



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL
Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFICIE AMPLIFICADA (SERS)”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

M.C. BLANCA NOHEMÍ ZAMORA MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ CASTILLO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. RICARDO ESPINOSA TANGUMA

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

AGOSTO DEL 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS PROGRAMA DE
POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL
Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFICIE AMPLIFICADA (SERS)”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

M.C. BLANCA NOHEMÍ ZAMORA MENDOZA

SINODALES

PRESIDENTE

DR. RICARDO ESPINOSA TANGUMA _____

SECRETARIO

DRA. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ
CASTILLO _____

VOCAL

DR. MIGUEL GHEBRÉ RAMÍREZ ELÍAS _____

VOCAL

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA _____

VOCAL

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ LÓPEZ _____

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

AGOSTO DEL 2022

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

Proyecto realizado en:

Tres escuelas primarias públicas de San Luis Potosí, Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, y en el laboratorio de espectroscopía raman de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología CIACyT/UASLP

Con financiamiento de:

Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de San Luis Potosí: **FMSLP-2014-C02-251723** denominado “Identificación de perfiles genéticos, proteómico y factores de riesgo asociados a las enfermedades no transmisibles y sus comorbilidades e implementación de intervenciones educativas para su prevención”

“El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 00588, en el Nivel Doctorado (en desarrollo). Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: CVU-391558”



Licencia Creative Commons

“Identificación de biomarcadores de asma infantil y su detección en fluidos biológicos mediante espectroscopía Raman amplificada por superficie”, por Blanca Nohemi Zamora Mendoza se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional .

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

San Luis Potosí, S.L.P.

Agosto 17, 2022

Comité Académico del Posgrado
En Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente. _

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Doctorado Blanca Nohemí Zamora Mendoza, titulada; **“Identificación de biomarcadores de asma infantil y su detección en fluidos biológicos mediante espectroscopía Raman amplificada por superficie”**, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día miércoles 24 de agosto del presente año a las 9:30 horas, en la sala audiovisual del posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas.

ATENTAMENTE

Dra. María del Carmen González Castillo _____
Director de Tesis

Dr. Ricardo Espinosa Tanguma _____
Co- director

Dr. Miguel Ghebré Ramírez Elías _____
Asesor

Dr. Sergio Rosales Mendoza _____
Asesor

Agradecimientos académicos:

A quienes hicieron posible el desarrollo de este proyecto; familia, directora de tesis, asesores, docentes y colaboradores de tesis. Al Dr. Carlos Adrián Jiménez González quien a lo largo de mi carrera profesional me ha inspirado e impulsado en el desarrollo de la investigación en salud pulmonar, así mismo agradezco a la población de estudio por su disponibilidad y aportación al conocimiento, que es a quienes se debe principalmente el beneficio de esta contribución científica.

Agradezco al Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología (COPOCYT), por incentivar y apoyar la investigación en enfermedades respiratorias crónicas, particularmente sobre el daño pulmonar Post-COVID-19, mediante el proyecto:

Desarrollo y evaluación de un sistema de tamizaje basado en metabolómica exhalatoria para la detección y clasificación de daño pulmonar post-COVID mediante métodos de aprendizaje automatizado, financiado por el FIDEICOMISO 23871 MULTAS ELECTORALES CONVOCATORIA 2021-01, en el que he participado en el desarrollo e implementación del mismo así como en la producción científica derivada a lo largo de mi formación académica de doctorado.

Dedicatoria:

A mi madre, tía y abuela por caminar siempre junto a mi, quienes con su ejemplo y apoyo incondicional me impulsan siempre a seguir adelante.

Especialmente dedicado a mi hija Tersa Jazzmine; siempre que tu curiosidad sea incansable y viertas tu corazón en lo que amas, para bien del prójimo; encontraras un espacio de plena felicidad

En memoria de:

Terapeuta Respiratorio José David Vazquez Rivera†

Amigo y maestro, siempre dispuesto a colaborar en el presente y diversos proyectos de investigación, dedicó su vida profesional al cuidado respiratorio de sus pacientes, al frente de la batalla contra el COVID-19.

ÍNDICE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ	1
1. Resumen.....	8
2. Abstract.....	9
3. Introducción.....	10
4. Marco teórico.....	12
4.1. Epidemiología del Asma Infantil.....	12
4.2. Diagnóstico e inflamometría en asma infantil	13
4.3. Biomarcadores en inflamación bronquial.....	14
4.3.1. Papel de sCD163 e IL-10 en Asma	16
4.4. La Saliva como fluido diagnóstico.....	18
4.5. Espectroscopia Raman Amplificada por Superficie (SERS) y su aplicación en biomedicina	21
5. Justificación	25
6. Hipotesis	27
7. Objetivo general.....	27
7.1. Objetivos específicos	27
8. Material y Métodos.....	27
8.1. Fase I: Estandarización, reclutamiento y recolección.....	28
8.2. Fase II. Procesamiento y análisis	37
9. Resultados.....	41
10. Discusión	52
11. Conclusiones.....	56
12. Limitaciones y Perspectivas:.....	57
13. Bibliografía.	58

