x40	0.185 nm/px	Irshad y col., 2014 (31)
HSI-LCTF / RGB H&E	LQTF	420-730	311	-	-	Zhang y col., 2023 (29)
HSI pushroom y snapscan	Quartz-Tungsten Halogen/CMOS	400 - 1000 (2,8 nm) 470-900 (10 - 15nm)	826 150	x5, x10, x20, x50	1x1004 3650 × 2048	Quintana-Ortega, 2021 (19)
MSI pushbroom	CCD	420-700 (10 nm)	29	x40x100		Boucheron y col., 2007 (27)
HSI / LCCs	LCCs / CMOS	450-700 (1 nm)	250	x20	-	Oiknine y col., 2023 (24)

Los tipos de análisis que se realizan sobre las imágenes histopatológicas (RGB o HSI/MSI) pueden clasificarse según la región de interés (ROI) del estudio o según el nivel tisular. Así, encontramos estudios a nivel: i) celular (clasificación de tipo celular, anormalidades nucleares, teñido virtual), ii) regional (heterogeneidad tumoral, invasión celular, vascularización tumoral), y iii) laminar (clasificación del cáncer, segmentación tumoral, análisis de supervivencia) (26). En este sentido, se realizaron revisiones de tres (3) artículos que evaluaron a nivel regional, cinco (5) a

nivel celular, uno solo en ambos niveles y tres (3) trabajos que lo hicieron a nivel de lámina (Cuadro 2). En términos generales, en cualquier análisis ha de preestablecerse el nivel tisular de estudio, el nivel de clasificación (bivariado o multivariado) y el esquema de entrenamiento de la máquina de aprendizaje; sobre este último, debe considerar implementar: i) una máquina de aprendizaje supervisada, ii) una máquina de aprendizaje no supervisada o iii) un aprendizaje profundo, todas ellas referidas como inteligencia artificial (IA). Sin embargo para que esto sea

Cuadro 2. Procesamientos de imágenes MSI/HSI reportados en esta revisión

Técnica de procesamiento	Diseño del estudio	Objetivo	Nivel tisular	Autor-año
spectral unmixing	IHQ variables clínicas	Comparar TAs según respuesta del status HER2 como factor de SLE (5 años)	Regional	Liu y col., 2016 (22)
KNN CNN SVM RF DNN	H&E WLI	Distingue entre células tumorales y otras estructuras. Comparación entre distintas ML	Celular	Quintana-Ortega y col., 2022 (28)
Unmixing segmentación basada en información espectral CNN	retrospectivo H&E TILS	Valoración pronóstica de los TILS (CD3, CD8 y FOXP3) en la sobrevida global y tiempo de remisión	Celular y Regional	Balkenhol y col., 2021 (34)
2D-CNN	H&E	Diferenciación celular entre tejido tumoral y normal	Celular y Regional	Ortega y col., 2020 (32)
k-means	FreeLabel	diseño para integrar H&E, hsi, contraste de fase y campo oscuro	Regional	Chua y col., 2022 (30)
k-means	H&E	Diferenciación de tejido normal-cáncer	Lámina	Khouj y col., 2018 (7)
spectral unmixing	IHQ HER2 CK5/6 ER	Comparación entre sistemas MSI/RGB sobre la DO y DOS variables clínicas	Celular	Liu y col., 2016 (23)
identificación por bandas / por algoritmo redundancia de bandas	H&E	Identifica mitosis en H&E	Celular	Irshad y col., 2014 (31)
suavizado/normalización/pca/svm	Free Label	Comparar resultados con HSI / campo oscuro / contraste de fase	Lámina	Zhang y col., 2023 (29)
parámetros de adquisición	H&E	Comparación entre dos sistemas HSI (pushroom y snapscan)	Lámina	Quintana-Ortega y col., 2021 (19)
PCA	H&E	Comparación de desempeño entre MSI (pushbroom) y RGB derivada	Celular	Boucheron y col., 2007 (27)
Esquema comprensión óptica	H&E	Diseño basado en cristal líquido (LC) y algoritmo de red profunda dentro del esquema de compresión óptica	Celular	Oiknine y col., 2023 (24)

