

APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN DERMATOLOGÍA: DERMATITIS ATÓPICA

**Ramírez-Elías Miguel G¹, Alda J², Moncada B³, Torres-Álvarez B³,
González F.J⁴**

1. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, México
2. Grupo de Óptica Aplicada, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
3. Departamento de Dermatología, Hospital Central 'Dr. Ignacio Morones Prieto', SLP, México
4. Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, México

1. Introducción

La espectroscopía Raman puede proporcionar información bioquímica detallada que puede utilizarse para detectar las primeras etapas de algunas enfermedades. Como se demostró en la sección 1.3 del primer capítulo, una de las áreas en la que la espectroscopía Raman ha mostrado gran potencial como herramienta en el diagnóstico no invasivo es en la dermatología. Esto debido al hecho de poder hacer mediciones de piel *in vivo*, evitando biopsias innecesarias. En este capítulo, se muestra la aplicación de espectroscopía Raman y análisis de componentes principales en la detección temprana de Dermatitis Atópica (DA) relacionada a la FLG y como un posible marcador cuantitativo para mutaciones genéticas de FLG. La filagrina (FLG) es una proteína requerida para la formación de la barrera del estrato corneo (SC) (1). Juega un importante papel en el mantenimiento de la función de barrera de la piel (2) y es esencial para la hidratación del SC (3). Las mutaciones en el gen de la FLG han sido reportadas como un factor importante de predisposición a la dermatitis atópica (DA) y otros fenotipos atópicos secundarios como asma atópico, lo que sugiere que un defecto en la barrera de la piel es un evento primario en el desarrollo de la DA y fenotipos alérgicos relacionados (3). Kezic y colaboradores (1) usaron microespectroscopía Raman confocal para medir el factor de humectación natural (NMF, por sus siglas en inglés) en función de la profundidad del SC, mostrando que individuos portadores de mutaciones FLG-nula tienen niveles bajos de NMF en el SC y pérdidas transepidérmicas de agua alta en comparación a los no portadores; esto sugiere que la medición de estos parámetros podrían ser usados como marcadores del estado del gen de la FLG como lo ha reportado Nemoto-Hasabe y colaboradores (2). En este artículo, usando inmunohistoquímica mostraron que mutaciones en el gen de la FLG resultan en pérdida total o parcial de los péptidos proFLG/FLG.

En nuestro trabajo, se ha detectado la presencia de la proteína FLG en la piel usando espectroscopía Raman y Análisis de Componentes Principales como un procedimiento de detección temprana de FLG relacionada a la DA y como un posible marcador de mutaciones

en el gen de la FLG. La técnica propuesta produce parámetros cuantitativos que de manera positiva identifican aquellos pacientes que desarrollaron DA, usando un procedimiento óptico no invasivo, y cuando ningún signo o síntoma de enfermedad era evidente.

2. Métodos y Materiales

En este estudio participaron doce pacientes sanos, nacidos sin complicaciones de madre sanas. Con consentimiento informado obtenido de las madres de todos los participantes y el estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Las mediciones Raman fueron realizadas en el muslo derecho de cada infante. Se realizaron a temperatura ambiente usando el espectrómetro modelo R3000 Raman Systems descrito en el capítulo 1. Las mediciones se realizaron en el rango espectral de 200 a 1800 cm^{-1} y el instrumento fue calibrado, previamente cada día ante de la ronda de mediciones, usando un estándar de Teflón. Los participantes fueron monitoreados durante un año para observar si alguno de ellos desarrollaría DA. El diagnóstico dermatológico de la DA se realizó de acuerdo al criterio estándar en presencia de dermatitis crónica con la morfología y distribución típica (4) (5).

En una segunda etapa, se midieron los espectros Raman de piel de 19 pacientes mexicanos con prurito y sequedad de la piel y los resultados se comparan con el genotipado de FLG de los pacientes

Las mediciones Raman incluyeron el espectro Raman in vitro de proteína FLG humana recombinante (Genway Biotech Inc, San Diego, CA, USA) con el propósito de obtener un espectro de referencia que nos ayudara a determinar la cantidad de FLG en los espectros medidos. Se utilizó una cubeta de cuarzo y una potencia laser de 300 mW. La filagrina fue caracterizada previamente para conocer su peso molecular usando electroforesis en gel de poliacrilamida-sds, esta técnica es comúnmente usada para el análisis de proteínas debido a que provee información sobre los pesos y las cargas de las mismas (6). La proteína mostró una banda en 53KDa (figura 4.1), lo cual concuerda con lo especificado por el proveedor (7).