1. Resumen.

Antecedentes. El asma es una enfermedad heterogénea caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias y actualmente considerada un problema de salud pública. El asma es una de las principales causas de morbilidad infantil en el mundo. La detección precoz de la inflamación bronquial en el asma, de manera no invasiva, simple e incluso subclínico, conduciría a un control más eficaz de esta patología. Objetivo. Identificar biomarcadores de inflamación bronquial en fluidos biológicos (saliva) de escolares con asma mediante inmunoensayo y espectroscopia Raman mejorada de superficie (SERS). Métodos. Se realizó un estudio transversal analítico en 44 niños entre 6 y 12 años, el diagnóstico de asma se realizó bajo los estándares de la Iniciativa Global para el Asma (GINA). La saliva fue analizada mediante inmunoensayo para la cuantificación de un panel de 37 citoquinas, así como análisis SERS a 785 nm. Resultados. Se identificó una asociación significativa entre la obstrucción bronquial e IL-8 (p val 0,004), IL10 (p val 0,008) y sCD163 (p val 0,003). Los espectros Raman mostraron una amplificación significativa en la región de 760 a 1750 cm^{-1} . El método PCA-LDA tiene una sensibilidad del 85%, especificidad del 82% y una exactitud del 84% para el diagnóstico de asma. Conclusiones. Estos resultados demuestran la presencia de inflamación subclínica sugestiva de remodelación bronquial en la población estudiada. El método SERS representa una potencial herramienta para la identificación oportuna de inflamación bronquial, así como endotipo, proporcionando un diagnóstico altamente sensible y específico.

Palabras clave: asma, saliva, SERS, citoquinas.

2. Abstract.

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic inflammation of the respiratory tract and currently considered a public health problem. Asthma is one of the main causes of childhood morbidity in the world. The early detection of bronchial inflammation in asthma, in a non-invasive, simple and even subclinical state, would lead to a more effective control of this condition. The aim was to identify biomarkers of bronchial inflammation in biological fluids (saliva) of schoolchildren with asthma by immunoassay and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). A cross-sectional study was conducted in 44 children between 6 and 12 of age, the diagnosis of asthma was given under the standards of the Global Initiative for Asthma (GINA). The saliva of the children was analyzed by immunoassay for the quantification of a panel of 37 cytokines, as well as SERS analysis in a confocal Raman microscope at 785 nm. We found a significant association was identified between bronchial obstruction and IL-8 (*p val* 0.004), IL10 (*p val* 0.008) and sCD163 (*p val* 0.003). The Raman spectra showed significant amplification in the region of 760 to 1750 cm^{-1} . The PCA-LDA method has a sensitivity of 85% and specificity of 82% and an accuracy of 84% for the diagnosis of asthma. These results demonstrate the presence of sub-clinical inflammation suggestive of bronchial remodeling in the population studied. The SERS method is a potential tool for identifying bronchial inflammation and its endotype and providing a highly sensitive and specific diagnosis.

Key words: asthma, saliva, SERS, cytokines.

3. Introducción

El asma es una enfermedad heterogénea caracterizada por inflamación crónica de las vías respiratorias con variabilidad del flujo de aire y síntomas como; disnea, sibilancias, opresión en el pecho y tos que varían en el tiempo su frecuencia e intensidad. Este padecimiento afecta a más de 235 millones de personas en todo el mundo y es considerado una de las principales Enfermedades No Transmisibles (ENT), esta enfermedad afecta de forma considerable a la población infantil y es de las principales causas de morbilidad infantil en países en vías de desarrollo ^{1,2}. Ante este panorama la Alianza Mundial Contra las Enfermedades Respiratorias Crónicas (GARD) reconoce que, aunque la respiración es fundamental para la vida, la salud pulmonar es menos reconocida como un factor crítico de salud que otros indicadores. ³ Así, la innovación para la identificación de biomarcadores potenciales como guía en el diagnóstico, e incluso en la discriminación de endotipos inflamatorios de la enfermedad para el adecuado tratamiento y control del asma, cobra gran relevancia dentro de las estrategias internacionales de salud.

A este respecto, diversas investigaciones se han centrado en establecer biomarcadores para el diagnóstico y el control de esta enfermedad, entendiendo que las interacciones entre factores predisponentes y vías de señalización celulares de las vías aéreas, en especial del sistema inmunológico, explican la expresión clínica heterogénea que se puede presentar en cada paciente, a lo que se conoce como fenotipo ^{4,5} Así mismo esta heterogeneidad ha permitido la identificación de más de 100 biomarcadores para este padecimiento, dentro de los cuales las citocinas proinflamatorias segregadas por linfocitos T helper 1 y 2 (Th1/Th2) juegan un papel relevante en la inflamación bronquial, estas son proteínas que intervienen en la diferenciación y maduración de las células del sistema inmune, contribuyendo a la comunicación entre ellas⁶, estas citocinas son capaces de viajar por el torrente sanguíneo y atravesar barreras biológicas permeables, motivo por el cual es posible realizar su detección en saliva y otros fluidos biológicos ⁷.