comprendido por especialistas ajenos al área de la ciencia de la computación y análisis de datos, debe mencionarse que la IA es un concepto antiguo (1957) y de amplio alcance que se refiere a todas las tareas que puede desarrollar una máquina (o computadora) para buscar imitar la inteligencia humana, que va desde tareas muy específicas basadas en información estructurada hasta tareas más complejas como identificación de voz, por lo que las IA abarca algoritmos para el desarrollo de máquinas de aprendizaje automático hasta algoritmos de aprendizaje profundo.

Cabe precisar que el aprendizaje automático es una parte de la IA en la que las máquinas se exponen a grandes volúmenes de datos para desarrollar sus propios patrones de interpretación y actuar sobre ellos. Por otro lado, el aprendizaje profundo es un subconjunto del aprendizaje automático y utiliza redes neuronales artificiales (ANN) para determinar la precisión de su interpretación o predicción, a diferencia de los algoritmos de aprendizaje automático supervisado, que requieren información o parámetros adicionales durante el entrenamiento. El objetivo del aprendizaje automático es crear una máquina capaz de identificar patrones. Dentro de esta área, distinguimos dos tipos de aprendizaje: supervisado y no supervisado. El aprendizaje supervisado implica un conjunto definido de

resultados para evaluar el sistema, mientras que el aprendizaje no supervisado permite a las máquinas identificar patrones naturales en los datos sin un conjunto de resultados predefinido. Finalmente, las redes neuronales artificiales (ANN) se esfuerzan por replicar los mecanismos operativos del cerebro humano mediante la organización de neuronas artificiales interconectadas; estas redes comprenden capas de neuronas artificiales dispuestas en una vía definida para la transmisión y el procesamiento de datos. Estas ANN facilitan el cálculo, la ponderación y la evaluación de múltiples procesos autónomos para obtener un resultado a partir de datos no estructurados, como imágenes, sonido, texto plano, etc.

En la Figura 3 puede observarse un esquema general del procesamiento y análisis de imágenes histopatológicas mediante HSI/MSI; se trata del esquema propio del aprendizaje supervisado, en el que se analiza la imagen histológica a nivel regional. La imagen (o imágenes) que se usa para el entrenamiento debe ser segmentada por un especialista que delimita, en la imagen RGB, las áreas correspondientes a tumor y no tumor; estas dos categorías se caracterizan por sus firmas espectrales (absorbancia), que constituyen la información cuantitativa con la que se entrenará el modelo de clasificación. El modelo óptimo será aquel cuyos parámetros maximizan su poder

