

# Aplicación de técnicas espectroscópicas en la caracterización del cáncer de próstata.

Yuliia Fatych<sup>1, a</sup>, Jorge Recio Aldavero<sup>1, b</sup>, Ángeles Sanchís Bonet<sup>2, c</sup>, César Menor-Salván<sup>1, d</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Servicio de Urología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Ctra. Alcalá-Meco s/n, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. yuliia.fatych@gmail.com b. jorge.recio@hotmail.com c. angeles.sanchis@salud.madrid.org  
d. cesar.menor@uah.es

**Palabras clave:** biomarcador; cáncer de próstata; antígeno prostático específico; metabolómica no dirigida; GC-MS; Raman SERS

## Resumen

Los métodos de cribado y diagnóstico actuales en cáncer de próstata (CaP) son insuficientes, inespecíficos o invasivos, por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores y técnicas diagnósticas sigue siendo relevante clínicamente. En el presente estudio, la Espectroscopía Raman mejorada por superficies (SERS) de muestras de orina y el estudio quimiométrico mediante análisis de componentes principales (PCA) acoplado a análisis lineal discriminante (LDA) permite crear un sistema diagnóstico de CaP rápido, no invasivo y de bajo coste, posibilitando la identificación eficaz de CaP con una sensibilidad del 77.78 % y una especificidad del 100 %. A su vez, se aborda la búsqueda de biomarcadores propios del CaP mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en la que se sugiere que los metabolitos urinarios no son biomarcadores válidos para CaP.

**Cita:** Fatych, Yuliia; Recio Aldavero, Jorge; Sanchís Bonet, Ángeles; Menor-Salván, César (2022) Aplicación de técnicas espectroscópicas en la caracterización del cáncer de próstata. *dianas* 11 (2): e202209fa08. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202209fa08](http://www3.uah.es/dianas?e202209fa08) <http://www3.uah.es/dianas?e202209fa08>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Fatych Y, Recio-Aldavero J, Sanchís-Bonet, Menor-Salván C. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de cáncer en hombres, y la quinta en mortalidad mundial. En España, según datos del 2022, el CaP es el cáncer de mayor incidencia en varones [1]. Principalmente afecta a pacientes mayores de 55 años, siendo poco probable en hombres menores de 40 años. La edad media de diagnóstico oscila alrededor de los 66 años [2].

La mortalidad derivada del CaP se debe a una detección tardía con respecto a su diferenciación histológica, un largo periodo de latencia y métodos diagnósticos poco específicos [3]. Ello favorece que el 25% de los pacientes con CaP acaben desarrollando metástasis, siendo el hueso la principal diana [4].

Las técnicas de cribado actuales se fundamentan en la realización del examen rectal digital (ERD) y en la cuantificación del antígeno prostático específico (PSA) sérico [4]. El ERD identifica únicamente regiones anómalas adyacentes al recto con expresión cancerígena acentuada, presentando bajas probabilidades (20%) de detección de CaP. Además, la normalidad anatómica no descarta el cáncer [5, 6].

El PSA, una enzima exclusivamente prostática, se encuentra en bajas concentraciones en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando ocurre alguna patología prostática como el cáncer, la prostatitis o la hiperplasia benigna prostática, dichos valores se incrementan notablemente. Esto hace que el PSA carezca de especificidad frente al proceso cancerígeno [5, 7]. Además, individuos sanos pueden tener niveles elevados de PSA, promoviendo falsos positivos [8], así como pacientes con CaP pueden presentar niveles bajos de PSA, provocando falsos negativos [4].

La utilidad del PSA como biomarcador en el screening de CaP es objeto de discusión debido a su falta de especificidad y sensibilidad, y en especial, su coincidencia con la hiperplasia benigna de próstata [9].

Cuando la concentración de PSA sobrepasa los 4 ng mL<sup>-1</sup>, se realiza una biopsia transrectal guiada por ultrasonido (TRUS), el *gold standard* del diagnóstico de CaP. Sin embargo, muestra una baja sensibilidad y especificidad para detectar CaP [6]. Es un procedimiento invasivo que puede ocasionar dolor, hemorragias o infecciones [10]. En numerosas ocasiones, la biopsia no logra recoger la región afectada, produciendo falsos negativos. Para evitar ese riesgo, se realizan varias intervenciones (doce o más) [3]. Esto supone elevado estrés para los pacientes, ocasionando episodios de ansiedad ante la repetición de biopsias y el posible resultado positivo [5, 10]. Además de la incomodidad para el paciente, alto coste y

riesgo de falsos negativos, las biopsias innecesarias y el riesgo de sobrediagnóstico en pacientes con PSA > 2.5 ng ml<sup>-1</sup> son elevados [11].

La ausencia de un biomarcador consistente y específico para el diagnóstico de CaP une la necesidad de búsqueda de nuevos biomarcadores específicos a la de técnicas diagnósticas sensibles y no invasivas.

En el presente estudio se recurre al análisis de orina mediante espectroscopía Raman (ER) y quimiometría, evaluando las diferencias en los espectros Raman obtenidos de un grupo control y pacientes con CaP con el objetivo de establecer un nuevo método diagnóstico no invasivo, rápido y de bajo coste.

La ER es un tipo de espectroscopía vibracional sensible a moléculas covalentes y a sólidos no metálicos con red cristalina, siendo útil para el estudio tanto de macromoléculas biológicas como de metabolitos. Su bajo coste, rapidez y su capacidad para detectar pequeñas variaciones en las concentraciones relativas de biomoléculas le aporta potencial como herramienta diagnóstica [12]. Su utilidad se ha descrito en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de mama [13-15] o el cáncer de vejiga [16], así como estudios preliminares de diagnóstico de cáncer de próstata [17-19].

Debido a que algunos componentes se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica, se puede utilizar Espectroscopía Raman mejorada por superficies (SERS), que consiste en integrar nanoestructuras metálicas (normalmente nanopartículas de plata u oro) con la muestra al ejecutar el análisis Raman, produciéndose interacciones químicas y electrónicas entre los analitos y las nanopartículas metálicas, que conducen a una amplificación de la señal Raman, posibilitando la detección de componentes en la muestra en concentraciones nanomolares [20]. El incremento de la señal Raman posibilita la detección de analitos de interés [21]. Sin embargo, la técnica SERS encuentra aún una aplicación limitada debido a su difícil reproducibilidad, el requerimiento de la síntesis de nanopartículas y a la interacción variable de los analitos con éstas según sus características químicas [22].