Algunos reportes científicos han identificado que, en pacientes con asma grave, de difícil control, se ve incrementado significativamente el recuento de neutrófilos en sangre asociado a su vez asociado al aumento de Interleucina 8 (IL-8), en comparación con pacientes que cursan con síntomas menos graves⁸⁻¹¹, este mecanismo estimula la expresión de metaloproteasas que destruyen la matriz extracelular y contribuyendo a remodelación bronquial de manera importante. Así mismo la IL-8 se ha visto especialmente asociada a una pobre respuesta a corticoesteroides inhalados, y al asma grave de difícil control (7). Por otro lado, en contraste IL-10 es una citocina inmunomoduladora considerada una citocina Th2 con función central y efectos antiinflamatorios, al inhibir la respuesta proinflamatoria del sistema inmune, previniendo lesiones en tejidos, y promoviendo la producción de Inmunoglobulinas tipo G (IgG) que protegen al organismo contra respuestas alérgica. (8) La inmunoterapia específica aumenta la producción de IL-10 mediante linfocitos T helper, contribuyendo a hacerla más efectiva. Así mismo CD163, es una proteína que se expresa en la superficie de macrófagos, ejerciendo acciones antiinflamatorias que conducen a la conduciendo a la síntesis aumentada de IL-10 y monóxido de carbono como potentes moléculas antiinflamatorias inhibiendo la proliferación de células T, la regulación de la expresión in vitro de CD163 la cual a su vez se encuentra regulada por IL-6, 10, IL-4, TNF- α principalmente (13-15)

Algunos métodos para determinar el fenotipo y grado de inflamación bronquial implican técnicas invasivas como punción venosa y otros potencialmente riesgosos como aspirado bronquial, así como pruebas de función pulmonar mediante Óxido Nítrico Exhalado y espirometría que requiere habilidades motoras aún no desarrolladas por algunos infantes o personas con discapacidad. Por lo que se han implementado e innovado diferentes técnicas de identificación fáciles, no invasivas, que no requieran una laboriosa preparación de muestra, económica, altamente sensibles e incluso con un equipo portátil, como la Espectroscopia Raman Amplificada por Superficie (SERS) mediante nanobarras de oro (NRs Au), la cual ha permitido la identificación de

biomarcadores en fluidos biológicos según reportes científicos sobre diversos padecimientos, a excepción de asma infantil en saliva. El análisis de los espectros Raman proporcionan información de las propiedades moleculares, modos y cambios de energía, esta identificación se lleva a cabo en los picos que conforma el espectro, donde la banda principal corresponde a Rayleigh y dos bandas secundarias llamadas Raman (Stokes y anti-Stokes), así cada molécula que conforma el fluido o materia a analizar muestra un espectro característico obteniendo una huella digital del mismo que es único para cada molécula. (3)

Por otro lado, la integración de NRs Au a las muestras de saliva ha demostrado obtener una amplificación de espectro Raman, logrando la identificación de moléculas a concentraciones mínimas, incluso de una sola molécula (3). Por lo cual el objetivo del presente trabajo ha sido identificar citocinas como potentes biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo del fenotipo inflamatorio de asma infantil en saliva, mediante SERS. En este sentido IL-8 ha sido previamente identificada en suero mediante espectroscopia Raman, en el rango de 1326 cm^{-1} , con un límite inferior de detección de 6.2 pg/mL . Así mismo el pico característico de IL-10 se ha identificado en el rango de $775\text{-}875\text{ cm}^{-1}$. Sin embargo, aún no existen reportes en la literatura sobre la determinación de CD163 mediante SERS, diversos estudios reportan una sensibilidad y especificidad por encima del 80% (9,10)

4. Marco teórico

4.1. Epidemiología del Asma Infantil

Según la iniciativa mundial del asma (GINA) se calcula que el asma afecta a 230 millones de personas en todo el mundo. Constituye un grave problema de salud a escala mundial que afecta a todos los grupos de edad, este problema también es atribuido al medio y los cambios dinámicos actuales, ya que una parte importante de asmáticos con fenotipo alérgico, son afectados por la creciente contaminación ambiental y cambios climáticos, aunado a diversos fenotipos. Existe una prevalencia

creciente en muchos países en desarrollo, con costos de tratamiento en aumento y un impacto cada vez mayor para los pacientes y para la sociedad. El asma se considera como un costo y afección inaceptable para el sistema de salud y para la sociedad debido a la pérdida y/o disminución de productividad laboral, particularmente en el caso del asma infantil la pérdida de la vida académica y social fundamental para un adecuado desarrollo que altera la vida familiar (1).

