

## **Análisis y caracterización de espectros Raman de tejido neoplásico e hiperplásico de próstata**

Karen Andrea Guerrero Enríquez<sup>1</sup>, Octavio Jiménez González<sup>1</sup>,  
Roberto Pacheco López<sup>2</sup>, Javier Medrano Sánchez<sup>2</sup>, Mario Murguía Pérez<sup>2</sup>,  
Angélica Hernández Rayas<sup>1</sup>, Martha Alicia Hernández González<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Guanajuato,  
División de Ciencias e Ingenierías,  
México

<sup>2</sup> Unidad Médica de Alta Especialidad,  
Hospital de Especialidades No.1. CMN del Bajío IMSS,  
México

**Resumen.** Desde finales del siglo XX, la espectroscopía Raman se ha utilizado para abordar distintos temas biomédicos, ya que es una técnica espectroscópica vibratoria que proporciona información sobre la estructura y composición química de células y tejidos. Este tejido es iluminado con un láser, en donde una fracción de los fotones es dispersada inelásticamente debido al enlace intramolecular presente. Los fotones que interactúan con los diferentes enlaces bioquímicos de los tejidos experimentan un estado vibracional específico, los cuales dan como resultado el espectro Raman. Proponer un protocolo de medición para evaluación de cáncer de próstata. Para realizar este trabajo se utilizaron muestras de tejido de próstata fijadas en cubos de parafina, estos se encontraban previamente clasificados en tejido neoplásico (tejido con cáncer) e hiperplásico (tejido sin cáncer) Los cubos de parafina fueron cortados en un grosor de 10 micras, y posteriormente desparafinados. A continuación, las muestras fueron llevadas al espectrómetro Raman para la obtención de los espectros. Se obtuvo un barrido espectral por cada muestra. Los espectros mostraron diferencias significativas en los picos 1320 cm<sup>-1</sup>, 1452 cm<sup>-1</sup> y 1650 cm<sup>-1</sup>, los cuales representan cambios en la guanina de ADN, deformación del colágeno y absorción de la proteína amida I respectivamente. Esta información concuerda con lo reportado en trabajos similares, además de que en los tejidos neoplásicos generalmente se observa un aumento en la expresión del ADN, causando un incremento en la concentración proteica.

**Palabras clave:** espectroscopía Raman, cáncer de próstata, diagnóstico.

### **Analysis and Characterization of Raman Spectra of Neoplastic and Hyperplastic Prostate Tissue**

**Abstract.** Since the end of the 20th century, Raman spectroscopy has been used to address different biomedical issues, since it is a vibratory spectroscopic technique that provides information on the structure and chemical composition

of cells and tissues. This tissue is illuminated with a laser, where a fraction of the photons is scattered inelastically due to the intramolecular bond present. The photons that interact with the different biochemical bonds in the tissues experience a specific vibrational state, which results in the Raman spectrum. Objective to propose a measurement protocol for the evaluation of prostate cancer procedure to carry out this work prostate tissue samples were used fixed in paraffin cubes, these were previously classified into neoplastic tissue (tissue with cancer) and hyperplastic (tissue without cancer). The paraffin cubes were cut to a thickness of 10 microns, and subsequently dewaxed. The samples were then taken to the Raman spectrometer to obtain the spectra. Results, a spectral scan was obtained for each sample. The spectra showed significant differences in the peaks 1320 cm<sup>-1</sup>, 1452 cm<sup>-1</sup> and 1650 cm<sup>-1</sup>, which represent changes in DNA guanine, collagen deformation and absorption of protein amide I respectively. This information is in agreement with that reported in similar works, in addition to the fact that in neoplastic tissues the increase in DNA expression is generally observed, causing an increase in protein concentration.