Aun así, el diagnóstico no invasivo por SERS de muestras de orina es prometedor para patologías que provoquen un cambio en su composición. Su ventaja es la fácil recolección, abundancia y estabilidad en el almacenamiento, así como menor degradación proteolítica y complejidad en comparación a otras muestras biológicas [23]. En el caso del CaP, así como otras patologías del aparato genito-urinario, el diagnóstico por orina estaría especialmente indicado y los resultados preliminares obtenidos por los autores sugieren que las diferencias composicionales en la orina de pacientes con CaP y el grupo control son detectables mediante SERS con nanopartículas de plata (AgNP) sin pretratamiento de la muestra ni exploraciones en el paciente [24].

Dado el conocimiento actual, la espectroscopía Raman no da información directa de las moléculas responsables de las alteraciones composicionales de la orina en pacientes de CaP. Por ello, se lleva a cabo el estudio metabolómico de las muestras, con el objetivo de identificar posibles metabolitos de bajo peso molecular implicados, partiendo de la hipótesis de que bases nitrogenadas podrían estar implicadas [24]. De confirmarse, podríamos estar ante nuevos biomarcadores de potencial uso clínico. La estrategia consiste en el estudio metabolómico no orientado, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis no orientado consiste en obtener el perfil metabolómico global de la muestra y GC-MS es una técnica ideal al respecto, pues refleja en un solo cromatograma una imagen de los metabolitos presentes de peso molecular < 800 Da, gracias a su elevada resolución, a que se dispone de una extensa base de datos para la identificación directa de los mismos [25] y al conocimiento del metaboloma de la orina [26]. Un inconveniente de ésta técnica es el gran volumen de datos obtenidos, que convierte en la identificación de metabolitos un proceso lento. Asimismo, cubrir completamente todos los analitos implicados es muy difícil, debido a posibles sesgos introducidos en la preparación de la muestra.

Por ello, se realiza el *fingerprinting* metabolómico mediante el análisis quimiométrico de los datos de GC-MS con el objetivo de identificar variaciones consistentes en el perfil metabólico de la orina que permitan diferenciar entre muestras control y CaP. Esto permitiría, eventualmente, identificar los posibles biomarcadores desconocidos [27].

Además de ello, se emprende mediante GC-MS la caracterización y el estudio de la variación relativa de un panel de metabolitos específicos, seleccionados según dos criterios: ser candidatos a biomarcadores de CaP según los trabajos previos revisados en la literatura, o bien debido a su amplificación preferente mediante AgNP en la técnica SERS. Ello podría permitir explicar, en caso de resultados positivos, las variaciones encontradas en el estudio por Raman y proponer un *profiling* metabolómico para CaP con potencial utilidad clínica [28]. En caso contrario, podría sugerir que el modelo de predicción por CaP no sería explicable por componentes minoritarios, detectables por SERS pero por debajo del límite de cuantificación de GC-MS, sino por componentes de mayor peso molecular, como microRNA o exosomas.

## Materiales y métodos

### Recolección de muestra y grupos de estudio

Las muestras de orina de pacientes con CaP fueron facilitadas por el Servicio de Urología del Hospital Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid). Se analizaron 36 muestras (52-95 años) clasificadas según la puntuación Gleason de la biopsia (GB): 14 muestras GB6, 9 muestras GB7, 7 muestras GB8 y 6 muestras GB9 [29]. Todas las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  dentro de las 24h de su recolección.

Las muestras de orina del grupo control se recolectaron a partir de 25 voluntarios de la UAH fuera del grupo de riesgo de CaP (20-35 años), no sometidos a ningún tratamiento médico ni con patologías genito-urinarias confirmadas.

### Urinálisis quimiométrico mediante Raman-SERS

Se utiliza un protocolo modificado a partir de Cañamares y cols. [30]. Una disolución de  $\text{AgNO}_3$  en agua MiliQ ( $50\text{ mL } 10^{-3}\text{ M}$ ) se hierve en reflujo. Cuando se alcanza un burbujeo constante en el matraz, se añade 1 mL de disolución 1% de citrato trisódico en agua MiliQ. Se deja hirviendo durante 1 h.

El coloide formado se enfría a  $T^{\text{a}}$  ambiente. 1,5 mL del coloide se centrifuga a 6000 rpm durante 8 min. Se recogen 100  $\mu\text{L}$  aspirando el sedimento. Estas son las nanopartículas de plata (AgNP) que se usa en el análisis Raman-SERS.

Para el análisis SERS se añaden 5  $\mu\text{L}$  de AgNP a 5  $\mu\text{L}$  de orina sobre un portaobjetos de plata. El espectro se obtiene mediante un espectrómetro Raman *GlacierX* CCD de 2048 pixels enfriado por célula peltier de *B&W*Tek, acoplado mediante fibra óptica a un microscopio con sistema de epi-iluminación y con excitación *Cleanlaze* de 785 nm de *B&W*Tek en condiciones de oscuridad durante 40 s, con un objetivo para epifluorescencia de 20x y a una potencia de 20 mW. Los espectros obtenidos con el *software BWSpec4* se guardan en formato .txt y .spc (eje Y “*Dark Subtracted*”; eje X “*Raman Shift 8-3170*”).

### Metabolómica no orientada mediante GC-MS

Para el estudio metabolómico se utiliza un cromatógrafo de gases *Agilent 6890N Network GC System* con espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo *Agilent 5973 MSD (Agilent Technologies, Estados Unidos)* en modo *Split-less*. Las muestras se analizan tras extracción y transformación en trimetil-silil (TMS) derivados [31].

Brevemente, se toman 200  $\mu\text{L}$  de muestra de orina y se le agregan 2  $\mu\text{L}$  de ribitol ( $2\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ ) como patrón interno, así como 34 unidades de ureasa que degrada la urea durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se evitan así interferencias en el espectro GC-MS.

La muestra se extrae con 800  $\mu\text{L}$  de metanol (grado HPLC) y se homogeniza en vórtex durante 1 min. Se refrigera a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 min, para eliminar proteínas por precipitación. Se centrifuga a 6000 rpm durante 8 min, recogiendo 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. Dicha cantidad se evapora en un concentrador *speedvac*. Una vez secas, las muestras se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Los residuos extraídos se reconstituyen en 40  $\mu\text{L}$  de 20  $\text{mg mL}^{-1}$  de clorhidrato de metoxamina en piridina y se incuban a  $T^{\text{a}}$  ambiente durante 16 horas. Este paso convierte los cetoácidos en derivados de metoxima, facilitando la identificación.

Se derivatiza con 50  $\mu\text{L}$  de BSTFA-1% TMCS y se incuba 1 h a  $60^{\circ}\text{C}$ . Se le agrega 100  $\mu\text{L}$  de hexano y se deja en la estufa 4 min a  $90^{\circ}\text{C}$ . Por último, el contenido se traspara a un vial de vidrio con inserto (*Kimble 5.1, 2mL, SV02-C20-100, Labbox, España*) evitando cualquier fracción sólida no disuelta.