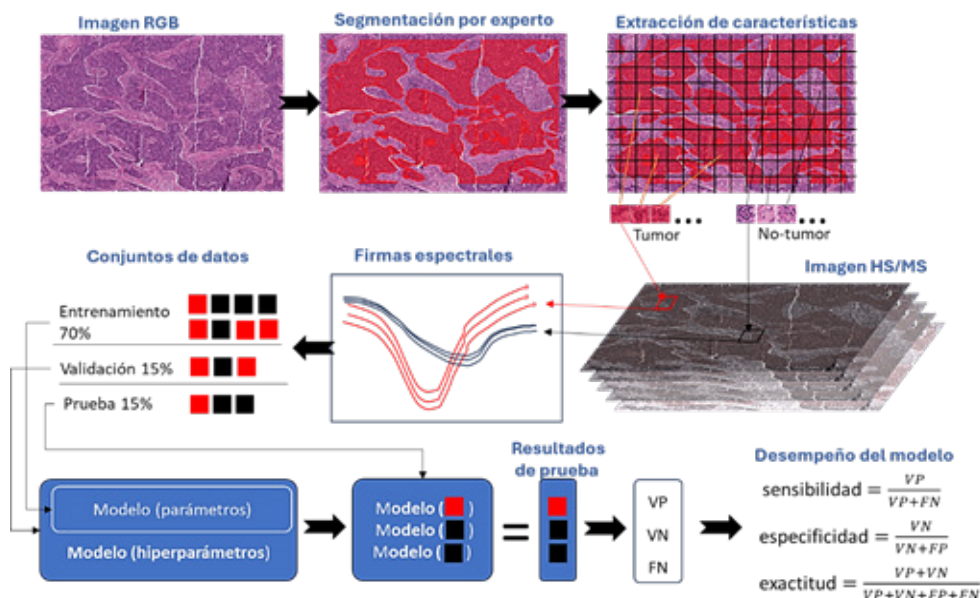


Figura 3. Esquema del proceso y análisis de imágenes HSI/MSI, tomado de Lee y col. (26)

predictivo; de igual forma, los hiperparámetros se ajustan con la información de validación. Estos pueden ser el número de árboles para una máquina de aprendizaje basada en árboles de decisión o el número de capas ocultas para una red neuronal. La etapa de prueba se realiza con datos dispuestos para ello y que, además, i) son desconocidos para el modelo y ii) están previamente etiquetados (o categorizados). De esta forma, los resultados (o categorías determinadas por el modelo) se comparan con los valores reales mediante métricas que evalúan el desempeño del modelo; entre ellas destacan: i) la sensibilidad, o tasa de verdaderos positivos; ii) la especificidad, o tasa de verdaderos negativos; y iii) la exactitud, o tasa de resultados verdaderos.

Un aspecto clave del aprendizaje supervisado es el acompañamiento que debe brindar el especialista y el criterio que este utiliza para determinar la categoría a la que pertenece un objeto: lámina, tejido o célula. La categorización puede responder a los aspectos clínicos o también a los histopatológicos; estos últimos, mediante el sistema de graduación escogido (Nottingham) o mediante anotaciones realizadas sobre la misma imagen que señalen el o los objetos de interés. Una discusión amplia sobre estos criterios, su relación con el nivel tisular y su incidencia en la calidad de los datos y en el poder predictivo de los modelos puede encontrarse en Lee y col. (26).

Basados en la separación espectral y en la DO, Liu y col. (22), compararon las imágenes MSI (pushbroom) y las imágenes RGB (CCD de 12 bits) y se observó que las primeras tenían mayor nitidez, mayor contraste, mejor procesamiento del balance de blancos y de la reducción del color, y una eliminación más efectiva del efecto de luz espontánea del tejido, para cada marcador IHQ (HER2, CK5/6 y ER) utilizado en la investigación, lo que garantiza una mejor calidad de imagen para su análisis posterior. El estatus HER2 dado por la DO fue comparado con el estándar de oro (FISH) en ambas modalidades (MSI y RGB); con ello, se obtuvo una sensibilidad (89,1%) ligeramente mayor en MSI que en RGB (84,5%); de igual forma, en la especificidad (83,2% en MSI vs 81,8% en RGB).

Otra comparación entre sistemas HSI y RGB fue hecha por Boucheron y col. (27) que identificaron núcleos celulares en el tejido mamario neoplásico a partir de la información espectral a nivel de píxel. Sin embargo, consiguieron que las imágenes multiespectrales no proporcionaran información espectral mucho más discriminatoria (menos del %) que la de las bandas RGB para la clasificación nuclear.