El ADN fue obtenido de células bucales usando el protocolo de Gentra Puregen (Qiagen®) El gen de la filagrina fue amplificado usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la detección de la mutación R501X un fragmento de 301pb fue incubado con 5 unidades de enzima de restricción Nla III (New England Biolabs®) y los productos fueron resueltos en geles de acrilamida al 12%. La mutación 2284del4 se detectó incubando un fragmento de 811pb con la enzima Dra III (New England Biolabs®) los productos fueron resueltos en gel de agarosa a 2%.

Se utilizó Análisis de Componentes Principales (ACP), que provee un análisis profundo de la estructura de la matriz varianza-covarianza entre espectros. Es importante mencionar que la matriz de correlación coseno es una versión normalizada de la matriz de varianza-covarianza de los datos (8) (9). Los componentes principales están dados en orden decreciente de importancia, lo que significa que el primer componente explica la mayor

cantidad de varianza de los datos originales, el segundo explica más varianza que el tercero y así sucesivamente. Así que evaluando la importancia de los componentes principales consecutivos, es posible reducir la dimensionalidad de los datos usando un conjunto más pequeño de espectros que explique una cantidad de varianza aceptable. Por otro lado, cuando avanzamos hacia el último componente principal, estos componentes pueden ser agrupados y formar procesos que son explicados por contribuciones del ruido (10) (11). Este agrupamiento es basado en un criterio estadístico que envuelve el número de puntos espectrales medidos y el nivel de confianza deseado para el agrupamiento de los componentes principales.

La cantidad de FLG medida en las muestras de la segunda etapa, fue estimada usando la correlación coseno entre el espectro de la FLG y el de cada paciente. Este enfoque da la ventaja frente a ACP que no depende de una base de datos grande y puede ser llevada a cabo usando un solo espectro.

3 Resultados

De 12 infantes medidos y monitoreados, 3 desarrollaron DA en el transcurso de un año. El análisis estadístico se realizó utilizando los 12 espectros Raman obtenidos de los 12 infantes y el espectro Raman de la FLG. Estos 13 espectros se midieron en el rango espectral de 300.17 a 1783.99 cm^{-1} con 1484 puntos. Por lo tanto, la matriz de datos usada en este análisis es de dimensión 1484 x 13. Los espectros obtenidos fueron procesados para remover fluorescencia.

La figura 1 muestra tres espectros: el correspondiente a la FLG (línea sólida negra), de un paciente que desarrollo DA (línea de trazos gris) y la de otro que permaneció sano (línea sólida gris).

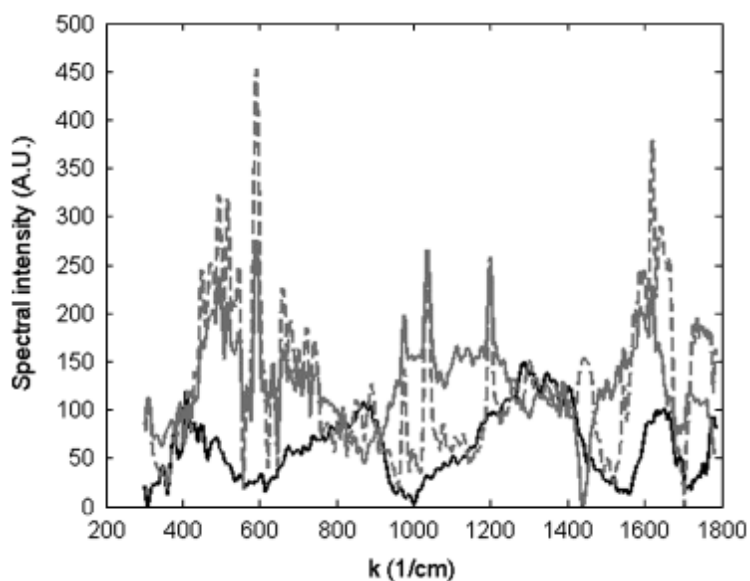


Fig. 1 Gráfica de los tres espectros usados en este análisis. La línea solida negra corresponde al de la filagrina, la línea a trazos gris es de un paciente que desarrolló dermatitis atópica

(paciente #1) y el espectro en gris corresponde a un paciente sano (paciente #4). Estos espectros han sido preprocesado para eliminar fluorescencia.