Asma se define actualmente como una enfermedad heterogénea caracterizada por inflamación crónica de las vías aéreas, esta es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia y constituye la primera causa de morbilidad en América Latina con una prevalencia que varía de 5.7 a 16%, en México se describe un 6% (1-3).

Esta enfermedad genera síntomas como sibilancias, disnea o dificultad para respirar, opresión torácica y tos que se presentan de forma variable a lo largo del tiempo en frecuencia e intensidad. Dichos síntomas se asocian a también a la variabilidad del flujo de aire espiratorio, es decir, dificultad para exhalar el aire de los pulmones a causa de broncoconstricción, engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias y secreción de mucosidad creciente (1,11,20).

Los factores desencadenantes y/o los alérgenos inhalados inducen la activación de las células cebadas y macrófagos, con la consecuente liberación de varios mediadores pro-inflamatorios, incluyendo leucotrienos, factores quimiotácticos y citocinas. Los antígenos procesados y presentados por los macrófagos a los linfocitos Th1, bajo la influencia un patrón adecuado de citocinas estimula la diferenciación a un patrón de citocinas Th2 lo que a también estimulan la excreción de acelerada de IL- 4 e IL- 5, los cuales propician la síntesis de IgE por los linfocitos B y eosinofilia (22).

4.2. Diagnóstico e inflamometría en asma infantil

La guía para el manejo del asma propuesta por GINA recomienda el establecimiento del diagnóstico con el apoyo de la historia clínica, exploración física y pruebas objetivas (1). Para el establecimiento del diagnóstico en menores de 6 años,

se han propuesto índices predictivos basados en; antecedentes heredofamiliares de asma, antecedentes de dermatitis atópica, sensibilidad a alérgenos, los cuales constituyen criterios mayores, para los criterios menores se enuncian; antecedentes de rinitis alérgica, eosinofilia en sangre mayor a 2%, antecedentes de episodios de sibilancias no relacionados con infecciones respiratorias y sensibilización a alérgenos alimentarios, en el caso donde las pruebas objetivas no son factibles de aplicar debido a la coordinación y técnica que se requiere (26-27)

En los resultados de espirometría como prueba objetiva; una prueba de broncodilatador positiva (aumento >12% o de 200 ml en FEV₁ después de aplicar salbutamol inhalado, con respecto a una espirometría basal o con FEV₁ normal) más signos clínicos, sugiere asma y en un paciente que ha sido tratado con SABA o LABA, en las 12 horas previas, sugiere asma no controlada. (1,2,4) La variabilidad de FEV₁, entre las visitas (<12% de una semana a otra o 15% de un año a otro en individuos sanos) limita su empleo para ajustar el tratamiento del asma en la práctica clínica. Se ha descrito que la diferencia mínima importante en cuanto a la mejoría y el empeoramiento del FEV₁, en función de la percepción de cambio del paciente es de aproximadamente un 10% ¹²

Por otro lado, la inflamometría definida como la determinación de la inflamación bronquial la cual incluye diferentes técnicas que permiten determinar y monitorizar la inflamación en el asma bronquial, para mejorar su control y contar con una guía terapéutica. Así, el conteo de eosinófilos en esputo inducido constituye el estándar de oro, a la vez que la determinación de la Fracción Exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) nos permite establecer indirectamente el grado de inflamación eosinofílica ^{13,14}

4.3. Biomarcadores en inflamación bronquial

El fenotipo inflamatorio se encuentra dado por biomarcadores, donde la literatura actual proporciona más de cien biomarcadores para la detección de inflamación bronquial en asma, esta gran variedad es debido a la heterogeneidad del padecimiento

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

ya que en un mismo paciente se pueden presentar uno o varios fenotipos y endotipos de asma que incluso pueden cambiar en un mismo paciente con el tiempo o las condiciones del medio ⁴. Para interés de este estudio se realizó una extensa revisión, donde podemos mencionar los biomarcadores más estudiados en el tipo de muestra a utilizar en esta investigación (saliva y suero) y que han resultado con la mayor significancia, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Biomarcadores con mayor significancia clínica y estadística identificados en saliva y otros fluidos

BIOMARCADOR	MUESTRA	<i>p</i> val	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	INDICADOR CLÍNICO
CL5, FeNO, IL3-18, Eosinófilo	Suero, EBC, Espudo inducido	NR	Artículo de revisión	Diagnóstico, respuesta terapeutica
IL-4,5,13,25,33	Suero	NR	Artículo de revisión	Diagnóstico, respuesta terapeutica
IL-3, 18, FGF, HGF, SCGF	Suero	0.03 IL3 Y 18	Multiplex assay.	Diagnóstico, Pronostico
IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF-a	EBC y suero	0.013 0.018 0.04	ECB, Multiplex	Diagnóstico
ECP, Prot total, IL-8, Isoprostano, surfactant protein A (SPA) YKL-40	-EBC -Saliva -Espudo Inducido	0.010-0.05	-Plus Protein Assay Kit, Pierc -ELISA -Electrophoresis	Diagnóstico

Por lo anterior y dado la gran cantidad y variedad de biomarcadores se han tomado en cuenta algunos criterios para la selección de estos a fin de llevar a cabo el presente estudio.