Por otro lado, Khouj y col. (7) evaluaron un sistema de snapshot para diferenciar tejido normal de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), teñido con H&E y sin teñir, mediante un sistema HSI con 31 bandas (461 – 641 nm) (Cuadro 1). El análisis de los valores de reflectancia espectral indicó que las longitudes de onda cercanas a 550 nm mostraron la mayor capacidad de diferenciación entre los tipos de tejido. Esta información se utilizó para entrenar algoritmos de procesamiento de imágenes, tanto con datos supervisados como no supervisados. El método K-medias se aplicó a los cubos de datos hiperespectrales y detectó con éxito diferencias espectrales de tejido, con una sensibilidad del 85,45%, una especificidad del 94,64%, una tasa de verdaderos negativos del 95,8% y una tasa de falsos positivos del 4,2%. Estos resultados fueron verificados mediante el marcado de las muestras de tejido por un patólogo.

Un sistema HSI pushbroom con sensor CCD, trabajando desde el rango visual (400 nm) hasta el infrarrojo cercano (100 nm) y resolución espectral de 2,8 nm fue implementado por Quintana y col. (19,28) para identificar distintas estructuras celulares en el tejido mamario neoplásico. Quintana y col. (19,28) implementaron varios algoritmos de inteligencia artificial tales como: k-vecinos cercanos (kNN – siglas en inglés), Máquina de Soporte Vectorial (SVM – sigla en inglés) y Bosques Aleatorios (RF – siglas en inglés); al igual que el trabajo de Khouj y col. (7), con estos algoritmos fue necesario, entrenar al algoritmo con imágenes celulares previamente señaladas por un patólogo. También usaron una Red Neuronal Convolucional (CNN, por sus siglas en inglés) compuesta por ocho capas convolucionales, una capa de promedio de agrupación, dos capas densas y una capa softmax final. Para la clasificación

de células tumorales vs. fibroblastos, kNN presentó la mejor compensación de sensibilidad/especificidad (64/52%), mientras que CNN obtuvo los mejores resultados de sensibilidad y AUC (96% y 0,91, respectivamente). En la clasificación de células tumorales vs. linfocitos, kNN también proporcionó la mejor relación sensibilidad-especificidad (58,47/58,86%) y una puntuación F1 de 74,12%. El algoritmo SVM también arrojó un alto valor de puntuación F1 (70,38%).

Algunos trabajos recientes (29,30) incorporan sistemas de adquisición basados en LCTF (*Liquid Crystal Tunable Filter*). Estas unidades utilizan las propiedades electroópticas de los cristales líquidos para controlar la transmisión de la luz, de modo que la orientación de los cristales puede ajustarse y, así, afectar la birrefringencia del material. Esto permite filtrar las longitudes de onda de forma ajustable, convirtiéndolo en un filtro espectral. Las LCTF se utilizan ampliamente en imágenes espectrales y en microscopía, lo que permite la adquisición rápida de datos espectrales en diversas aplicaciones, como la imagenología biomédica. Su capacidad para sintonizarse en longitudes de onda específicas las hace valiosas para analizar las firmas espectrales de distintos materiales o tejidos. Una forma de mejorar el desempeño de un sistema de adquisición multispectral basado en cristales líquidos (LC, siglas en inglés) la consiguieron Oiknine y col. (24) disponiendo dos celdas delgadas de LC, el dispositivo codifica espectralmente la iluminación, lo que permite la captura de muestras compresivas. La codificación espectral se logra mediante la manipulación de la trayectoria de la iluminación; posteriormente, se emplea un método basado en técnicas de detección compresiva para reconstruir imágenes hiperespectrales a partir de un número limitado de mediciones. En los experimentos se utilizaron 47 mediciones multiplexadas para reconstruir 200 bandas espectrales, lo que demuestra la eficiencia del enfoque CS para obtener imágenes hiperespectrales.

Análisis clínico-patológico y asociación con información espectral

El uso de H&E sigue siendo la regla en los distintos estudios, y en esta revisión fueron 7 las investigaciones que optaron por este tipo de tinción, más que por marcadores tumorales (Cuadro 2). En este sentido, identificar la firma espectral de la hematoxilina y la eosina constituye uno de los primeros pasos para reconocer las distintas estructuras del tejido mamario. Irshad y col. (31) lograron identificar las bandas que mejor permiten distinguir las mitosis. Estas corresponden al rango de 580 a 670 nm, es decir, desde la banda del color amarillo hasta el inicio de la banda roja. Se comporta mejor que la azul, pero queda en evidencia la utilidad de la banda verde, pues en este rango se observa una mayor absorción por los núcleos mitóticos que por las demás estructuras del tejido.