Con el fin de obtener un análisis más profundo de la influencia del espectro de la FLG sobre los espectros medidos, ACP fue aplicado al conjunto de datos, produciendo 13 eigenvalores, que se graficaron en la figura 2. Usando un criterio estadístico para agrupar los componentes principales (10) y encontramos que con un nivel de confianza de 99%, los primeros ocho componentes son estadísticamente independientes unos de otros, y después del octavo componente hay una dependencia estadística entre ellos que puede ser asociada al ruido (11). Los primeros ocho componentes explican el 99.84% de la varianza total de los datos; este límite ha sido representado como una línea vertical sólida en la figura 2

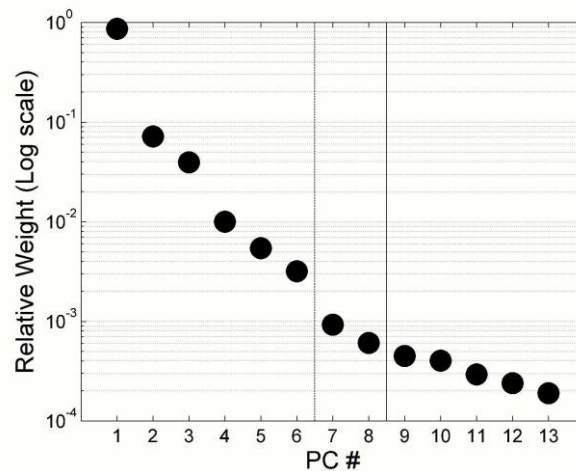


Fig. 2 Grafica Semilogarítmica del peso relativo de los eigenvalores de los componentes principales. Después del componente principal ocho, los componentes principales siguientes pueden ser combinados en procesos que pueden ser interpretados como ruido. La línea punteada representa el límite cuando consideramos la contribución de la filagrina.

El criterio para seleccionar los componentes principales (está basado en conexiones internas que pueden ser establecidas debido a incertidumbres estadísticas relacionadas a la normalidad de los datos. Por lo tanto, algunos componentes principales (CP) no pueden ser tomados de manera individual debido a esas relaciones internas. Juntos, estos CP vinculados describen un proceso. Típicamente estos procesos están asociados al ruido. En nuestro análisis, preferimos limitar el estudio a aquellos CP que pueden ser verdaderamente considerados como independientes.

Se evaluó el comportamiento de los dos primeros componentes principales; estos dos componentes representan el 93.8% de la varianza total de los datos originales. Los datos originales pueden ser representados como una gráfica bidimensional teniendo como coordenadas el valor absoluto de los coeficientes de los espectros para los componentes primero y segundo (fig. 3).

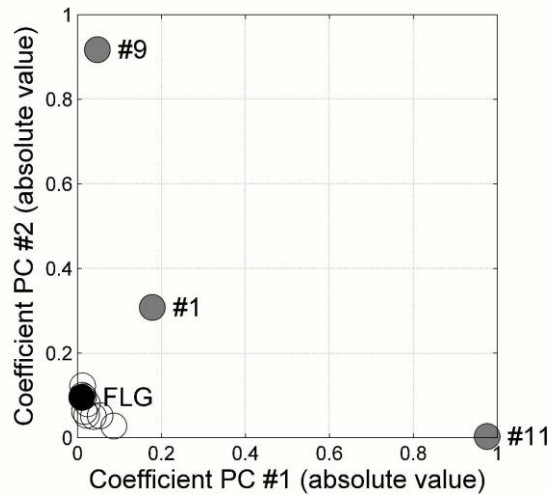


Fig. 3 Localización de los espectros en el espacio de componentes principales usando solo el primero y segundo componentes principales. Los puntos grises representan aquellos pacientes que desarrollaron la enfermedad. El punto negro representa el espectro de la FLG.

Los puntos grises corresponden a aquellos infantes que desarrollaron DA; el resto de los pacientes están agrupados alrededor de la localización del espectro de la FLG (representados por punto negro). Este resultado indica también que este tipo de enfoque identifica pacientes que desarrollaron la enfermedad.

En la segunda etapa, el análisis genético reveló que 8 de 19 pacientes (49%) presentaron las mutaciones 2282del4 y R501X. Estos estudios fueron comparados con el contenido de FG. Un valor de correlación bajo con el espectro de la filagrina indica una baja concentración. En la figura 4 se muestra los resultados de la correlación coseno para los pacientes con la mutación de la filagrina (FLG -) y sin mutación en la filagrina (FLG +). Los pacientes con mutación en la filagrina presentaron una correlación promedio de 0.286 (SD = 0.082) mientras los pacientes sin mutación en la filagrina mostraron una correlación promedio de 0.4 (SD = 0.08). Se observa en la Fig. 4 que 7 de 8 paciente con mutación en la filagrina (87.5%) presentaron un correlación menor a 0.35 y que 8 de 11 pacientes (72.7%) sin mutación en la filagrina presentaron una correlación mayor de 0.35 (línea punteada, Fig. 4).