Criterios de elegibilidad:

- Biomarcadores característicos del padecimiento, que muestren mayor prevalencia en la población de estudio.
- Que cuenten con fundamento fisiopatológico y estudios previos que los sustenten
- Factibilidad de la medición en fluidos biológicos y de forma no invasiva
- Biomarcadores que apoyen el diagnóstico de asma, permitan identificar endotipo y/o le grado de inflamación bronquial
- De forma exploratoria durante prueba piloto: Identificación de frecuencias significativas que indiquen la tendencia de un biomarcador diferente a los planteados.

4.3.1. Papel de sCD163 e IL-10 en Asma

CD163 (Cluster of Differentiation 163) es una proteína transmembrana de tipo I con un peso molecular de 130 kDa, pertenece a la clase B de la familia de receptores “scavenger” ricos en cisteína, fue identificada por primera vez en 1987¹⁵. La expresión de CD163 en monocitos circulantes y en la mayoría de los macrófagos tisulares es constitutiva y / o es inducida por algunos estímulos ¹⁶. Así mismo se ha reportado que CD163 se une a bacterias patógenas humanas y al inductor débil de apoptosis similar a TNF- α (TWEAK). CD163 se expresa solo en células del linaje monocítico-macrófago, y su expresión aumenta a medida que los monocitos maduran en macrófago y es particularmente alta en macrófagos en el hígado (células de Kupffer), pulpa roja del bazo, pulmones y médula ósea ¹⁷. En la forma soluble como sCD163 es un marcador de macrófagos activados ya que después de un estímulo inflamatorio o estrés

oxidativo, sCD163 se libera de la superficie celular por escisión proteolítica de CD163 haciendo posible su detección en fluidos biológicos ¹⁸así mismo participa en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, diabetes, cáncer y asma bronquial donde existe una inflamación inespecífica de las vías respiratorias, y donde los macrófagos CD163 + M2 activados alternativamente tienen un papel clave en esta afección patológica. A través de la fagocitosis y la posterior liberación de sustancias biológicamente activas, los neutrófilos participan en los mecanismos de defensa de las vías respiratorias. Después de completar su misión, los neutrófilos sufren apoptosis. Los macrófagos eliminan eficazmente los neutrófilos apoptóticos, un proceso crítico para suprimir la inflamación aguda y restablecer la homeostasis ¹⁶⁻²²

Se ha revelado que la elastasa de neutrófilos mejora el desprendimiento de CD163 y sCD163 es un marcador de activación de macrófagos. La elastasa de neutrófilos sirve como un marcador de activación de neutrófilos, lo que sugiere que la activación de los macrófagos está asociada con la activación de neutrófilos, así como también se ha sugerido un desequilibrio Th1 / Th2 como indicador de la patogénesis del asma, donde por su parte las citocinas Th2, como IL-4, IL-13 e IL-10, pueden influir en la activación de los macrófagos M2 ^{16,23}Fenómenos que son más comúnmente observados en el fenotipo de asma alérgica de difícil control.

Este endotipo de asma alérgica es causada por respuestas inmunitarias inapropiadas impulsadas por Th2 a antígenos "inofensivos" o alérgenos en el medio ambiente. Las células T reg productoras de CD4, CD25 e IL-10 pueden regular la sensibilización alérgica mediante de efectos inhibitorios sobre las células Th2 o sobre las células dendríticas (DC) en el pulmón. Las células T reg también pueden inducir la producción de la citocina inmunosupresora IL-10 por parte de las células T del pulmón huésped. A su vez, las CD pueden producir citocinas inmunomoduladoras como IL-6, que se ha demostrado que inhibe la función de las células T reg CD4 CD25, e IL-10, que se ha demostrado que induce las células T reg productoras de IL-10 ²³

Por su parte, IL-10 e IL-6 promueven el desprendimiento de sCD163 de los macrófagos M2, mientras que la liberación de Th17 e IL-17 puede inhibir la apoptosis de los macrófagos CD163 + M2. Además, los macrófagos M2 están asociados con los linfocitos T. IL-4 e IL-13 pueden estimular la activación de eosinófilos. sCD163, un marcador de macrófagos M2, se asocia con el recuento de eosinófilos a través de varias citocinas ¹⁵. Por lo tanto, investigar el papel de sCD163 puede contribuir a elucidar los mecanismos moleculares subyacentes del asma, y puede representar un objetivo prometedor para el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento del asma.