Por otro lado, Khouj y col. (7) encontraron diferencias en las firmas espectrales entre tejidos normales y tejidos con carcinoma ductal in situ (DICS, siglas en inglés); esta diferencia se hacía más notoria alrededor de los 550 nm, lo cual se acerca a lo observado por Irshad y col. (31) y Oiknine y col. (24), aunque se trate de estructuras distintas, pues este último estudió células de nódulos linfáticos y halló diferencias entre las normales y las cancerígenas en el rango espectral de 525 a 550 nm. En este sentido Ortega y col. (33) llevaron a cabo una comparación entre dos sistemas (HSI y un convencional RGB) para identificar estructuras celulares (células normales, células tumorales, células mitóticas y linfocitos) en imágenes histopatológicas teñidas con H&E. Destaca de este trabajo el uso de una red neuronal entrenada con imágenes (hiperespectrales y RGB) de las estructuras celulares mencionadas tomadas de dos pacientes, sus hallazgos indican una ligera mejoría en la identificación de unidades celulares con sensibilidad y especificidad de 83% (IC: 80%-86%) y 84% (IC: 82%-87%) para el sistema HSI y para el RGB de 84% (IC: 83%-86%) y 74% (IC: 72%-76%).

Los marcadores tumorales también tienen un papel importante en el diseño de estudios que tienen como objetivo el diagnóstico mamario, y con ellos también se incluyen las características clínico-patológicas que permitirían dar validez a los análisis multispectrales, por ejemplo el marcador HER2 fue analizado cuantitativamente (densidad óptica) desde sus imágenes multispectrales e imágenes RGB y correlacionadas con el tiempo libre de enfermedad (TLE - 5 años) (22); sin embargo, ambas medidas de DO en MSI e imágenes RGB evidenciaron diferencias significativas en los TLE-5 (valor $p < 0.01$, prueba de log-rank). Del mismo modo, su análisis multivariado indicó que el HER2 MSI proporcionó un mayor cociente de riesgo instantáneo (HR, hazard ratio – siglas en inglés) que HER2 RGB en la predicción de 5-TLE (2,454 frente a 2,060; 2,467 frente a 2,401), además la correlación HER2 MSI tuvo tres factores pronósticos convencionales principales, incluido el estado de LN, el grado histológico y el estadio clínico, pero HER2 RGB solo se correlacionó con los dos primeros factores.

Es conocido que en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama triple negativo (TNBC) la presencia de algún grupo de linfocitos está asociado con mejor pronóstico de supervivencia (33). En este sentido Balkenhol y col. (34) implementaron varios marcadores (CD8, FOXP3 y CD3) y la adquisición de imágenes espectrales para evaluar los linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) en muestras de TNBC. El estudio encontró que una alta densidad de linfocitos positivos se correlacionó con una mejor supervivencia en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Ninguno de los marcadores de linfocitos infiltrantes tumorales (CD3, CD8, FOXP3) fue superior a los demás en la predicción de supervivencia. Los resultados de la evaluación de TILs en diferentes regiones del tumor y de su entorno no mostraron diferencias marcadas.

Por otro lado, Liu y col. (23) comparan la señal (DO) de dos sistemas de adquisición de imágenes (RGB y MSI) y cuantifican los biomarcadores HER2, CK5/6 y ER en la membrana celular, el citoplasma y el núcleo, respectivamente. En cualquiera de los marcadores

considerados, se observó que la señal DO-MSI superaba a la obtenida con el sistema RGB ($p < 0,05$). Asimismo, la cuantificación de DO en 45 muestras con estatus HER2 positivo en MSI proporcionó más información sobre la expresión de proteínas en relación con las características clínico-patológicas, como el estado de los ganglios linfáticos ($p=0,02$) y los grados histológicos ($p=0,04$), en comparación con las imágenes RGB, en las que la DO no alcanza para diferenciar entre estos dos estatus.

