

Una mirada val més que mil paraules

Detectar malalties neurodegeneratives a partir de la retina

Mónica Marro i Pablo Loza-Álvarez. Super-resolution Light Microscopy & Nanoscopy (SLN) Lab ICFO, Institut de Ciències Fotòniques

La detecció precoç de malalties neurodegeneratives és clau, perquè un bon tractament a temps pot alleugerir els símptomes i allargar l'esperança de vida del pacient. El problema d'aquestes malalties és que, quan apareixen els símptomes, més del 70 % del sistema nerviós ja es troba afectat. Per això, és molt important detectar la malaltia fins i tot abans que el pacient presenti els símptomes. En aquest sentit, és necessari establir una eina no invasiva que es pugui fer servir de manera rutinària per detectar pacients susceptibles d'estar desenvolupant malalties neurodegeneratives. Les tècniques actuals que serveixen per detectar aquestes malalties (ressonància magnètica nuclear, punció lumbar o les proves de potencials evocats, en anglès *evoked potential tests*, que mesuren l'activitat elèctrica) són o bé invasives o bé costoses en temps i diners. Per aquest motiu, aquestes proves es reserven per a pacients que ja presenten símptomes i a vegades ja és massa tard.



La retina és una part del sistema nerviós central en què les cèl·lules ganglionars projecten els seus axons a través del nervi òptic. Aquestes cèl·lules són danyades en nombroses malalties com el glaucoma o l'esclerosi múltiple. Per tant, l'anàlisi dels canvis moleculars de la retina incrementaria el nostre coneixement sobre pèrdua neuronal i neuroinflamació i ens ajudaria a desenvolupar estratègies noves neuroprotectores per al cervell.

La retina delatora

Per a la fotònica, la retina és una part molt accessible del sistema nerviós central, ja que es podria enviar un feix de llum a l'ull i així poder estudiar les neurones i la seva evolució de manera no invasiva. Una de les tècniques òptiques més prometedores per a aquest estudi és l'espectroscòpia Raman (ER). Es basa a enviar un feix monocromàtic de llum a una

.....
↑ Imatge 1. Fotografia del laboratori de SLN.
.....

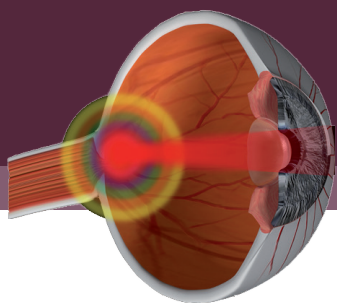
mostra. La interacció dels fotons del feix amb les vibracions moleculars de la mostra fa que la llum dispersada contingui fotons de longitud d'ona diferent a la inicial (coneguts com a espectre Raman). Com que cada molècula té unes vibracions moleculars definides i específiques, analitzant l'espectre Raman de la mostra tindrem informació del seu contingut molecular. La ER és no invasiva, ja que no excita les molècules, no requereix una preparació prèvia de la mostra i els resultats són immediats. Com a conseqüència, utilitzar l'ER per a l'estudi i la detecció de malalties neurodegeneratives a través de la retina és molt prometedor.

L'ICFO, en col·laboració amb l'Institut d'Investigació Biomèdica August Pi Sunyer

(IDIBAPS) fa tres anys va començar a estudiar la possibilitat de detectar i monitorar processos inflamatoris de la retina, i ha obtingut resultats molt esperançadors. Específicament, es van preparar cultius de retina de ratolí i es van separar en dos grups. Un, que era el control, i l'altre, al qual s'induïa una inflamació. Es va obtenir l'espectre Raman de les retines de tots dos grups (control i inflamats) durant vint-i-quatre hores i després es van analitzar els espectres per veure si hi havia algun canvi bioquímic causat per la inflamació.

Com que les mostres biològiques contenen un nombre elevat de molècules diferents, i l'espectre Raman és molt ric per a cadascuna d'aquestes molècules, l'anàlisi de l'espectre Raman esdevé complex. Per això es van desenvolupar i aplicar tècniques estadístiques avançades de multivariable per poder extreure'n els resultats. En concret, es va utilitzar la tècnica de resolució multivariant de corbes (*multivariate curve resolution*, MCR) per monitorar el contingut molecular de les retines durant les vint-i-quatre hores. Aquesta tècnica estadística descompon l'espectre Raman de la mostra en l'espectre de components moleculars presents en la mostra i la seva concentració. El resultat que es va trobar va ser que després de deu o dotze hores (en què s'espera un màxim d'inflamació del teixit) el grup de retines inflamades presentava una alta concentració de mediadors immunitaris (lipooxigenasa, òxid nítric-sintasa i factor de necrosi tumoral). Al llarg del procés inflamatori també es van observar canvis en molècules involucrades en la producció energètica (citocrom C, fenilalanina i NADH/NAD+) i una reducció de la fosfatidilcolina.

A més, utilitzant l'algorisme *partial least squares-discriminant analysis* (PLSDA, que busca parts en l'espectre diferents que discriminen dos grups d'espectres) s'han pogut discriminar espectres de retines sanes i inflamades amb un 99 % de sensibilitat i especificitat, cosa que representa un molt bon resultat per a l'aplicació clínica.



.....
↑ **Imatge 2.** Feix de llum interactuant amb la retina. La llum és dispersada i conté fotons Raman.
.....