4.4. La Saliva como fluido diagnóstico.

La saliva es conocida como un fluido secretado por las glándulas salivales, de viscosidad diversa, conforme el grado de hidratación y la fase digestiva en la que se encuentre; su composición es un reflejo de la del plasma ya que contiene agua, iones, mucina, proteínas plasmáticas, leucocitos y detritos celulares. Estos componentes sirven para humedecer y lubricar el paso de los alimentos, facilitando su demolición y la formación del bolo alimenticio para la digestión del almidón gracias a su contenido en α -amilasa ²⁴

Las moléculas pequeñas que provienen del suero se introducen en las glándulas salivales mediante difusión pasiva desde los lechos de capilares que rodean y empapan las glándulas salivales. La saliva es un fluido diluido, el cual contiene un 99% de agua y sirve como solvente para otros componentes que la forman y un 1% de sólidos disueltos; los cuales pueden ser diferenciados como: componentes orgánicos proteicos, componentes no proteicos y componentes inorgánicos o electrolitos. Contiene también material proveniente del surco. Puede ser considerada como un filtrado del suero, puesto que se deriva de la sangre. Lo anterior denota que los mecanismos de secreción de saliva y sus componentes se encuentran estrechamente correlacionados a los procesos de feedback de flujo sanguíneo del cuerpo mediante las glándulas excretoras salivales. La saliva que proviene de la

glándula parótida contine alta concentración de iones de bicarbonato y amilasa, mientras que la secreción de la glándula submandibular es alta en mucina y calcio; la cual es bastante alta comparada con la del plasma ²⁵

Los electrolitos se ponen en contacto con la saliva por la vía de gradiente osmótico siendo regulados por su velocidad de secreción, conforme su naturaleza del estímulo y grado de mineralocorticoides en la circulación sanguínea. Los componentes de la saliva son generados en gran medida de la síntesis proteica y son almacenados como gránulos en la célula del acino. Como los componentes séricos que encontramos en la saliva derivan principalmente de la vasculatura local, que se origina desde las arterias carótidas, la saliva es un fluido en el que encontramos casi las mismas moléculas que en la circulación sistémica, este hecho hace que la saliva sea un fluido potencialmente válido para el diagnóstico de enfermedades sistémicas ^{26,27}

Los mecanismos de transporte son diversos:

1. A través de ranuras entre las células acinares (peso molecular inferior a 1900 D).
2. Filtración a mediante poros de membranas celulares (peso molecular menor a 400 D como agua y electrolitos).
3. Mecanismo selectivo a través de las membranas celulares:
 - a. Difusión pasiva de moléculas lipofílicas (ejemplo: esteroides).
 - b. Mediante Transporte activo de canales proteicos (péptidos).
4. A través de pinocitosis (enzimas).

La concentración de proteínas en el fluido salivales alrededor de 200mg/mL, representando aproximadamente del 3% de la concentración de proteínas del plasma. Esto comprende enzimas, inmunoglobulinas (IgE, IgG) , así como glicoproteínas y albúminas principalmente. Los componentes inorgánicos se encuentran en forma iónica y no iónica. De los electrolitos, los más importantes son: el sodio (Na), potasio (K), cloruro (Cl) y bicarbonato (HCO_3); mismos que favorecen la osmolaridad salival, conformando medio plasma, siendo hipotónica en relación con el plasma ²⁴

La cantidad de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos disueltos puede tener variaciones de individuo a individuo conforme su flujo salival, nivel de hidratación, el estado de salud, todo aquello implicado en el equilibrio ácido base, osmosis, flora bacteriana etc. ²⁵

La cantidad de iones bicarbonato presentes en la saliva cuando se está en reposo está significativamente disminuido que, durante la estimulación salival, considerando que, al incrementar la concentración de bicarbonato, a su vez aumenta el pH y la efectividad amortiguadora de la saliva. El proceso fisiológico amortiguador de saliva es debido principalmente a la presencia del bicarbonato debido a la influencia del fosfato. Esto se refleja en la capacidad de la saliva para contrarrestar los cambios de pH, participando en la protección de los tejidos de la mucosa oral que están en contacto con los ácidos, resultado del proceso de digestión, propiamente de la comida, bacterias y otros microorganismos patógenos, así como factores ambientales dañinos.

Esta función amortiguadora actúa convirtiendo un fluido más débilmente ionizado, cuando libera una baja concentración de H^+ o bien OH^- . Siendo el bicarbonato el principal amortiguador, del que la concentración en saliva varía en relación con el flujo y equilibrio hidro electrolítico ²⁴⁻²⁶