Es importante resaltar que el uso de marcadores tumorales puede llevar implícitamente a que los niveles de detalles tisulares en estos estudios sean en su mayoría a nivel celular, esto resalta la importancia que tienen los patrones celulares y su respuesta espectral, que a su vez, son aprovechados por herramientas de análisis espacial y espectral como los que se realizan con las redes neuronales convolucionales, que a su vez compite con la separación espectral para identificar los objetos a ese alto nivel tisular. Todo esto contrasta con lo obtenido por Boucheron y col. (27), quienes, como señalamos anteriormente, no pudieron detectar diferencias en los resultados de los hallazgos nucleares entre los sistemas RGB y MSI; recordemos que él estudió tejidos teñidos con H&E y se valió de un método de análisis de imágenes que rescata sólo parte de la información espectral, conjuntamente con una máquina de soporte vectorial, la cual, en comparación con una red neuronal, maneja un número inferior de parámetros de ajuste.

En cuanto a los intentos por avanzar hacia un análisis de tejido libre de tinción o de marcadores tumorales, resaltan algunas pruebas documentadas en dos trabajos (29,30) en los que se implementaron métodos de adquisición multimodales que registraron imágenes de HI en campo oscuro y de contraste de fase. Aunque en el primer caso los resultados no son muy alentadores, en el segundo las imágenes HSI fueron adquiridas con contraste de fase y campo oscuro; también incluyó un proceso de análisis basado en la reducción analítica de bandas espectrales y en una máquina de soporte vectorial. Con ello, se obtuvieron resultados muy alentadores: 85% y 98% de sensibilidad y

especificidad, respectivamente, para distinguir entre tejidos sanos y cancerosos.

DISCUSIÓN

La tecnología espectral ha sido explorada por la comunidad científica para analizar los atributos histopatológicos del tejido mamario. La revisión se ajustó meticulosamente al protocolo PRISMA, garantizando un enfoque sistemático y transparente, y abordó eficazmente la pregunta de investigación PICO.

Los criterios de exclusión dieron lugar a un número limitado de investigaciones, centradas en diversas áreas de la clínica y de la histopatología. De esta forma, se pudieron identificar algunos aspectos que condujeron a estas investigaciones y que pueden englobarse según: i) el nivel tisular de la muestra (lámina, tejido, célula/núcleo), ii) el diseño de la investigación y iii) la tinción o los marcadores tumorales; cabe resaltar que estos tres aspectos pueden ser o no vinculantes. Del mismo modo, se identificó una amplia gama de estrategias para el análisis de imágenes HSI/MSI, que incluyen métodos como la separación espectral y el uso de algoritmos de aprendizaje supervisado y no supervisado. Además, estos enfoques se examinaron junto con algunos factores clínicos e histopatológicos, y se establecieron asociaciones valiosas que aportaron profundidad y conocimiento a los resultados de la investigación.

También se observó un cambio hacia el uso del análisis espectral en muestras de tejido no teñidas. Estos estudios se han visto reforzados por la integración de técnicas de análisis de imágenes con algoritmos de aprendizaje automático que no requieren metodologías de aprendizaje profundo. Sin embargo, es crucial tener en cuenta que estos enfoques son relativamente novedosos en este campo y aún no se han sometido a pruebas exhaustivas en una población diversa de pacientes con distintos diagnósticos de mama.

La investigación de imágenes histológicas representa un gran desafío debido a su objetivo general: formular un protocolo estandarizado.