La muestra se analiza en el mismo día de preparación y se procesan los datos mediante *Masshunter (Agilent Technologies, Estados Unidos)* y *AMDIS*. La identificación de metabolitos se realiza por comparación con *standards* y las librerías *NIST* y *Golm Metabolome Database* [32].

Todos los materiales reactivos provienen de *Sigma Aldrich*, Estados Unidos.

### Análisis quimiométrico

Los análisis estadísticos *t* de *Student* se realizan mediante *GraphPad Prism 9.3.0* para dos grupos de muestras independientes. Los datos se representan mediante diagramas de cajas y bigotes después de comprobar la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (F-test).

El análisis de componentes principales (PCA), el análisis lineal discriminante (LDA) y los modelos predictivos se ejecutan mediante *The Unscrambler X 10.4* para ambos tipos de espectros, Raman-SERS y GC-MS, tras el preprocesamiento de la señal mediante corrección de línea base y normalización SNV (*standard normal variate*) [33].

El PCA permite representar gráficamente las diferencias y las similitudes de los grupos de estudio por agrupación o *clustering* sin conocimiento previo de las variaciones en la muestra (método no supervisado) [34]. En él, los espectros se reducen a un número menor de componentes principales (PC), que representan la información más relevante de los espectros y serán los ejes de coordenadas [35]. Sujetos con una composición molecular similar tenderán a agruparse juntos.

Debido a que el PCA es un análisis no supervisado, no se utiliza directamente como método de clasificación o predictivo. Por esta razón, se recurre al LDA, un método supervisado que clasifica las muestras según una variable categórica definida previamente (en este caso, control vs. CaP). El LDA va a maximizar la variación entre los grupos con respecto a la variación intragrupal, garantizando la máxima separación entre las categorías establecidas [36]. Esto permite averiguar la exactitud, la sensibilidad y la especificidad de la clasificación y crear un modelo predictivo que permite la clasificación de muestras desconocidas según categorías [18]. Si bien LDA es considerado un método más potente, en este trabajo se complementa con otro modelo predictivo basado en PCA: el modelado independiente de analogías de clases (SIMCA). Este tiene la ventaja de su mayor flexibilidad, es apropiado para datos espectroscópicos y permite clasificar la muestra evaluando si puede pertenecer a más de una clase, reduciendo el riesgo de artefactos matemáticos del LDA [37].

## Resultados

### Urinálisis quimiométrico mediante Raman-SERS

El PCA obtenido tras el método de Raman-SERS indica que existen diferencias moleculares medibles entre los sujetos control y los pacientes CaP (Fig. 1. A). Esto permite agrupar ambos grupos por su categoría, diferenciándolos entre sí. Este resultado confirma los resultados previos obtenidos con un número muestral inferior [24]. Para clasificar muestras desconocidas y averiguar la calidad de la clasificación se recurre a LDA (Fig. 1. B). Todos los 25 individuos controles fueron clasificados correctamente, siendo la especificidad del 100 %. Sin embargo, 8 sujetos de 36 pacientes CaP fueron etiquetados como controles sanos, por lo que la sensibilidad bajó al 77.78 %. Por ello, la exactitud general fue 86.89 %.

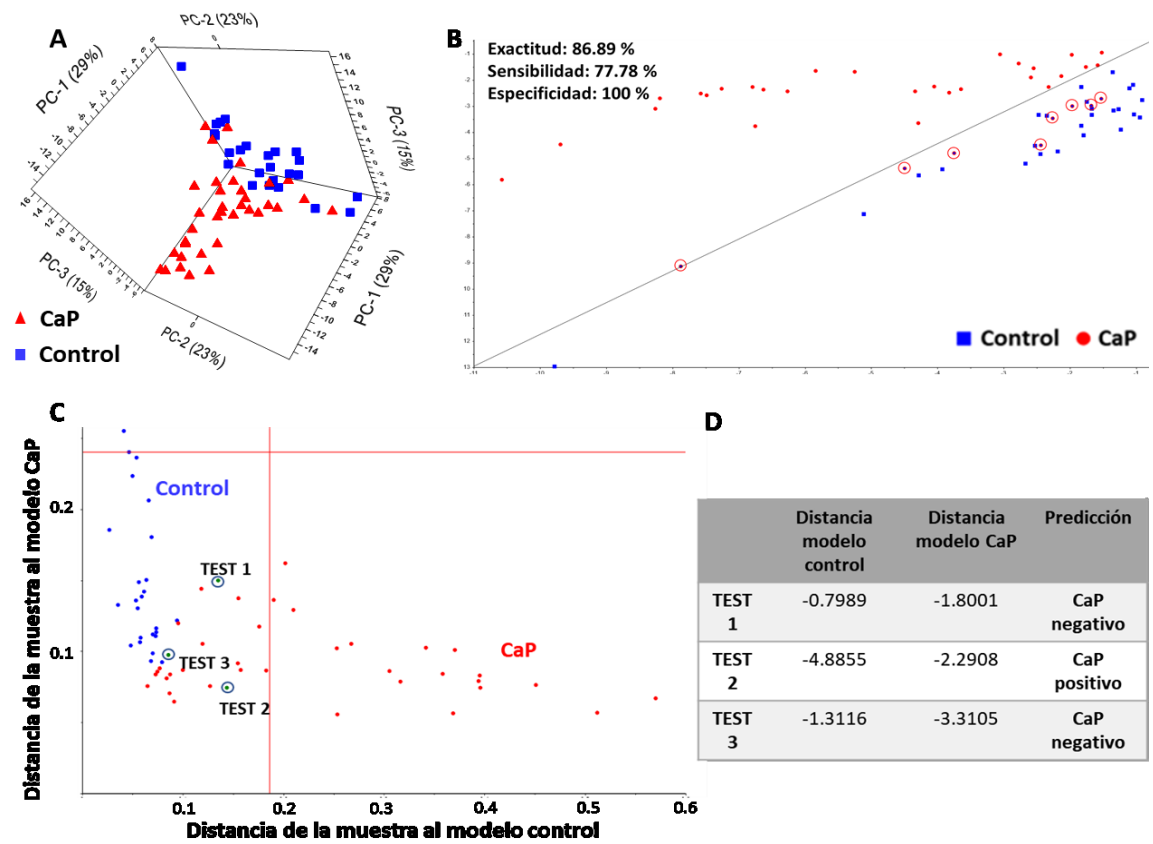


Figura 1.- Análisis multivariante de pacientes CaP y control. A) PCA y B) LDA para la clasificación de las muestras de orina. Circunferencias rojas indican falsos negativos de pacientes con CaP C) Diagrama de Coomans para la clasificación de muestras test. Las líneas rojas indican el intervalo de confianza del 95%. El agrupamiento de ambas categorías hacia el origen de coordenadas indica el riesgo de clasificaciones ambiguas. D) Predicción del test SERS en muestras test usando el modelo LDA.

