



Estudiar la piel con luz sincrotrón

Aplicaciones de la microespectroscopía de infrarrojo en el sector salud

Ibraheem Yousef, Núria Benseny, Martin Kreuzer, Tanja Ducic, Ana Belén Martínez, Marta Ávila
Laboratorio de Luz Sincrotrón ALBA

Mercedes Cócera, Golen Rodríguez, Rosana Saldaña, Lucyanna Barbosa-Barros
Bicosome S.L.

Estitxu Fernández, Verónica Moner, Olga López
Instituto de Química Avanzada de Cataluña

La línea de luz MIRAS del Sincrotrón ALBA es una potente herramienta para detectar y cuantificar moléculas y observar su distribución espacial. Está especialmente indicada para estudiar la piel, ya que permite observar la distribución de lípidos y la penetración de sustancias hacia sus distintas capas, entre otros estudios.

PALABRAS CLAVE

Distribución espacial, Penetración, IR, Vehículos lipídicos

Beamline MIRAS from ALBA Synchrotron is a powerful tool to detect and quantify molecules and observe their spatial distribution. It is particularly suitable to study the skin as it allows observing the distribution of lipids and the penetration of substances into its layers, amongst many other studies.

KEYWORDS

Spatial distribution, Penetration, IR, Lipid vehicles

DESCRIPCIÓN DEL SINCROTRÓN ALBA Y DE SU LÍNEA DE LUZ MIRAS

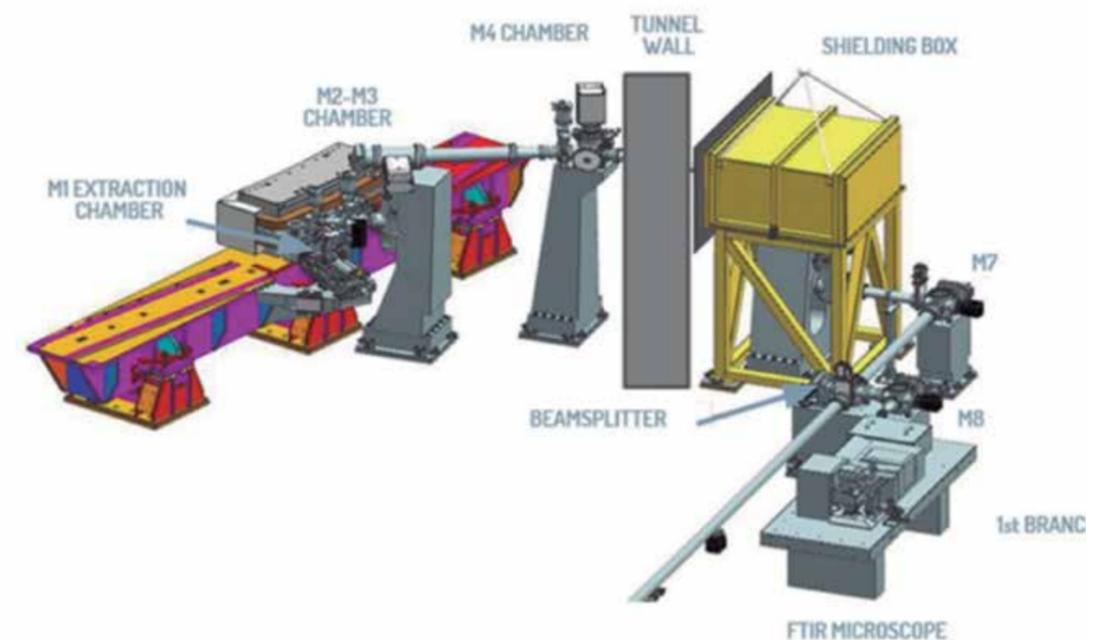
La luz de sincrotrón es una radiación electromagnética que comprende un rango del espectro que va del infrarrojo hasta los rayos X duros, pasando por la luz visible y ultravioleta. Tiene una brillantez extremadamente alta, lo que la hace ideal para visualizar y analizar las propiedades de todo tipo de materiales a nivel atómico y molecular.