Este protocolo requiere una atención meticulosa a los detalles para garantizar que las muestras de tejido examinadas se sometan a un procesamiento bioquímico idéntico, lo que repercute en respuestas espectrales más confiables con las que se logre identificar los componentes del tejido. Además, exige que la adquisición y el análisis de imágenes se realicen bajo parámetros consistentes en todos los ámbitos. De igual forma, el protocolo exige que todos los especialistas se adhieran a criterios diagnósticos uniformes a lo largo de todo el proceso de investigación. Como resultado, los hallazgos iniciales parecen prometedores, pero sigue siendo imperativo determinar el alcance preciso y las limitaciones de estas metodologías. Esto es particularmente crucial dados los diferentes niveles de complejidad de los tejidos y el objetivo final de la investigación, ya sea de naturaleza diagnóstica o pronóstica.

Un aspecto importante es la diferencia entre los sistemas HSI y MSI en cuanto a los beneficios observados. Consideramos que esta es una labor compleja. Aunque es evidente que los sistemas HSI son capaces de capturar diferencias sutiles asociadas a cambios patológicos del tejido, no se encontraron estudios que los comparen con los sistemas MSI en un diseño que emplee los mismos tejidos, los mismos diagnósticos ni las mismas características clínicas.

REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49.
2. Villalta D, Sajo-Castelli AM, Araya LE, Ovalles PJ. Boletín Mes Rosa. Sociedad Anticancerosa de Venezuela. Caracas. 2023. Disponible en: <https://www.cancervenezuela.org>
3. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel).* 2021;13:4287.