Los datos de Raman se ponen a prueba a través del modelo predictivo SIMCA. Para ello, se utilizan tres muestras de test, una con un positivo clínico de CaP, una muestra de control y una muestra desconocida, previa a su revisión clínica. Se obtiene el diagrama de Coomans (Fig. 1. C) que, si bien muestra una clasificación correcta de las muestras de test (Fig. 1. D), a un nivel de significancia del 5%, los grupos son muy próximos y las muestras de control negativos ofrecen ambigüedad, debido a que las diferencias en los espectros Raman son pequeñas y, posiblemente, sea necesario aumentar el tamaño muestral del modelo.

### Fingerprinting metabolómico mediante GC-MS

El PCA obtenido a partir de datos GC-MS de 12 individuos controles y 14 pacientes CaP no permite ver ninguna tendencia clara al *clustering* de diferentes grupos (Fig. 2. A). Por tanto, no se puede tener la certeza de percibir diferencias metabolómicas mediante espectrometría de masas.

Además, el LDA presentó una sensibilidad baja (57,14 %) al clasificar erróneamente 6 de 14 pacientes, prácticamente la mitad (Fig. 2. B.). La especificidad (75 %) también se vio comprometida: 3 de 12 controles se etiquetaron como falsos positivos. Por ello, la exactitud general fue 65.38 %.

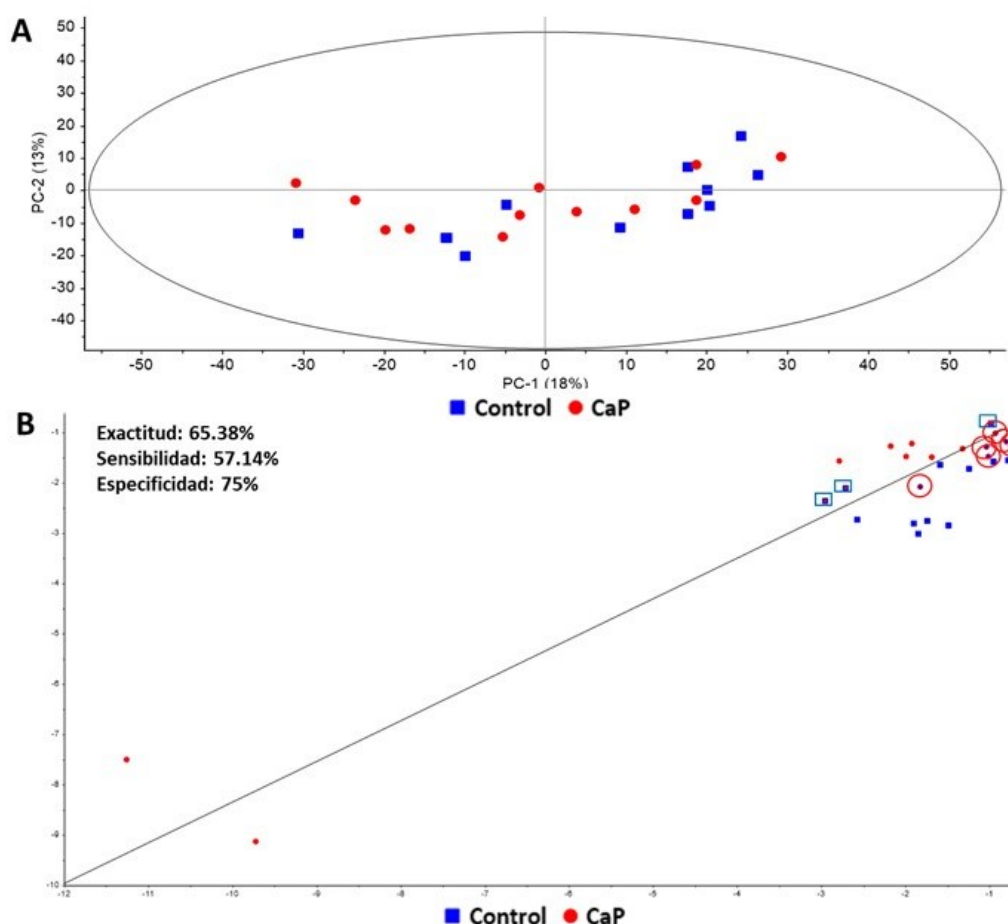


Figura 2.- Análisis multivariante de pacientes CaP y control. A) PCA de los datos totales de GC-MS. B) LDA modelado a partir del PCA de los cromatogramas totales de GC-MS. Circunferencias rojas indican falsos negativos de pacientes con CaP. Rectángulos azules señalan falsos positivos de individuos control. El modelo predictivo con GC-MS es muy pobre por sensibilidad y especificidad bajas.

### Profiling metabolómico mediante GC-MS

Para comprobar el resultado del PCA obtenido mediante GC-MS, en el cual no se intuye variación metabolómica entre el estado sano y cancerígeno, se decide analizar un panel de metabolitos de 14 pacientes sanos y 14 pacientes con CaP.

De 15 moléculas analizadas, sólo 2 presentaron diferencias estadísticamente significativas: mio-inositol y ácido cítrico, estando ambos aumentados en CaP (Fig. 3). A pesar de que el p-valor calculado sugiere una diferencia significativa, la varianza de los datos indica que las diferencias observadas no tienen aplicabilidad para su análisis sistemático como biomarcador.