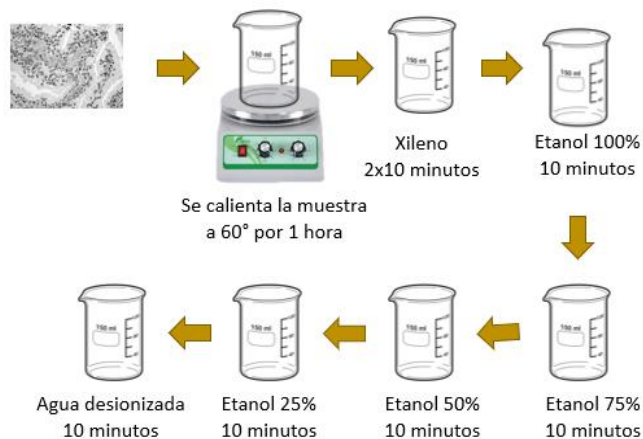
**Keywords:** Raman spectroscopy, prostate cancer, diagnosis.

## 1. Introducción

En la actualidad millones de personas mueren al año debido a los diferentes tipos de cáncer. La capacidad de detectar enfermedades de manera rápida y precoz, así como la intervención temprana de los tratamientos adecuados tiene múltiples bse reduce significativamente la morbilidad y mortalidad en la población. El cáncer de próstata es un tumor maligno que se desarrolla en la glándula prostática. En comparación con otros tipos de cáncer, el de próstata suele evolucionar de manera lenta y es extremadamente frecuente, aunque no se conoce la causa exacta de su desarrollo. Este tipo de cáncer es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16 % de incidencia en México. A nivel mundial ocupa el cuarto lugar en todas las enfermedades cancerígenas y es el segundo más común entre hombres. Aproximadamente 1 de cada 7 hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en el transcurso de su vida. Se estima que 6 de cada 10 casos se diagnostican en hombres de 65 años o más [1].

A partir de la última década, la espectroscopía Raman se comenzó a utilizar para abordar distintos temas biomédicos, caracterizando múltiples tipos de enfermedades y ha demostrado ser capaz de discriminar entre tejidos benignos y cancerosos de diferentes órganos, como el cáncer de piel, seno, tiroides, entre otros [2-4].

Para el cáncer de próstata existen pocos estudios utilizando espectroscopía Raman, los cuales se han realizado en líneas celulares [5,6] y un estudio reciente en dónde se analizaron muestras de tejido fresco ex vivo [7]. Sin embargo, la prueba por excelencia para la detección de tumores malignos es la biopsia, seguida de un análisis histopatológico. En esta técnica el tejido extraído se tiñe con hematoxilina y eosina, posteriormente es visualizada bajo un microscopio de luz convencional. El análisis depende principalmente del reconocimiento subjetivo de la morfología tisular, por lo que existen dificultades significativas para poder obtener un diagnóstico preciso ya que depende la experiencia del operador [8].



**Fig. 1.** Método utilizado para realizar la desparafinación y rehidratación de las muestras.

El potencial que ha demostrado la espectroscopía Raman para distinguir entre el tejido normal y maligno es una excelente opción, por este motivo se deben seguir desarrollando técnicas y modelos estadísticos que sean capaces de usarse como herramienta complementaria para el diagnóstico de tumores malignos.

El objetivo de la presente investigación fue determinar si el análisis espectroscópico de RAMAN en laminillas de pacientes en quienes se realizó prostatectomía radical puede diferenciar entre el tejido prostático benigno (hiperplasia) y maligno (cáncer) de próstata.

## 2. Materiales y métodos

### Obtención y tratamiento de las muestras

La evaluación se llevó a cabo en 18 bloques de parafina proporcionados por la Unidad Médica de Alta Especialidad T1 del Bajío en el IMSS, León Guanajuato-, en pacientes en quienes se realizó prostatectomía radical. Dichos bloques fueron previamente analizados por un anatomopatólogo experto, que desconocía el objetivo de la investigación para evitar el sesgo de revisión, él cuál clasificó los bloques en dos grupos: G1, bloques con tejido hiperplásico (tejido sin cáncer) y G2, bloques con tejido neoplásico (tejido con cáncer). Finalmente, un segundo anatomopatólogo corroboró la clasificación, de manera cegada e independiente. Se estudiaron 11 tejidos neoplásicos y 7 tejidos hiperplásicos.