El sincrotrón ALBA (www.cells.es) entró en funcionamiento en mayo de 2012 y es la única fuente de luz sincrotrón que existe en

España. Se trata de un complejo de aceleradores de electrones para producir luz sincrotrón, que permite visualizar y analizar la materia y sus propiedades a nivel atómico y molecular. Cuando los electrones son forzados a seguir una trayectoria circular, se genera luz sincrotrón. Esta luz de sincrotrón es dirigida hacia las líneas de luz, donde se realizan los experimentos. ALBA cuenta en la actualidad con ocho líneas de luz que pueden realizar experimentos en diferentes ámbitos científicos: física, química, ciencias de la vida, ciencia de materiales, patrimonio cultural, biología, nanotecnología, etc.

MIRAS es la octava línea de luz que ha puesto en marcha el sincrotrón ALBA y se dedica a la microespectroscopía con luz infrarroja. En la línea de luz MIRAS se extrae el haz de luz infrarroja mediante la inserción de un espejo plano lateral M1 [1] y es dirigido hacia el otro lado del túnel del acelerador mediante una serie de espejos (Figura 1). La disposición óptica de MIRAS incluye la opción de dividir el haz de infrarrojos extraído en dos [2]. Mediante esta configuración se pueden usar dos haces de luz infrarroja de forma separada en diferentes estaciones finales [3].

Figura 1. Disposición de los espejos de la línea de luz MIRAS para extraer la luz infrarroja del anillo de almacenamiento del Sincrotrón ALBA



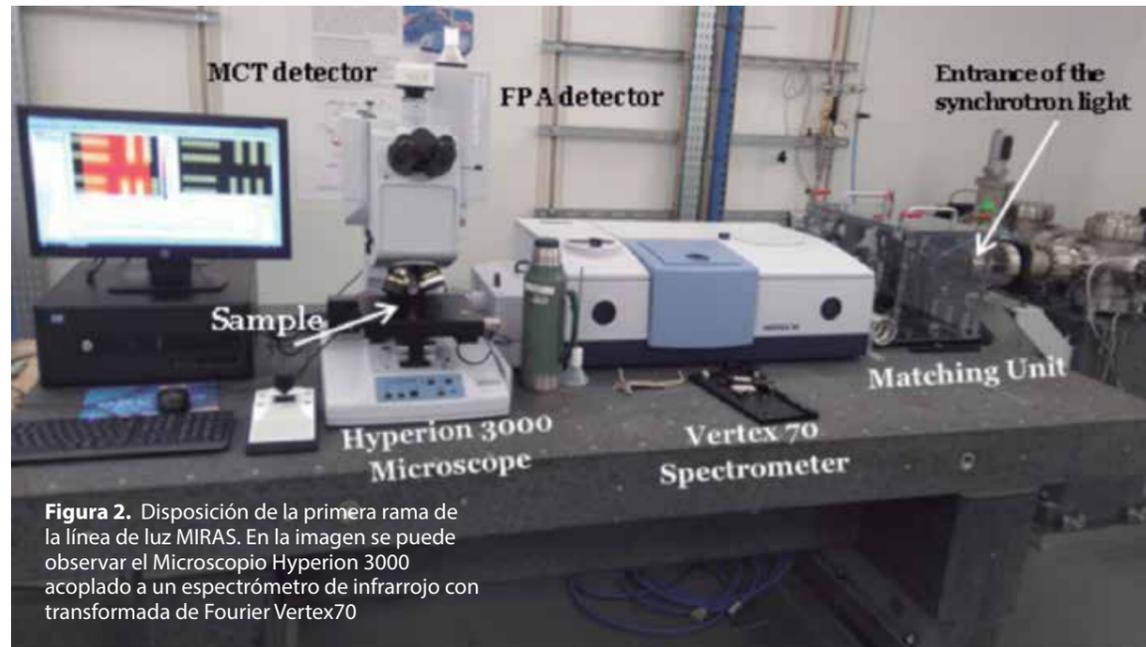


Figura 2. Disposición de la primera rama de la línea de luz MIRAS. En la imagen se puede observar el Microscopio Hyperion 3000 acoplado a un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Vertex70

Por el momento, ya está funcionando una estación con un moderno espectrómetro de infrarrojo con la capacidad de ser usado como microscopio, cubriendo un rango de longitudes de onda de aproximadamente 1 μm a $\sim 100 \mu\text{m}$ con una región espectral, optimizado en la región entre 2,5-14 μm (Figura 2). Tanto la cabina experimental como la de transporte óptico están diseñadas para dar cabida a dos estaciones adicionales: una para futuras actualizaciones de la línea de luz MIRAS, y la otra basada en el concepto de "traiga su equipo" para aquellos científicos que deseen utilizar la potente luz sincrotrón en sus equipos.