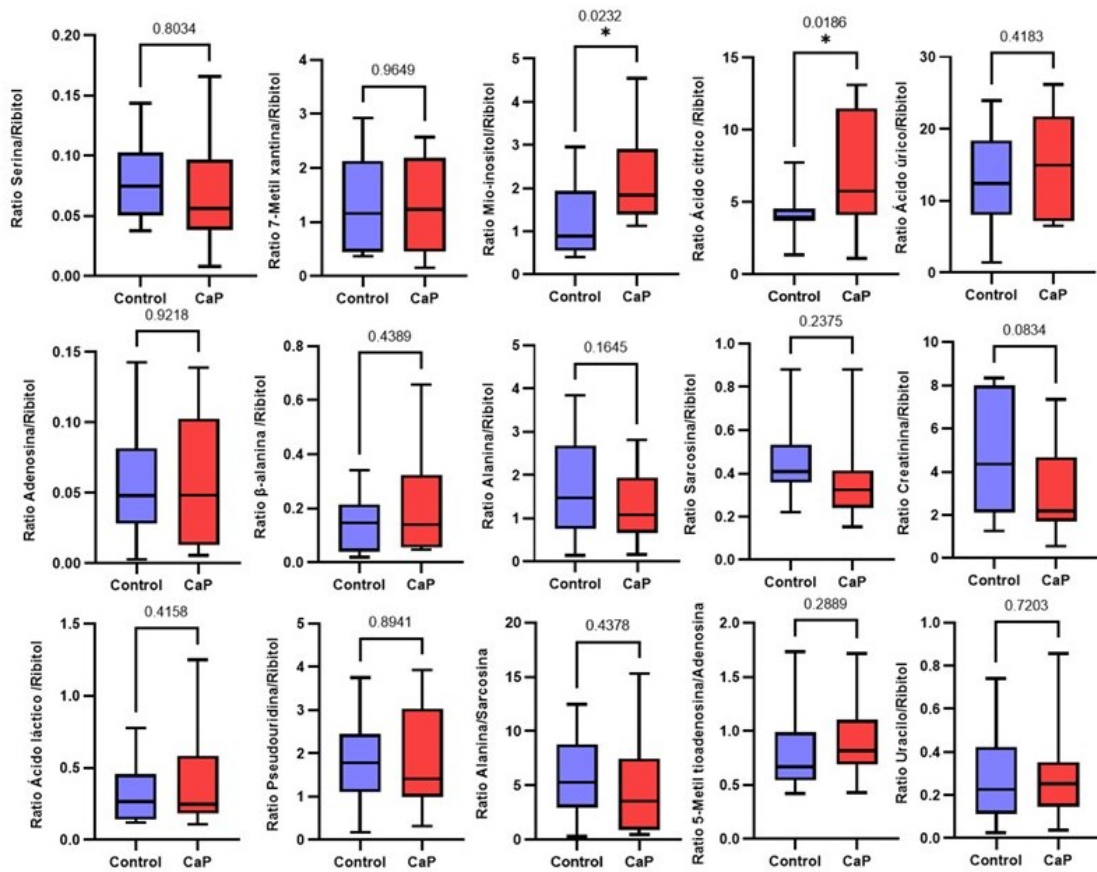


Figura 3.- *Profiling* de biomarcadores mediante GC-MS (t-student, \*: p-valor <0.05). El p-valor se muestra numéricamente en la parte superior del gráfico.

## Discusión

La ausencia de técnicas adecuadas para el diagnóstico no invasivo de CaP así como la ineficiencia del PSA como biomarcador pone de manifiesto la necesidad de búsqueda de nuevas herramientas diagnósticas.

El análisis de orina por Raman-SERS revela que la composición urinaria de los pacientes con CaP difiere de los sujetos sanos. El estudio estadístico derivado (Fig. 1) utiliza la información molecular de todos los componentes sensibles a dicho análisis para clasificar la muestra según las categorías de control y CaP. Ello permite establecer un modelo predictivo de CaP a partir de SERS.

El método de cribado basado en Raman-SERS no necesita la identificación de moléculas individuales para poder detectar CaP. Además, recientemente los estudios se centran en señalar que ninguna molécula concreta, o subconjunto pequeño, son indicativos de cáncer. Se trata de una combinación de numerosas entidades moleculares, muchas desconocidas en este momento, que hacen que las muestras de pacientes con cáncer difieran de los sanos [4, 38].

Para poder encontrar la causa de variación molecular en el análisis Raman-SERS y emprender la búsqueda de nuevos biomarcadores, se recurre al análisis no orientado por GC-MS. El *fingerprinting* metabolómico derivado (Fig. 2) demuestra que las diferencias en la composición general de metabolitos de bajo peso molecular entre los grupos de estudio son mínimas. Para corroborar los anteriores resultados, estudiamos el panel de biomarcadores seleccionados según su implicación en CaP o su sensibilidad a la amplificación por AgNP.

Uno de los biomarcadores más estudiados con respecto al diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata es la sarcosina. Se ha demostrado que durante el progreso cancerígeno se altera el metabolismo energético para favorecer procesos costosos como la proliferación o la metástasis. Incrementa el metabolismo de los aminoácidos y las metilaciones de éstos [39, 40]. Es por ello que, este N-metil derivado de la glicina, ha demostrado gran interés como posible candidato diagnóstico.

Sreekumar y cols. probaron por primera vez que la sarcosina estaba aumentada en la orina de pacientes con CaP respecto a pacientes sanos [39]. A esta afirmación se les sumaron otros estudios [40, 41]. Sin embargo, la controversia no tardó en llegar y otros autores afirmaron que la sarcosina estaba disminuida en CaP [42] o que no se encontraban diferencias estadísticamente significativas [43]. En el presente

artículo no se encuentra diferencia entre el grupo CaP y el grupo control que permita establecer la sarcosina como un biomarcador (Fig. 3). Este resultado es consistente con el análisis SERS, dado que la sarcosina no es detectable mediante las AgNP utilizadas [24].

La literatura acerca de la aplicación de SERS a biofluidos es aún escasa. La técnica SERS en orina parece ser sensible a metabolitos abundantes en la misma como la creatinina o el ácido úrico, así como derivados de bases [44, 45]. El denominador común a todas esas moléculas es su naturaleza de base nitrogenada. Por ello, la metabolómica no dirigida mediante GC-MS de este artículo se ha centrado en analizar metabolitos con dicha estructura molecular (5-metil-tioadenosina, uracilo, creatinina, ácido úrico, adenosina, 7-metil-xantina y pseudouridina). Sin embargo, estos candidatos no han presentado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Fig. 3).

Otro de los metabolitos, el mio-inositol, aparece significativamente aumentado en orina de CaP (Fig. 3). Estos resultados apoyan los propuestos por Wang y cols. [38], donde el mio-inositol está incrementado en el plasma de pacientes de CaP. Este metabolito se produce a partir de la glucosa y su amplificación se da en rutas relacionadas con el metabolismo del ascorbato y aldarato, rutas alteradas en el CaP [38]. Sin embargo, la variación de la concentración del mio-inositol parece ser dependiente de la localización. En 2008 se concluye que el mio-inositol puede ser un biomarcador del CaP en secreciones prostáticas a través resonancia magnética nuclear (1H-RMN) debido a que está disminuido significativamente [46]. Esta característica, y su papel general en el metabolismo, añade dificultad a la hora de proponer el mio-inositol como biomarcador.

Estos investigadores también plantean la serina como biomarcador en conjunto con el mio-inositol [37], pero en este estudio no aparecen diferencias estadísticas en este aminoácido (Fig. 3). De la misma manera ocurre con la alanina o la  $\beta$ -alanina, aminoácidos sin ninguna alteración entre ambos grupos, propuestos como metabolitos alterados en CaP [3, 4].

En este artículo, el citrato aparece estadísticamente aumentado en los pacientes con CaP. Sin embargo, debido a la alta demanda energética de las células cancerosas, el citrato tiende a disminuir por oxidación [4, 47-49]. Por otro lado, una de las principales funciones de las células prostáticas es sintetizar gran cantidad de citrato que irá a formar parte del líquido prostático [4]. Una posible razón que apoye que el citrato esté aumentado en CaP podría residir en las primeras fases de malignización de dichas células, donde se dé un incremento en la síntesis de citrato. Esto sería coherente puesto que la mayor parte de los pacientes CaP son GB6, es decir, pacientes en las etapas más tempranas del CaP. Por todo ello, las contradicciones encontradas descartan el citrato como biomarcador.