Los cubos de parafina fueron cortados en varias secciones con un grosor de 10 micras, utilizando un microtomo LEICA CM1850. Posteriormente, se calentaron las muestras a una temperatura de 60 °C por una hora. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron inmediatamente puestas en un vaso de precipitado con xilol y se dejaron sumergidas por 10 minutos.

Después se vació el xilol utilizado en un contenedor de residuos y se cambió por xilol nuevo, dejando sumergidas las muestras 10 minutos nuevamente. A continuación,

**Tabla 1.** Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión de las muestras.

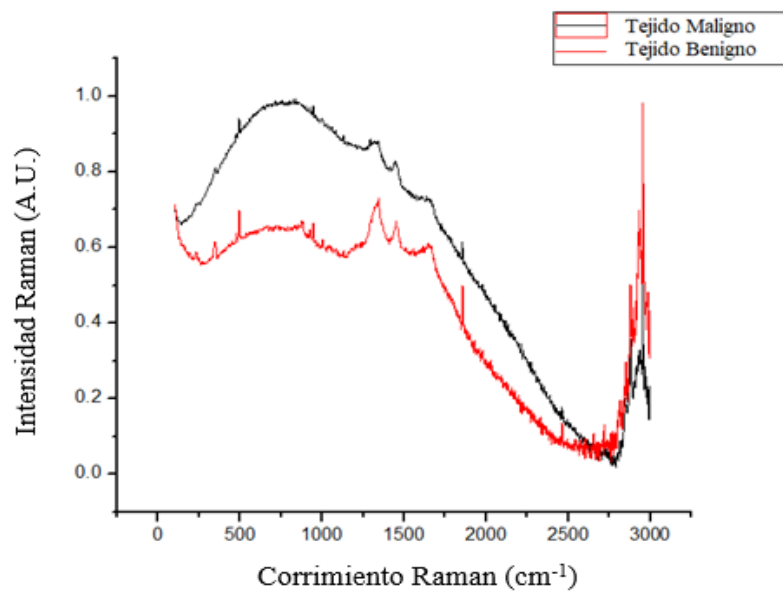
<b>Criterios</b>	<b>Inclusión</b>	<b>No inclusión</b>	<b>Exclusión</b>
Muestras de pacientes sometidos a prostatectomía radical	✓		
Muestras de pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer	✓		
Muestras de pacientes con score de Gleason mayor o igual a 6	✓		
Muestras con estripe tumoral distinta a adenocarcinomas de próstata		✓	
Muestras pertenecientes a pacientes de quienes no se contenía con los antecedentes clínicos		✓	
Muestras de pacientes cuya estripe tumoral creó desacuerdo durante el análisis del segundo anatomopatólogo respecto al diagnóstico inicial del producto de prostatectomía radical.			✓

fueron puestas en un nuevo vaso de precipitados y se sumergieron en alcohol por 10 minutos, se retiró el alcohol y se sumergieron en concentraciones de alcohol y agua desionizada del 75 %, 50 % y 25 % por 10 minutos para cada concentración. Finalmente, se sumergieron las muestras en agua desionizada por 10 minutos (Fig. 1). Al terminar este tratamiento, el tejido desparafinado fue llevado inmediatamente al espectroscopio Raman para la obtención de las muestras.