El diseño de la línea de luz optimiza el rendimiento en el rango del infrarrojo medio y tiene una eficiencia significativamente superior a las fuentes convencionales, tanto en la región del infrarrojo lejano como en el infrarrojo medio.

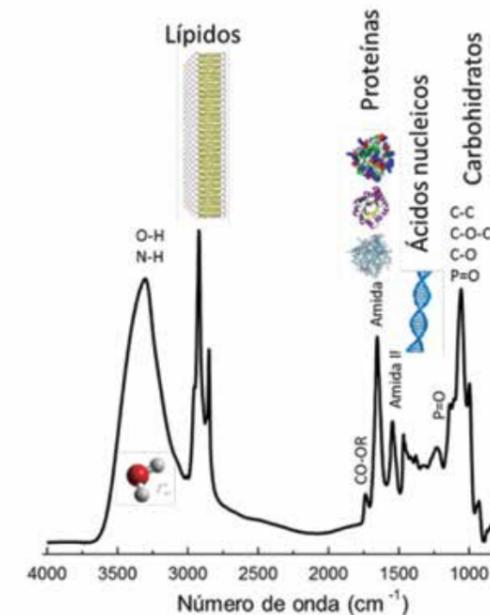
LA MICROESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica mundialmente usada para la detección y caracterización de moléculas químicas. Es la parte de la espectroscopia que se ocupa de la región del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo y se

basa en el fenómeno de que las moléculas son capaces de absorber la luz infrarroja de la misma energía que la vibración de los enlaces de dichas moléculas. Los enlaces pueden vibrar de forma simétrica o asimétrica y en distintos ángulos y configuraciones. De esta forma, un espectro de absorción de luz infrarroja presenta picos a distintas energías o longitudes de onda que pueden ser estrechos o anchos y de mayor o menor intensidad dependiendo de los distintos enlaces que componen la molécula. En este sentido la masa de los átomos que conforman las moléculas, las fuerzas de enlace y el modo de vibración de los enlaces producen un espectro infrarrojo particular y único para cada molécula.

En la microespectroscopia de infrarrojo se focaliza la luz infrarroja en áreas muy pequeñas con el fin de obtener espectros de dichas áreas y obtener imágenes de distribuciones espaciales de los distintos compuestos en las muestras. Debido a que la luz sincrotrón es hasta 3 órdenes de magnitud más brillante que la luz de los instrumentos convencionales, la resolución de las imágenes tomadas con luz sincrotrón es muy superior a la conseguida utilizando equipos convencionales de infrarrojo. El objetivo de MIRAS es permitir la obtención de espectros y de imágenes de distintos

Figura 3. Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier donde se indican las bandas más importantes para los tejidos biológicos



materiales a nivel microscópico. De este modo, MIRAS se convierte en una valiosa herramienta para identificar la composición química de los materiales a nivel molecular, satisfaciendo las necesidades presentes y futuras de la comunidad científica, no sólo en España sino también en Europa.

APLICACIONES GENERALES DE LA TÉCNICA

Esta técnica se puede utilizar en muchos campos en los que sea necesario identificar compuestos o investigar diversos componentes en las muestras. Las aplicaciones científicas de MIRAS cubren una amplia gama de campos de investigación, incluyendo la ciencia de materiales y el estudio de superficies, la bioquímica, el microanálisis de materiales, la arqueología, la geología, la biología celular, el diagnóstico biomédico, las ciencias ambientales, etc. y está especialmente indicada para el estudio de tejidos biológicos tales como la piel o el cabello [4-5]. La luz sincrotrón aplicada a técnicas de espectroscopia de infrarrojo (IR) nos permite caracterizar diferentes aspectos de la estructura y funcionamiento de tejidos biológicos sin necesidad de tinciones, o el uso de sondas fluorescentes, que serían difíciles de abordar con técnicas convencionales.