Algunos autores sugieren alteraciones en el metabolismo de esteroides en CaP [3, 4]. El papel ambiguo de las diferentes hormonas esteroides pueden demostrar tanto un efecto protector sobre la glándula prostática como promover el desarrollo de CaP. Sin embargo, en este estudio no se ha podido identificar correctamente los metabolitos relacionados con dichas entidades moleculares, por lo que una de futura propuesta sería diseñar un protocolo de fraccionamiento detallado de la orina, permitiendo así una mejora en la identificación y cuantificación de los metabolitos por sus familias moleculares. Esto podría ser coherente con los resultados Raman-SERS puesto que, al tratarse de una técnica amplificadora de la señal, del orden de  $10^{11}$  a  $10^{17}$  [21], algunos metabolitos pueden quedar fuera del límite de detección del GC-MS.

Además, para confirmar las tendencias de *clustering* por Raman-SERS y GC-MS, se requiere de una mayor cantidad de sujetos de estudio, así como información clínica más detallada de los mismos puesto que diferentes patologías pueden tener gran repercusión molecular en la orina.

Estos resultados sugieren que los responsables moleculares de la clasificación por Raman-SERS no parecen hallarse entre los metabolitos detectados por GC-MS. Es por ello que, deberían existir otras entidades moleculares capaces de interactuar con AgNP que expliquen los cambios composicionales de la orina observados por SERS. Un ejemplo podría ser los exosomas, secretados por células cancerígenas podrían contener moléculas alteradas como ARN<sub>m</sub>, proteínas, lípidos y microRNAs (encontrados también de forma libre en orina) [50, 51].

## Conclusiones

Se confirma que, la técnica Raman-SERS con análisis quimiométrico basado en un modelo de reducción de variables basado en PCA/ LDA posibilita la detección CaP con alta especificidad y sensibilidad utilizando una gota de orina. En la práctica clínica, la detección de CaP por Raman-SERS podría mejorar el *screening* de dicha patología, gracias a su simplicidad y bajo coste. Además, podría expandirse al análisis de otros tipos de cáncer mediante otros tipos de biofluidos.

Dado que los resultados de SERS sugieren una variación sistemática en la composición, se realiza el estudio metabolómico no orientado por GC-MS, que sugiere que los metabolitos de peso molecular < 800 Da disueltos en orina no pueden explicar las variaciones observadas por SERS a las concentraciones detectables por espectrometría de masas. Este resultado sugiere además, que la sarcosina, 5-metil-

tioadenosina, alanina y adenosina, metabolitos propuestos en trabajos previos, no son biomarcadores de CaP. Sin poder descartar que haya metabolitos implicados, detectables por SERS pero a concentración inferior al límite de detección de GC-MS, los resultados sugieren que, macromoléculas o estructuras, como los exosomas o los microRNA, podrían ser responsables de las diferencias halladas en el análisis por SERS y no identificadas en este estudio.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Miren Gómez Juaristi del Centro de Apoyo a la Investigación (UCM) por su ayuda en este proyecto y a la Prof. Ana M. Bajo Chueca por su apoyo y comentarios que han ayudado a mejorar este trabajo.

## Referencias

1. Cancer Today. 2022 (02 june). In Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. Hugosson, J., Roobol, M.J., Månsson, M., Tammela, T.L.J., Zappa, M., Nelen, V., ... and A. Auvinen. 2019. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *European Urology*, 76(1): 43–51.
3. Struck-Lewicka, W., Kordalewska, M., Bujak, R., Yumba Mpanga, A., Markuszewski, M., Jacyna and M.J. Markuszewski. 2015. Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111(1):351–361.
4. Lima, A. R., Bastos, M. de L., Carvalho, M. and P. Guedes de Pinho. 2016. Biomarker discovery in human prostate cancer: An update in metabolomics studies. *Translational Oncology*, 9(4): 357–370.
5. Gholizadeh, N., Pundavela, J., Nagarajan, R., Dona, A., Quadrelli, S., Biswas, T and S. Ramadan. 2020. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of human body fluids and in vivo magnetic resonance spectroscopy: Potential role in the diagnosis and management of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 38(4):150–173.
6. Wang, R., Chen, J.J., and B. Hu. 2015. Transrectal real-time elastography-guided transperineal prostate biopsy as an improved tool for prostate cancer diagnosis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4):6522–6529.
7. Litwin, M.S. and H.-J. Tan. 2017. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *JAMA*, 317(24):2532.
8. Moradi, A., Srinivasan, S., Clements, J., and J. Batra. 2019. Beyond the biomarker role: prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(3):333–346.
9. Kiebish, M.A., Tekumalla, P., Ravipaty, S., Dobi, A., Srivastava, S., Wu, W., ... and N.R. Narain. 2021. Clinical utility of a serum biomarker panel in distinguishing prostate cancer from benign prostate hyperplasia. *Scientific reports*, 11(1):1-9.
10. Hoffman, R.M. 2011. Screening for prostate cancer. *The New England Journal Of Medicine*. 365(21):2013-9.
11. Kim, J. H., and S.K. Hong. 2021. Clinical utility of current biomarkers for prostate cancer detection. *Investigative and clinical urology*, 62(1):1–13.
12. Zhang, C., Han, Y., Sun, B., Zhang, W., Liu, S., Liu, J., ... and X. Kang. 2020. Label-free serum detection based on Raman spectroscopy for the diagnosis and classification of glioma. *Journal of Raman Spectroscopy*, 51(10):1977-1985.
13. Nargis, H.F., Nawaz, H., Bhatti, H.N., Jilani, K., and M. Saleem. 2021. Comparison of surface enhanced Raman spectroscopy and Raman spectroscopy for the detection of breast cancer based on serum samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246:119034.
14. Penders, J., Nagelkerke, A., Cunnane, E.M., Pedersen, S.V., Pence, I.J., Coombes, R.C., and M.M. Stevens. 2021. Single particle automated Raman trapping analysis of breast cancer cell-derived extracellular vesicles as cancer biomarkers. *ACS nano*, 15(11):18192-18205.
15. Lin, Y., Gao, J., Tang, S., Zhao, X., Zheng, M., Gong, W., ... and J. Lin. 2021. Label-free diagnosis of breast cancer based on serum protein purification assisted surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 263:120234.