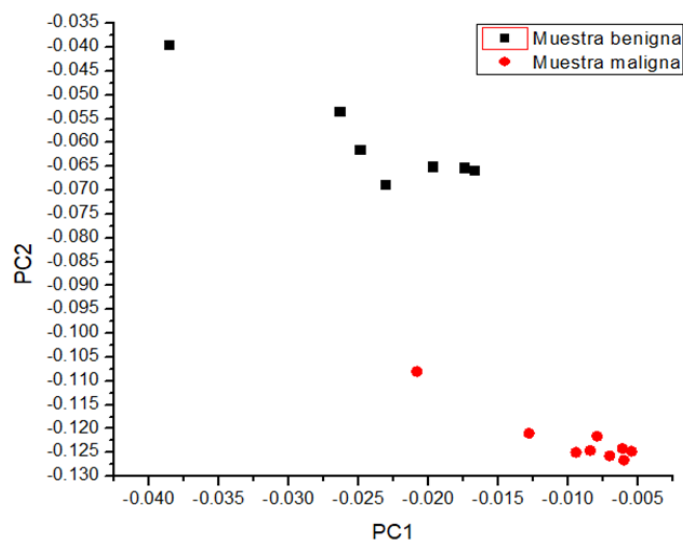
#### **Obtención y análisis de los espectros**

Se utilizó un equipo de espectroscopia Raman Thermo Scientific DXR con una fuente de excitación láser de 780 nm. La calibración del equipo utilizando el Software OMNIC, con la herramienta de ajuste proporcionada en el equipo, el cual realiza la Calibración de longitud de onda, la calibración de frecuencia de luz y la calibración de intensidad. Posteriormente, se realizó un mapeo de 10 barridos para cada muestra.

Las lecturas fueron obtenidas utilizando el software Thermo Scientific™ OMNIC™ Series. La información generada en cada uno de los barridos fue evaluada utilizando la técnica del análisis de componentes principales (PCA), con la finalidad de verificar las similitudes entre los diferentes grupos de espectros (tejido neoplásico e hiperplásico) y el análisis de curvas ROC con la finalidad de evaluar la capacidad discriminativa del método de los sujetos sanos de los enfermos. Los datos fueron procesados usando los softwares comerciales R® y Origin 8.5.



**Fig. 2.** Comparación de los espectros obtenidos de tejido neoplásico (maligno) y tejido hiperplásico (benigno) de próstata.



**Fig. 3.** Análisis de PCA con dos componentes principales.

**Tabla 2.** Análisis ROC.

Altura	Sensibilidad	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Especificidad	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
0.532	0.736	0.352	0.848	0.243	0.010	0.536
0.685	0.736	0.352	0.848	0.529	0.160	0.749
0.728	0.736	0.352	0.848	0.671	0.251	0.840
<b>0.750</b>	<b>0.736</b>	<b>0.352</b>	<b>0.848</b>	<b>0.814</b>	<b>0.352</b>	<b>0.921</b>
0.765	0.5645	0.281	0.786	0.814	0.352	0.921

**Tabla 3.** Análisis estadístico de los espectros Raman en los enlaces de las moléculas señaladas de acuerdo con los picos.

Pico (cm <sup>-1</sup> )	Vibración asociada	Valor promedio: Cáncer de próstata	Valor promedio: Hiperplasia de próstata	Estadístico Wilcoxon	Valor p
1320	G (DNA/ARN) deformación	0.735 ± 0.078	0.681 ± 0.043	53.5	0.048
1452	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (colágeno)	0.605 ± 0.076	0.554 ± 0.061	52	0.016
1650	Absorción grupo amino proteico (C = C)	0.665 ± 0.076	0.586 ± 0.061	53	0.045

### 3. Discusión y resultados

Se seleccionaron muestras de pacientes sometidos a prostatectomía radical de acuerdo con los siguientes criterios (Tabla 1).

Para cada una de las 18 muestra se realizaron 10 barridos espectrales, lo que nos da un total de 180 espectros. Al comparar los espectros Raman de los tejidos neoplásicos e hiperplásicos (Fig. 2), se observaron diferencias para los picos de enlaces moleculares asociados a la presencia de proteínas y ácidos nucleicos.