La microespectroscopia de luz infrarroja con sincrotrón permite obtener información estructural de prácticamente todos los tejidos biológicos, ya que estos contienen diferentes conjuntos de moléculas o grupos funcionales que presentan una serie de bandas de absorción de luz infrarroja característicos. Por ejemplo, se puede obtener información sobre el nivel de saturación de los lípidos al distinguir la vibración del C=C, del CH₂ y el CH₃; enlaces amida presentes en la estructura secundaria de proteínas; la estructura de capas bilipídicas, el ADN o carbohidratos en células (Figura 3). Es decir, esta técnica no solo permite el estudio de penetración de sustancias tales como fármacos o productos cosméticos que tengan bandas de absorción diferentes a las del tejido, sino que también permite analizar los efectos que puede tener esta sustancia sobre el tejido.

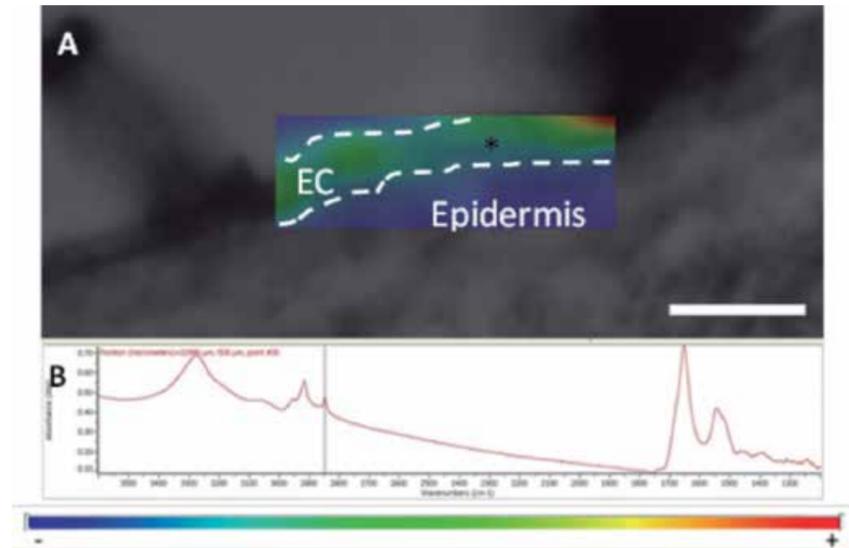
APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LA PIEL

El estrato córneo es la capa más superficial de la piel cuya función es actuar como barrera de la piel. El estrato córneo presenta una estructura y composición peculiares compuesto por células muertas (corneocitos) y una mezcla de ceramidas, colesterol y ácidos grasos, entre otras moléculas, que se organizan formando lamelas lipídicas alrededor de los corneocitos y ocupando los espacios entre las células muertas de la piel [6-7]. Algunas enfermedades cutáneas se reflejan en cambios producidos tanto en la composición como en la organización del estrato córneo [8]. Por todo ello, el conocimiento profundo de la estructura de la piel y de la acción de fármacos o principios activos en las capas diana de la piel, nos ayuda a comprender procesos asociados a disfunciones cutáneas y a evaluar el impacto de posibles tratamientos.

CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DEL ESTRATO CÓRNEO

La microespectroscopia de IR nos permite conocer la distribución y el estado físico de los lípidos del estrato córneo que determinan la función barrera cutánea. En el estudio realizado por Rodríguez et al. (2012), se analizaron secciones de piel de 6 μm en configuración de transmisión. Se acopló un microscopio óptico que permitió tomar los