4. Yersal O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5:412.
5. Chen J-M, Li Y, Xu J, Gong L, Wang L-W, Liu W-L, et al. Computer-aided prognosis on breast cancer with hematoxylin and eosin histopathology images: A review. *Tumor Biology (Internet)*. 2017;39:101042831769455.
6. Hacking SM, Yakirevich E, Wang Y. From Immunohistochemistry to New Digital Ecosystems: A State-of-the-Art Biomarker Review for Precision Breast Cancer Medicine. *Cancers (Basel)*. 2022;14:3469.
7. Khouj Y, Dawson J, Coad J, Vona-Davis L. Hyperspectral Imaging and K-Means Classification for Histologic Evaluation of Ductal Carcinoma in situ. *Front Oncol*. 2018;8.
8. Tuchin VV. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE); 2015.
9. Fei B. Hyperspectral imaging in medical applications. 2019. p. 523–65.
10. Manolakis DG, Lockwood RB, Cooley TW. Hyperspectral imaging remote sensing: physics, sensors, and algorithms. Cambridge: Cambridge University Press; 2016. ISBN: 9781107083660.
11. Pu H, Lin L, Sun D. Principles of Hyperspectral Microscope Imaging Techniques and Their Applications in Food Quality and Safety Detection: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18:853–66.
12. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;26:123–41.
13. Akbari H, Halig LV, Zhang H, Wang D, Chen ZG, Fei B. Detection of cancer metastasis using a novel macroscopic hyperspectral method. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2012;8317:831711.
14. Martínez B, León R, Fabelo H, Ortega S, Piñeiro JF, Szolna A, et al. Most Relevant Spectral Bands Identification for Brain Cancer Detection Using Hyperspectral Imaging. *Sensors*. 2019;19:5481.
15. Wang Q, Li Q, Zhou M, Sun L, Qiu S, Wang Y. Melanoma and Melanocyte Identification from Hyperspectral Pathology Images Using Object-Based Multiscale Analysis. *Appl Spectrosc*. 2018;72:1538–47.
16. Di Lorenzo V. AC, Romero H RA, Muñoz T. A, Vivas SC, Paredes I. Análisis multiespectral y digital de los nevus melanocíticos adquiridos. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*. 2018;42:173.
17. Akbari H, Halig LV, Schuster DM, Osunkoya A, Master V, Nieh PT, et al. Hyperspectral imaging and quantitative analysis for prostate cancer detection. *J Biomed Opt*. 2012;17:0760051.
18. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. Declaración PRISMA 2020: una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Rev Esp Cardiol*. 2021;74:790–9.
19. Quintana L, Ortega S, León R, Fabelo Himar y Callico GM, López C, Lejeune M, et al. Instrumentation Evaluation for Hyperspectral Microscopy Targeting Enhanced Medical Histology. 2021 XXXVI Conference on Design of Circuits and Integrated Systems (DCIS21). 345 E 47th St, New York, Ny 10017 USA: IEEE; 2021. p. 27–32.
20. Chlipala E, Bendzinski CM, Chu K, Johnson JI, Brous M, Copeland K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision. *J Histotechnol*. 2020;43:29–37.
21. Mansfield JR, Hoyt C, Levenson RM. Visualization of Microscopy-Based Spectral Imaging Data from Multi-Label Tissue Sections. *Curr Protoc Mol Biol*. 2008;84.
22. Liu W, Wang L, Liu J, Yuan J, Chen J, Wu H, et al. A comparative performance analysis of multispectral and RGB imaging on HER2 status evaluation for the prediction of breast cancer prognosis. *Transl Oncol (Internet)*. Translational Oncology Editorial Office; 2016;9:521–30.
23. Liu W-L, Wang L-W, Chen J-M, Yuan J-P, Xiang Q-M, Yang G-F, et al. Application of multispectral imaging in quantitative immunohistochemistry study of breast cancer: a comparative study. *Diagn Pathol*. 2013;8:76.
24. Oiknine Y, Abuleil M, Brozgol E, August IY, Barshack I, Abdulhalim I, et al. Compressive hyperspectral microscopy for cancer detection. *SPIE*; 2023;28:096502.
25. Mansfield JR. Multispectral imaging: a review of its technical aspects and applications in anatomic pathology. *Vet Pathol*. 2014;51(1):185–210.
26. Lee K, Lockhart JH, Xie M, Chaudhary R, Slebos RJC, Flores ER, et al. Deep Learning of Histopathology Images at the Single Cell Level. *Front Artif Intell*. 2021;4.
27. Boucheron LE, Bi Z, Harvey NR, Manjunath BS, Rimm DL. Utility of multispectral imaging for nuclear classification of routine clinical histopathology imagery. *BMC Cell Biol*. 2007;8.
28. Quintana L, Ortega S, León R, Fabelo H, Balea Fernández FJ, Sauras E, et al. In the use of artificial

- intelligence and hyperspectral imaging in digital pathology for breast cancer cell identification. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(9):1643.
29. Zhang S, Zeng S, Liao W, Tan RRZ, Olivo M. Label free cancer classification using hyperspectral imaging microscopy and machine learning. *CLEO/Europe-EQEC 2023 Conference Digest*. 2023; paper CL_P_4. ISBN: 979 8 3503 4599 5.
30. Chua JJ, Xin JCY, Zhang S, Olivo M. Label-Free Pathology Imaging with Multimodal Hyperspectral Microscopy for Breast Cancer Diagnosis. *Optics InfoBase Conference Papers*. 2022.
31. Irshad H, Gouaillard A, Roux L, Racocanu D. Multispectral band selection and spatial characterization: application to mitosis detection in breast cancer histopathology. *Comput Med Imaging Graph*. 2014;38(5):390-402.
32. Ortega S, Halicek M, Fabelo H, Guerra R, López C, Lejaune M, et al. Hyperspectral imaging and deep learning for the detection of breast cancer cells in digitized histological images. *Biomed Opt Express*. 2020;11(11):6425-6443.
33. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37:559-69.
34. Balkenhol MC, Ciompi F, Świdarska-Chadaj, van de Loo R, Intezar M, Otte-Höller I, et al. Optimized tumour infiltrating lymphocyte assessment for triple negative breast cancer prognostics. *Breast*. 2021;56:78-87.