La clasificación de tejido basada en modelos estadísticos se utilizó para distinguir el tejido prostático neoplásico del tejido hiperplásico con una sensibilidad del 74 %, una especificidad del 84 % y una curva ROC con un área bajo la curva (AUC) de 0.75 (Tabla 2.). Para el análisis del tejido prostático se analizaron los picos correspondientes a las moléculas de colágeno y presencia de ADN/ARN. El análisis realizado en estos picos demostró una diferencia significativa ( $P < 0.048$ ) en tres de las regiones estudiadas (Tabla 3), correspondientes a los picos 1320 cm<sup>-1</sup>, 1452 cm<sup>-1</sup> y 1650 cm<sup>-1</sup>. ESe utilizó el PCA como un tercer análisis de diferenciación.

Esta técnica es utilizada como una técnica de reducción de dimensionalidad para un conjunto de datos mediante la extracción de los valores y los vectores en el rango de

400  $\text{cm}^{-1}$  – 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Tomando dos componentes principales (Fig. 3), el PCA compara el grupo de tejido neoplásico con el grupo control (tejido hiperplásico), donde se observa la separación de ambos grupos.

#### 4. Conclusiones

Un factor inherente al cáncer de próstata es que su patrón histopatológico puede presentarse en forma de focos o adyacente a tejido prostático sano, con prostatitis, atrofia o hiperplasia prostática, hecho que puede disminuir en este estudio la eficiencia de la espectroscopía Raman para detectar cáncer de próstata debido a que el análisis espectroscópico se realizó en regiones distintas de las muestras sin utilizar marcas o guías anatomopatológicas para dirigir el láser específicamente a zonas con cáncer o sin esta patología.

El objetivo principal del trabajo fue evaluar la capacidad de discriminar entre el tejido neoplásico e hiperplásico. La discriminación de las muestras se realizó de diferentes maneras una vez obtenidos los datos de los espectros Raman. Como primer estudio de diferenciación, la prueba no paramétrica Wilcoxon fue capaz de diferenciar los dos grupos de estudio a partir de regiones específicas del espectro. Una vez confirmadas las diferencias se utilizó el análisis de PCA, seguido del análisis de curvas ROC.

Aunque, este último análisis no muestra una alta sensibilidad ni especificidad el método tiene un buen comportamiento como primera aproximación. Como trabajo a futuro, se realizarán las mediciones de más muestras de tejidos neoplásicos e hiperplásicos, así como de tejidos extraprostáticos para analizar la eficiencia de la espectroscopía Raman en la determinación de bordes quirúrgicos positivos para cáncer.

**Agradecimientos.** Los Autores agradecen al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Unidad Médica de Alta Especialidad T1 del Bajío, León, Guanajuato por la recolección de las muestras, así como a la DAIP/2019/59023.

#### Referencias

1. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F.: Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2019)
2. Krafft, C., Sergo, V.: Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*, 20, pp. 195–218 (2006)
3. Jarvis, R.M., Goodacre, R.: Discrimination of bacteria using Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76, pp. 40–47 (2004)
4. Ellis D.I., Goodacre, R.: Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy (2006)
5. Crow, P., Barrass, B., Kendall, C., Hart-Prieto, M., Wright, M., Persad, R., Stone, N.: The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 92, pp. 2166–2170 (2005)
6. Lei Wang, Dalin He, Jin Zeng, Zhenfeng Guan, Qiang Dang, Xinyang Wang, Jun Wang, Liqing Huang, Peilong Cao, GuanJun Zhang, JerTong Hsieh, Jinhai Fan: Raman

*Karen Andrea Guerrero Enríquez, Octavio Jiménez González, Roberto Pacheco López, et al.*

- spectroscopy, a potential tool in diagnosis and prognosis of castration-resistant prostate cancer. *J Biomed Opt.*, 18, 087001 (2013)
7. Aubertin, K., Quoc, V., Jermyn M., Baksic, P.: Mesoscopic characterization of prostate cancer using Raman spectroscopy: potential for diagnostics and therapeutics. *BJU International*, 2, pp. 326–336 (2018)
  8. Stone, N., Kendall, C., Shepherd, N., Crow, P., Barr, H.: Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *J Raman Spectrosc*, 33(7), pp. 564–573 (2002)