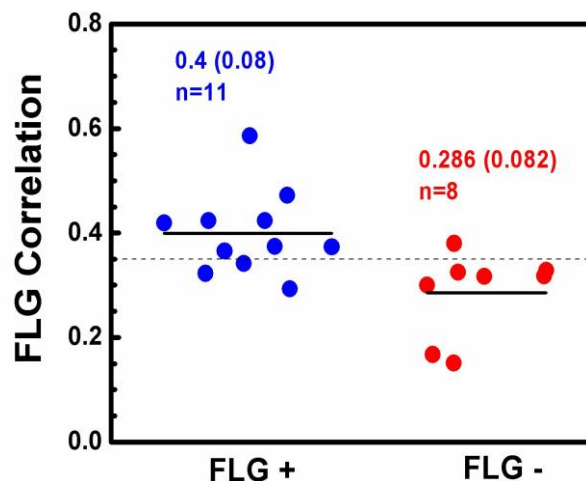


Fig. 4 Correlación Coseno del espectro Raman de filagrina con el de la piel de los pacientes.

4. Conclusiones

Se ha reportado que mutaciones de pérdida de función en el gen de la FLG causan ictiosis vulgaris, y son el mayor factor de predisposición genética para la DA (12). Estas mutaciones se han encontrado en porcentajes de un 15% a un 55% en pacientes con DA de origen europeo. Las 6 mutaciones más prevalentes son la R501X, 2282del4, R2447X, S3247X, 3702delG, y Y2092X (13). Sin embargo, la detección de estas mutaciones por genotipado consiste en un procedimiento invasivo que requiere de un equipo costoso y que por lo general no está fácilmente disponible. Por otra parte, la espectroscopía Raman es un procedimiento no invasivo que puede proveer información acerca de la composición molecular de la piel, apoyada con los análisis de la matriz de la correlación coseno entre espectros y el ACP es posible extraer información relevante y cuantitativa de los espectros Raman de piel de pacientes con AD.

El método usado para analizar el contenido de FLG en los espectros Raman se llevó a cabo construyendo una gráfica bidimensional con los dos primeros componentes principales, donde la FLG tenía la menor contribución al conjunto de datos. Usando esta gráfica, los sujetos que luego desarrollaron la enfermedad fueron los que se alejaron del espectro de la FLG.

De los resultados reportados arriba, se puede concluir que es posible determinar cuáles infantes son más susceptibles a desarrollar DA tomando el espectro Raman de la piel, en el momento en el que todavía no se ha desarrollado ningún síntoma o signo de enfermedad, y analizando el contenido de la proteína FLG por cualquiera de las tres técnicas de análisis estadístico presentadas. Este enfoque cuantitativo puede ser usado como un procedimiento de detección temprana de DA relacionada a la filagrina y como un posible marcador de mutaciones en el gen de la FLG.

Referencias.

1. **Kezic S, Kemperman PMJH, Koster ES.** 2008, *J Invest Dermatol* , Vol. 128, pp. 2117–2119.
2. **Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WHI, Shimizu H.** 2009 , *J Invest Dermatol* , Vol. 129, pp. 682–689.
3. **Weidinger S, Illig T, Baurecht H et al.** 2006 , *J Allergy Clin Immunol* , Vol. 118, pp. 214–219.
4. **Hannifin JM, Rajka G.** 1980, *Acta Derm Venereol* , Vol. 92, pp. 44–47.
5. **HC, Williams.** 1994, *Br J Dermatol Q1*, Vol. 131, pp. 383–396.
6. **Garfin, D.** Gel electrophoresis of proteins. *Cell Structure*. UK : Oxford University Press, 2003.
7. GenWay Biotech, Inc. [Online] <http://www.genwaybio.com/>.
8. **Morrison, D F.** *Multivariate statistical methods*. 3rd ed. Singapore : McGraw-Hill, 1990.
9. **Rothe H, Duparr A, Jacobs S.** 1994, *Opt Eng* , Vol. 33, pp. 3023–3030.
10. **Lopez-Alonso JM, Alda J.** 2004, *Opt Eng* , Vol. 42, pp. 1915–1922.

11. Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WH, Shimizu H. 2009, *J Invest Dermatol.*, Vol. 129(3), pp. 682-9.
12. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. 2007, *J Invest Dermatol*, Vol. 127, pp. 1282-4.
13. *Acta Dermatoven APA*. B. Zegarska, W. Józwicki, W. Zegarski, and R. Czajkowski. 2010, Vol. 19 (2), pp. 17-21.