4.5. Espectroscopia Raman Amplificada por Superficie (SERS) y su aplicación en biomedicina

La espectroscopía Raman es una técnica de análisis de alta resolución que aporta información sobre los movimientos rotacionales y vibracionales de los iones y, átomos enlazados químicamente de una muestra determinada, dichas vibraciones tienen un valor de frecuencia específico que las caracteriza y diferencia del resto²⁸. Esta información es obtenida gracias al llamado efecto Raman, descrito por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman en 1928, hecho por el que fue galardonado con el premio nobel de física en 1930, quien al efectuar un experimento relativamente sencillo, analizo la dispersión de la luz en el agua observando un cambio de color en el rayo de luz que atravesaba el agua, a partir de ello y tras diversos experimentos y publicaciones, se fundamenta que la mayor parte de la luz dispersada tiene la misma frecuencia que la luz incidente lo que se conoce como dispersión Rayleigh, pero una pequeña parte de esta luz modifica su frecuencia al interactuar con la materia, conocida como dispersión Raman, en donde si el fotón dispersado posee una frecuencia menor a la de la luz incidente, generando una transferencia de energía del fotón hacia la molécula de la muestra; se conoce como dispersión Raman Stokes, por el contrario si el fotón dispersado posee una frecuencia mayor a la incidente donde la molécula transfiere energía al fotón, se conocer como dispersión Raman anti-Stokes. El espectro de la dispersión Stokes, es el mayormente utilizado para su interpretación debido a que su intensidad de dispersión es cien veces superior a la anti-Stokes²⁹.

Así, hoy en día dicha técnica ha sido perfeccionada gracias al desarrollo y mejora tecnológica de equipos conocidos como espectroscopios Raman, de los cuales es posible la digitalización y visualización de los espectros emitidos por una muestra³⁰. El principio fundamental de los equipos de espectroscopía Raman consiste en hacer incidir una luz monocromática a una longitud de onda conocida mediante un monocromador, dicha luz es recolectada y guiada mediante fibra óptica hasta el cabezal óptico que focaliza la luz sobre la muestra, al interactuar los fotones de la luz incidente con las moléculas de la muestra, se genera una transferencia de energía en

modos vibracionales absorbiendo y emitiendo un fotón Raman en la luz dispersada que es también recolectada por el cabezal óptico hasta el monocromador para su separación espacial y espectral que posteriormente transforma los fotones dispersados en señal eléctrica y digital mediante un dispositivo de caga acoplada (CDC) . Así mismo la reciente implementación de la fibra óptica para la colección de luz, limita la interferencia de campos electromagnéticos externos mejorando la calidad del espectro^{28,30}

Una mejora del sistema es la microscopía confocal Raman (CRM), la cual proporciona información sobre la distribución, profundidad y estructura de la muestra con alta resolución espacial, facilitando la selección del sitio a evaluar conforme el objetivo y análisis de muestra por mapeo sistemático, así como análisis de capas con dimensiones tan bajas como 1 μm e inferiores, con una estable adquisición de señales, limitando la presencia de diversos tipos de ruido espectral. La CRM aumenta significativamente la sensibilidad, precisión y resolución espectral en comparación con otros sistemas tradicionales³¹.

El espectro Raman digitalizado, conforme la transición en el nivel de energía de las moléculas contenidas en la muestra es representada con la intensidad óptica dispersada en relación con el número de onda, lo que podemos identificar como corrimiento (número de onda, cm^{-1}) del fotón emitido, siendo una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a longitud de onda. De esta manera, mediante las bandas o picos del espectro es posible identificar los niveles energéticos de las moléculas que son únicos y químicamente específicos^{30,32}.

Desde el descubrimiento del llamado efecto Raman y al día de hoy la espectroscopia Raman ha sido desarrollada y aplicada en diversas ramas de la ciencia, una de ellas en el diagnóstico de diversos padecimientos ya que una de las ventajas de esta técnica de análisis es que se realiza directamente sobre el material o fluido a analizar sin necesidad de ningún tipo de preparación especial, no con lleva a ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir es no

destruccion, lo que lo convierte en una herramienta clínica muy prometedora para el apoyo diagnóstico de asma, por su practicidad, facilidad de transporte, análisis con muestras obtenidas de forma no invasiva y alta sensibilidad y especificidad reportada previamente en otros estudios diagnósticos³³⁻³⁵. Así mismo, ha permitido identificar patrones espectrales y algunos biomarcadores a través de las variaciones estructurales de los picos del espectro, que corresponden a vibraciones moleculares específicas³⁰⁻³².

Así en comparación con otras técnicas espectroscópicas como Infra Rojo y cercano infrarrojo, la espectroscopía Raman muestra ventajas estratégicas con relación a la muestra y su contenido, y se mencionan a continuación^{28,36}.

Tabla 2. Ventajas de la espectroscopia Raman frente a otras técnicas de análisis vibracional

	FTIR	NIR	RAMAN
Interacción	Absorción: intensidad de bandas depende de la saturación molecular.		Dispersión: capaz de detectar ínfima cantidad de moléculas.
Selectividad	Alta. Los espectros pueden ser interpretados directamente.	Baja. Se requieren extensas calibraciones y quimiometría para distinguir materiales;	Alta. Los espectros pueden ser interpretados directamente.
Interferencia	La señal es afectada por atributos físicos de la muestra como su forma, su tamaño, su dureza y la compactación de sus partículas.		El agua emite señal raman muy débil que no interfiere, emisión de fluorescencia de los materiales.
Muestreo	Se requiere preparación, cantidad de muestra mínimo, no destructiva, mediciones en celdas de cuarzo.		Mínima cantidad de muestra, no la destruye, No requiere preparación especial. Uso de sustratos sin emisión Raman.
Portabilidad y tiempo de muestreo	Ambientes estáticos, controlados		Ambiente estático y portátil

Por otro lado, también han sido desarrollados y mejorados los métodos de análisis mediante la mezcla nanopartículas metálicas con muestras biológicas, como un método de mejora en la amplificación del espectro llamado SERS por sus siglas en inglés (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), dicho fenómeno es generado de un campo de alta intensidad electromagnética que se localiza en las nanoestructuras que, al ser estimulado por un láser, genera una resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). El LSPR es la oscilación conjunta de electrones en la banda de conducción de la nanopartícula metálica³⁷.