16. Hu, D., Xu, X., Zhao, Z., Li, C., Tian, Y., Liu, Q., and Y. Zeng. 2021. Detecting urine metabolites of bladder cancer by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 247:119108.
17. Ma, Y., Chi, J., Zheng, Z., Attygalle, A., Kim, I. Y., and H. Du. 2021. Therapeutic prognosis of prostate cancer using surface-enhanced Raman scattering of patient urine and multivariate statistical analysis. *Journal of Biophotonics*, 14(1):202000275.
18. Stefancu, A., Moisoiu, V., Couti, R., Andras, I., Rahota, R., Crisan, D., ... and N. Crisan. 2018. Combining SERS analysis of serum with PSA levels for improving the detection of prostate cancer. *Nanomedicine*, 13(19):2455–2467.
19. Correia, N.A., Batista, L.T., Nascimento, R.J., Cangussú, M.C., Cruzeira, P.J., Soares, L.G., ... and A.L. Pinheiro. 2020. Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: A multivariate study on patients with normal and altered PSA values. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204:111801.
20. Kneipp, K., Kneipp, K., Kneipp, H., Kneipp, H., Itzkan, I., Itzkan, I., Dasari, R.R., Dasari, R.R., Feld, M.S., and M.S. Feld. 1999. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy, *Chemical reviews*, 99(10):2957–76.
21. Halvorson, R.A., and P.J. Vikesland. 2010. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for environmental analyses. *Environmental Science and Technology*, 44(20):7749–7755.
22. Grys, D.B., Chikkaraddy, R., Kamp, M., Scherman, O.A., Baumberg, J.J., and B. Nijs. 2021. Eliminating irreproducibility in SERS substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(2):412–419.
23. Wu, D., Ni, J., Beretov, J., Cozzi, P., Willcox, M., Wasinger, V., ... and Y. Li. 2017. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 118:15–26.
24. Fatych, Y. 2021. Fingerprinting metabólico de muestras de orina y caracterización de nuevos biomarcadores de cáncer. Aplicación en el diagnóstico temprano y no invasivo de cáncer de próstata. Trabajo Fin de Grado. Alcalá de Henares. España. Universidad de Alcalá.
25. Engel, B., Suralik, P., and M. Marchetti-Deschmann. 2020. Critical considerations for trimethylsilyl derivatives of 24 primary metabolites measured by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Separation Science Plus*, 3(9):407–418.
26. Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A.C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T.C., and D.S. Wishart. 2013. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, 8(9):73076.
27. Kosmides, A.K., Kamisoglu, K., Calvano, S.E., Corbett, S. A., and I.P. Androulakis. 2013. Metabolomic fingerprinting: Challenges and opportunities. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 41(3):205–221.
28. Weljie, A.M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., and C.M. Slupsky. 2006. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. *Analytical chemistry*, 78(13):4430–4442.
29. Chen, N. and Q. Zhou. 2016. The evolving gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1):58–64.
30. Cañamares, M.V., Garcia-Ramos, J.V., Gómez-Varga, J.D., Domingo, C., and S. Sanchez-Cortes. 2005. Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag<sup>+</sup> using citrate and hydroxylamine. *Langmuir*, 21(18):8546–8553.
31. Kim, J., Ahn, J.K., Cheong, Y. E., Lee, S.-J., Cha, H.-S. and K.H. Kim. 2020. Systematic re-evaluation of the long-used standard protocol of urease-dependent metabolome sample preparation. *PLOS ONE*, 15(3):1–20.
32. Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D. and J. Kopka. 2010. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics*, 6(2):322–333.
33. Guo, S., Popp, J., and T. Bocklitz. 2021. Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning-based modeling. *Nature Protocols*, 16(12):5426–5459
34. Fisher, A.K., Carswell, W.F., Athamneh, A.I.M., Sullivan, M.C., Robertson, J.L., Bevan, D.R., and R.S. Senger. 2018. The Rametrix™ LITE Toolbox v1.0 for MATLAB®. *Journal of Raman Spectroscopy*, 49(5):885–896.
35. Ong, Y.H., Lim, M., and Q. Liu. 2012. Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells: errata. *Optics Express*, 20(22):25041.

36. Tharwat, A., Gaber, T., Ibrahim, A., and A.E. Hassanien. 2017. Linear discriminant analysis: A detailed tutorial. *AI Communications*, 30(2):169–190.
37. Magdas, D.A., Guyon, F., Berghian-Grosan, C., and C.M. Molnar. 2021. Challenges and a step forward in honey classification based on Raman spectroscopy. *Food Control*, 123:107769.
38. Wang, W., He, Z., Kong, Y., Liu, Z., and L. Gong. (2021). GC-MS-based metabolomics reveals new biomarkers to assist the differentiation of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clinica Chimica Acta*, 519:10-17.
39. Sreekumar, A., Poisson, L.M., Rajendiran, T. M., Khan, A.P., Cao, Q., Yu, J., ... and A.M. Chinnaiyan. 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 457(7231):910–914.
40. Pérez-Rambla, C., Puchades-Carrasco, L., García-Flores, M., Rubio-Briones, J., López-Guerrero, J. A., and A. Pineda-Lucena. 2017. Non-invasive urinary metabolomic profiling discriminates prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *Metabolomics*, 13(5):0.
41. Ploussard, G., and A. De La Taille. 2010. Urine biomarkers in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 7(2):101–109.
42. Gkotsos, G., Virgiliou, C., Lagoudaki, I., Sardeli, C., Raikos, N., Theodoridis, G., and G. Dimitriadis. 2017. The role of sarcosine, uracil, and kynurenic acid metabolism in urine for diagnosis and progression monitoring of prostate cancer. *Metabolites*, 7(1).
43. Wu, H., Liu, T., Ma, C., Xue, R., Deng, C., Zeng, H., and X. Shen. 2011. GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(2):635–646.
44. Mistro, G. Del, Cervo, S., Mansutti, E., Spizzo, R., Colombatti, A., Belmonte, P., ... and A. Bonifacio. 2015. Surface-enhanced raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: A preliminary study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(12): 3271–3275.
45. Wang, T.L., Chiang, H.K., Lu, H.H., and F. Y. Peng. 2005. Semi-quantitative surface enhanced Raman scattering spectroscopic creatinine measurement in human urine samples. *Optical and quantum electronics*, 37(13):1415-1422.
46. Serkova, N.J., Gamito, E.J., Jones, R.H., O'Donnell, C., Brown, J.L., Green, S., ... and E.D. Crawford. 2008. The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *The Prostate*, 68(6):620-628.
47. Garcia-Segura, J.M., Sanchez-Chapado, M., Ibarburen, C., Viano, J., Angulo, J.C., Gonzalez, J., and J.M. Rodriguez-Vallejo. 1999. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of diseased prostate: spectroscopic features of malignant versus benign pathology. *Magnetic Resonance Imaging*, 17:755–765.
48. Hahn, P., Smith, I.C., Leboldus, L., Littman, C., Somorjai, R.L., and T. Bezabeh. 1997. The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of <sup>1</sup>H magnetic resonance spectra. *Cancer Research*, 57:3398–3401.
49. Cheng, L.L., Wu, C., Smith, M.R., and R.G. Gonzalez. 2001. Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *FEBS Letters* 494: 112–116.
50. Øverbye, A., Skotland, T., Koehler, C.J., Thiede, B., Seierstad, T., Berge, V., ... and A. Llorente. 2015. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget*, 6(30):30357.
51. Korzeniewski, N., Tosev, G., Pahernik, S., Hadaschik, B., Hohenfellner, M., and S. Duensing. 2015. Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33(1):16-17.