Aquest estudi presenta una tècnica molt prometedora per a la detecció, estudi i monitoratge de malalties neurodegeneratives de manera ràpida i no invasiva. Aquesta tècnica es basa en una tecnologia fotònica i en el desenvolupament d'algorismes estadístics per interpretar els resultats.

Així, amb l'espectroscòpia Raman s'han identificat uns biomarcadors de neuroinflamació, informació que no s'hauria pogut obtenir d'una altra manera. L'anàlisi dels canvis moleculars a escala de la retina de manera no invasiva incrementarà el nostre coneixement sobre pèrdua neuronal i neuroinflamació i ens ajudarà a desenvolupar estratègies noves neuroprotectores per al cervell. A més permetrà establir una tècnica rutinària de detecció precoç per a malalties neurodegeneratives.

Raman en l'ICFO

Des que es va descobrir l'espectroscòpia Raman el 1928 aquesta tècnica va produir una revolució en l'àrea de la química analítica. Gràcies als darrers avenços tècnics, les expectatives d'aplicar-la en biomedicina han augmentat. La possibilitat de detectar i monitorar de manera no invasiva i amb alta especificitat l'evolució del contingut bioquímic en mostres biomèdiques es va convertir en un repte a assolir. No obstant això, les propietats inherents a la dispersió Raman han fet que el seu ús per a aplicacions biomèdiques no hagi estat completament explotat des del seu descobriment. En la darrera dècada, l'espectroscòpia Raman sensibilitzada en superfície (*surface enhanced Raman spectroscopy*, SERS) i l'anàlisi multivariant s'han erigit com a possibles solucions per superar la baixa eficiència i la complexitat dels senyals Raman de material biològic. El treball fet en l'ICFO representa un pas endavant envers la combinació i l'ús d'anàlisis

estadístiques i SERS per expandir l'aplicabilitat de l'ER en bioquímica: des de molècules individuals fins a cèl·lules i teixits.

En l'ICFO s'han dut a terme projectes d'investigació relacionats amb l'anàlisi biomecànica de molècules individuals (DNA) i eritròcits combinant pinces òptiques amb l'ER i SERS. Es van desenvolupar mètodes estadístics com la correlació 2D i l'anàlisi de components principals (PCA) per mostrar les propietats estructurals tan importants de cèl·lules i teixits. D'altra banda, també s'han fet investigacions relacionades amb el monitoratge de tractaments com la teràpia fotodinàmica (PDT) en cèl·lules gials combinant l'espectroscòpia amb tècniques estadístiques.

A més, s'han investigat sistemes més complexos per seguir l'evolució molecular de cèl·lules i teixits durant un procés bioquímic. Així, es va utilitzar l'anàlisi de components principals (PCA) per estudiar el metabolisme lipídic en diferents línies cel·lulars de càncer de mama relacionant-lo amb el seu grau de malignitat.

Malgrat això, l'anàlisi de components principals (PCA) no proporciona components significatius que podrien ser assignats directament a espectres moleculars Raman. Conseqüentment, es va proposar el mètode estadístic de resolució multivariant de corbes (MCR) per extraure components moleculars amb significat físic i químic que varien durant un procés bioquímic i van aplicar-lo a estudiar la transició epitel·li-mesènquima (EMT) en cèl·lules cancerígenes. Això va permetre identificar metabòlits implicats en el procés EMT, relacionats amb l'inici de la metastasi.

Tal com descrivim en l'inici de l'article, es va monitorar la composició de la retina *ex vivo* quan s'induïa una neuroinflamació, i això representa la primera aplicació de l'MCR per descompondre i monitorar el contingut d'un teixit biològic amb ER, i identifica biomarcadors per a la detecció precoç de pro-

cessos neuroinflamatoris. Això representa el primer pas envers l'establiment d'una tècnica no invasiva i de diagnòstic primerenca d'esclerosi múltiple o altres malalties neurodegeneratives.

Aquesta investigació feta en l'ICFO ha revelat un potent mètode que afegeix una nova dimensió al camp de la química analítica. S'ha pogut extreure informació amb alta especificitat i sensibilitat de manera no invasiva, ràpida i sense preparació especial de la mostra. Les mostres es poden monitorar *in vivo*, i quantificar-ne els components moleculars difícils o impossibles d'extreure amb la tecnologia actual.

Sobre SLN

El grup a què pertanyen els autors que signen l'article duu a terme les seves activitats dins de la Unitat de Microscòpia de Llum de Superresolució i de Nanoscòpia (*super-resolution light microscopy & nanoscopy*, SLN). La triple missió del grup és dur a terme activitats de recerca i desenvolupament amb les tècniques més avançades de microscòpia de llum, proveir de sistemes d'imatge més avançats dels que estan disponibles comercialment avui dia, capacitar investigadors en l'avantguarda de les tècniques de microscòpia i, finalment, facilitar l'accés a les aplicacions biomèdiques més exigents.

Així, doncs, en termes de recerca en l'SLN ens encarreguem de desenvolupar noves tècniques de microscòpia i de l'aplicació en reptes biològics. Així, en col·laboració en projectes nacionals i internacionals, hem desenvolupat una nova generació de làsers compactes per a microscòpia, i incorporem nous components i equipaments a la fotònica. La possibilitat d'involucrar diverses disciplines de l'àrea de la biomedicina, com ara l'oncologia, la neurobiologia i l'oftalmologia, permet tenir esperances de diagnòstic precoç. •