Figura 4. Imagen de la piel con un mapa químico coloreado superpuesto que indica mayor (rojo) y menor (azul) presencia de lípidos. B, espectro de IR tomado en el asterisco de la imagen. En la parte inferior del espectro se presenta la escala coloreada que indica mayor (rojo) o menor (azul) presencia de la vibración representada. La barra representa 25 μm



espectros de IR sobre puntos de la muestra para construir un mapa químico de la piel. La Figura 4 muestra una imagen de la piel sobre la que se realizan espectros de IR en diferentes puntos. Estos datos se analizan siguiendo la huella química de los lípidos que es la vibración de estiramiento del grupo CH_2 de las cadenas alquílicas (B, espectro IR realizado en el asterisco marcado en la imagen). Así se construye un mapa químico del área estudiada que nos indica mayor (color rojo) o menor (color azul) presencia de lípidos. La Figura 4 nos muestra que los lípidos se concentran en la capa más superficial de la piel que es el estrato córneo. Esta banda característica de los lípidos aparece a una longitud de onda de $2849\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, lo que indica que estos lípidos se encuentran en estado gel [9].

EFFECTO DE LOS VEHÍCULOS SOBRE LA PIEL

En Bicosome se han desarrollado vehículos lipídicos con el objetivo de transportar principios activos hasta las distintas capas de la piel donde deben realizar su actividad. Estos vehículos lipídicos tienen la capacidad de interactuar con las lamelas lipídicas del estrato córneo de manera que la penetración de estos hacia las distintas capas cutáneas se ve aumentada con respecto a la capacidad de los principios activos solamente.

Se estudiaron muestras de piel nativa y muestras de piel tratadas previamente con vehículos lipídicos de

la plataforma Bicosome. Los diferentes vehículos se incubaron (12 h) con la piel dermatomizada y después se analizaron por microespectroscopia de IR*. Los vehículos lipídicos se prepararon utilizando lípidos deuterados para, de esta forma, poder discriminar la señal de los vehículos (enlaces Carbono-Deuterio, C-D) de los lípidos cutáneos (enlaces Carbono-Hidrógeno, C-H), o un activo con vibraciones de enlace que no se superponen con las características de la piel. El sistema bicosoma marcado con lípidos deuterados se aplicó sobre la piel y esta se analizó por microespectroscopia IR con el objetivo de estudiar la distribución del sistema en la piel.

En la Figura 5 se observa la distribución de los grupos CD_2 incluidos en el sistema bicosoma. El vehículo penetra a través del estrato córneo (EC) y se distribuye por la epidermis (Epi). Esto indica que el vehículo diseñado para transportar posibles fármacos o principios activos a la piel es capaz de atravesar el estrato córneo y, por lo tanto, cumple su propósito.

Para evaluar la capacidad del vehículo para transportar activos a la piel, se estudió, por una parte, la penetración en la piel de una molécula modelo derivada del tris-carbonil de renio disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO), que es un potenciador de la penetración y de esta misma molécula incorporada en la plataforma Bicosome. El tris-

*Realizado en la línea de luz SMIS de SOLEIL, Francia.

Figura 5. Imagen de la piel tratada con vehículos de la plataforma Bicosome utilizando lípidos deuterados. El mapa químico coloreado superpuesto indica mayor (rojo) y menor (azul) presencia de la vibración del enlace CD_2 . Para facilitar la visualización se marca la separación del estrato córneo (EC) y la epidermis con una línea blanca discontinua. La barra representa 50 μm

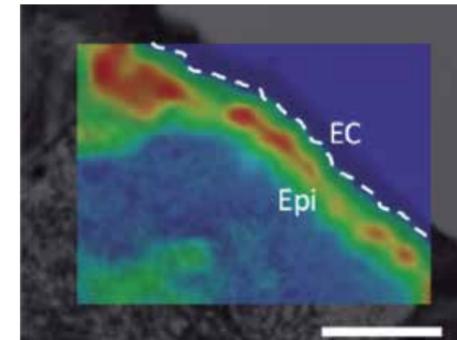
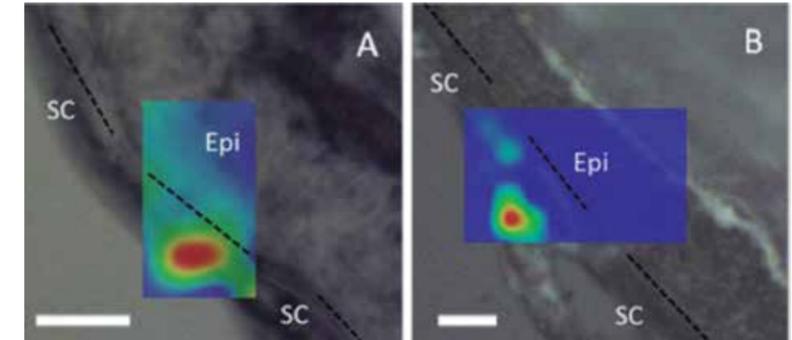