w\_title

w\_authors

w\_address

w\_mail

w\_keywords

**w\_abstract\_caption**

w\_abstract

<p>w_citation w_citation</p>
----------------------------------

**M\_Head\_1**

M\_Texto

**M\_Head\_2**

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aliquam malesuada libero fermentum, placerat elit volutpat, consequat mi. Maecenas sit amet tristique purus. Nam varius enim dignissim tellus dignissim sollicitudin ut vel augue. Duis dapibus ante eget mattis maximus. Aenean ultricies lobortis finibus. Sed feugiat mi mauris, quis aliquet nibh placerat ac. Aliquam tempor porttitor sapien, vel malesuada tortor dapibus quis. Vestibulum in tincidunt ligula. Quisque cursus rutrum eros, in accumsan nunc sollicitudin et. Sed gravida tincidunt congue. Vivamus faucibus tristique nibh, a elementum lectus accumsan sed. Vivamus vestibulum arcu id vestibulum rutrum. Nulla fringilla justo et metus rutrum, in dapibus quam molestie.

Figura M\_Texto centered

Figura 1.- M\_Pie\_figura Cras vitae diam id tortor venenatis mollis. Maecenas convallis porta ex, a gravida elit pulvinar sit amet. Nam vehicula pellentesque sodales. Mauris erat orci, aliquam eleifend lobortis sed, volutpat at diam. Aliquam in lacus ac magna hendrerit feugiat. Nullam volutpat convallis velit id viverra. Donec commodo risus arcu, et viverra dui pharetra eget.

Vivamus lacinia mollis commodo. Donec auctor libero ac nunc luctus sollicitudin. Pellentesque dignissim auctor pharetra. Nunc laoreet semper mi sit amet vulputate. Suspendisse sagittis semper justo sit amet elementum. Nam ut nisi sed justo mollis aliquam sed eu tellus. Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. In ac ultricies nibh.

M_Tabla_head	M_Tabla_head	M_Tabla_head
M_Tabla	M_Tabla	M_Tabla
M_Tabla	M_Tabla	M_Tabla

Tabla 1.- M\_Pie\_figura Cras vitae diam id tortor venenatis mollis. Maecenas convallis porta ex, a gravida elit pulvinar sit amet. Nam vehicula pellentesque sodales. Mauris erat orci, aliquam eleifend lobortis sed, volutpat at diam. Aliquam in lacus ac magna hendrerit feugiat. Nullam volutpat convallis velit id viverra. Donec commodo risus arcu, et viverra dui pharetra eget.

Proin at cursus enim, quis pellentesque ipsum. Sed porta vitae neque sit amet eleifend. Fusce a dolor pulvinar, tempor massa at, laoreet orci. Cras diam erat, rhoncus vitae felis nec, malesuada laoreet massa. Ut lacinia dignissim mi, sit amet rutrum tellus blandit laoreet. Interdum et malesuada fames ac ante ipsum primis in faucibus. Curabitur in nisi vitae ligula dictum venenatis a at justo. Fusce sed lorem scelerisque lacus viverra iaculis vitae non nisl. Donec accumsan lorem tellus, non maximus ipsum consectetur et. Vivamus pulvinar ornare est et semper. Phasellus sed ligula ligula. Morbi vitae erat in elit pulvinar maximus. Integer venenatis massa et arcu venenatis, pretium fermentum sem mollis. Vivamus tincidunt ante ultricies imperdiet venenatis. Duis malesuada congue maximus.

Pellentesque sed sagittis orci. Ut risus metus, viverra ac hendrerit sed, mattis sit amet lectus. Morbi finibus in libero in finibus. Mauris lacinia, turpis in aliquet ullamcorper, libero neque hendrerit quam, at molestie lectus quam quis ligula. Nullam mattis aliquet lectus. Ut metus lorem, aliquam nec ultrices sit amet, vulputate eu lacus. Nulla malesuada, nunc quis hendrerit mollis, erat sem hendrerit nisi, eget vestibulum arcu massa vitae elit. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Mauris commodo nibh eget lorem pellentesque ultricies vel at dui. Aliquam rhoncus ultricies mauris vel porta.

Donec mattis purus ut sapien fringilla efficitur. Aenean ultrices laoreet leo sit amet semper. Nulla vulputate felis eu dui ultrices, in dapibus leo consectetur. Maecenas blandit orci dui, sit amet blandit felis semper nec. Nullam a sollicitudin ante, at auctor ligula. Aenean vitae vulputate est. Praesent sollicitudin porttitor libero, et tincidunt odio tincidunt non. Fusce quis aliquet ipsum. Donec ornare nibh eu hendrerit pellentesque. Etiam malesuada congue nibh eu rutrum. Quisque imperdiet sapien vel augue laoreet, nec

fringilla leo porttitor. Phasellus a sodales orci, ac ornare nunc. Nulla consequat volutpat orci vel posuere. Vestibulum non cursus ipsum, vel fringilla massa.

Cras pharetra, massa ac hendrerit dictum, mauris lectus feugiat risus, at aliquam nulla dolor in nisl. Fusce consetetur quam nisi, sit amet dapibus magna congue in. Donec quis ante nunc. Proin dapibus suscipit convallis. Praesent malesuada nisi et consetetur aliquam. Donec ac euismod leo. Pellentesque ut mauris mi. Cras consequat est urna, quis rutrum metus consetetur ac.

Ut tempus placerat ligula. Nullam ac quam ligula. In rutrum felis vitae facilisis malesuada. Morbi ut vestibulum orci, quis vestibulum mi. Ut sem diam, pharetra vel ante in, ornare commodo sapien. Pellentesque ut nulla ultrices, varius turpis viverra, fringilla metus. Nam in semper est, id iaculis mauris. Quisque enim lectus, ullamcorper vel condimentum eget, faucibus sed nisl. Sed quis elit eget nisl mattis sollicitudin.

Curabitur pharetra feugiat rutrum. Sed commodo suscipit dignissim. Etiam lorem lectus, consetetur vitae

## Referencias M\_Head\_1

M\_Referencia

## **Material Suplementario M\_Head\_1**