Figura 6. Imágenes de la piel con un mapa químico coloreado superpuesto que indica mayor (rojo) y menor (azul) presencia y distribución de una molécula sonda (derivado del tris-carbonil de renio) incorporada en un vehículo de la plataforma Bicosome (A, la barra representa 20 μm) y en DMSO (B, la barra representa 75 μm). Para facilitar la visualización se marca la separación del estrato córneo (SC) y la epidermis con una línea blanca discontinua



carbonil de renio presenta vibraciones que no se solapan con las vibraciones características de las moléculas de la piel, lo que permite su seguimiento mediante microespectroscopia de IR.

En la Figura 6A se observa claramente cómo el vehículo de la plataforma Bicosome es capaz de transportar la molécula modelo hasta la epidermis, mientras que el activo en DMSO se queda en la superficie de la piel (Figura 6B).

Esta técnica además se ha usado para la caracterización estructural de la médula, córtex y cutícula de cabellos [5], la detección de procesos como la tinción y la detección de productos químicos o fármacos, o incluso en la caracterización de pruebas forenses [10].

CONCLUSIONES

La microespectroscopia de infrarrojo con luz sincrotrón permite caracterizar la piel con un alto grado de complejidad que con técnicas convencionales no sería abordable. Esta técnica nos permite estudiar la piel dando información sobre su distribución lipídica; permite también ver el efecto de agentes externos como fármacos sobre esta, además de ver cómo penetra un fármaco o vehículo en la piel. En este artículo se ha presentado cómo el conocimiento profundo de la estructura de la piel y el efecto de activos y fármacos en las capas de la piel

puede ayudar a comprender los procesos asociados a alteraciones cutáneas para diseñar activos, fármacos y/o vehículos más eficaces para su tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Creagh D., Tobin M., Broadbent A., McKinlay J. 2007, American Institute of Physics, 879, 615.
- [2] Santoro G., Yousef I., Jamme F., Dumas P., Ellis G. 2011, Rev. Sci. Instrum. 82, 033710.
- [3] Dumas P., Polack F., Lagarde B., Chubar O., Giorgetta J.L., Lefrançois S. 2006, Infrared Phys. 49, 152.
- [4] Leroy M., Lafleur M., Auger M., Laroche G., Pouliot R. 2013, Characterization of the structure of human skin substitutes by infrared microspectroscopy. Anal Bioanal Chem 405: 8709. doi:10.1007/s00216-013-7103-y
- [5] Kreplak L., Briki F., Duvallet Y., Doucet J., Merigoux C., Leroy F., Lévêque J. L., Miller L., Carr G. L., Williams G. P., Dumas P. 2001, Profiling lipids across Caucasian and Afro-American hair transverse cuts, using synchrotron infrared microspectrometry. Intern.J. of Cosmetics Science. 23 1-6, 369-374
- [6] Lampe M. A., Burlingame A. L., Whitney J., Williams M. L., Brown B. E., Roitman E., and Elias P. M. 1983, Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations, J. Lipid Res., 24, 120-130.
- [7] McIntosh T.J. 2003, Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol, Biophys. J., 85 (3), 1675-1681.
- [8] J. van Smeden J., Janssens M., Gooris, G.S., Bouwstra J.A. 2014, The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function, Biochim. Biophys. Acta, 1841, 295-313
- [9] Rodríguez G., Cócera M., Rubio L., Alonso C., Pons R., Sandt C., Dumas P., López-Iglesias C., de la Maza A., López O. 2012, Bicular systems to modify the phase behaviour of skin stratum, Phys. Chem. Chem. Phys., 14, 14523-14533
- [10] Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology. Escrito por Steven H.Y. Wong, Irving Sunshine. CRC Press. ISBN 0-8493-2648-6