En este sentido las nanopartículas de plata y oro son las más comúnmente utilizadas ya que su LSPR se encuentra en la región visible del espectro electromagnético, donde se realizan la mayoría de los experimentos de espectroscopia Raman. El oro es a menudo un metal preferido para los sustratos SERS debido a su fuerte respuesta plasmónica por encima de 600 nm, excelente biocompatibilidad, y en particular, la gran cantidad de estrategias sintéticas para producir partículas de oro monodispersas de definido tamaño y forma³⁸.

Entre las variadas nanoestructuras de oro sintetizadas hasta la fecha, las nano barras de oro (NRs Au) son de mayor interés particularmente en las últimas décadas, debido a su capacidad de sintonización plasmónica, que puede ser fácilmente ajustado sobre el rango de longitud de onda UV-vis-NIR, controlando la relación forma- tamaño de la barra. Debido a las importantes propiedades plasmónicas, dimensiones y la organización de estos bloques de construcción, como matrices de NRs Au poco espaciadas, y con mayor superficie de contacto a diferencia de otras formas de nanopartículas, se ha convertido en un área activa de interés y puede ser explotada en SERS para permitir la detección ultrasensible de moléculas. La utilización de NRs Au y la evaporación inducida es uno de los métodos más eficientes y de bajo costo para organizar nanoestructuras en ensamblajes a gran escala. Al ajustar la tasa de

evaporación, matrices de NRs Au alineadas verticalmente con alta uniformidad y reproducibilidad se puede producir, con uso potencial como sustratos SERS^{37,38}

Otros materiales como las nanopartículas de aluminio muestran una LSPR en longitudes de onda ultravioleta y pueden generar SERS. Cuando se excita, la oscilación de los electrones concentra la radiación láser en campos electromagnéticos locales intensos en la superficie de la nanoestructura. Moléculas muy próximas (generalmente < 5nm) a la superficie de la nanoestructura experimentan este campo y generan una mayor dispersión Raman. La dispersión Raman se produce a una longitud de onda similar a la LSPR, lo que hace que la nanopartícula vuelva a irradiar la mayor dispersión Raman de las moléculas cercanas. En resumen, la nanopartícula actúa como una antena para amplificar la señal Raman de las moléculas, mientras que la contribución química se debe a la formación de una transferencia de cargas de adsorción entre las moléculas de dispersión Raman y la superficie metálica. El mecanismo electromagnético hace la mayor contribución al efecto SERS^{33,39}

El campo eléctrico en la unión entre dos nanopartículas plasmónicas es significativamente mayor que en la superficie de una sola partícula y da lugar a mejoras del espectro. Así la dispersión mejorada con plasmón ha permitido la detección de moléculas de particular interés y, en algunas aplicaciones, es más sensible que la fluorescencia³⁷. Sin embargo, controlar las interacciones moleculares para el análisis cuantitativo ha sido más desafiante.

5. Justificación

Reconociendo la inflamación bronquial como el principal componente del asma que a su vez es mediado por citocinas que definen el endotipo inflamatorio de la enfermedad; la identificación, medición y monitorización de dichos biomarcadores inflamatorios se vuelve fundamental para el diagnóstico y control oportuno para la limitación de la remodelación pulmonar derivada de dicha inflamación⁴⁰ Así mismo la

identificación del endotipo inflamatorio apoya la predicción de la respuesta al tratamiento ^{21,41} y así facilitar mejores decisiones de manejo con los tratamientos actualmente disponibles. Mientras las características fenotípicas representan observaciones de las dimensiones clínicas del asma, un endotipo de asma representa a una entidad mórbida mecanísticamente mas coherente.

Algunos métodos para determinar el endotipo y grado de inflamación bronquial implican técnicas invasivas como punción venosa y otros potencialmente riesgosos como aspirado bronquial, así como pruebas de función pulmonar mediante Óxido Nítrico Exhalado y espirometría que requiere habilidades cognitivas y motrices que no siempre están presentes en algunos infantes, personas con discapacidad, adultos mayores etc. Por lo que en las últimas décadas, la innovación de diferentes técnicas de identificación fáciles, no invasivas, que no requieran una laboriosa preparación de muestra, económica, altamente sensibles e incluso con un equipo portátil, como la Espectroscopia Raman Amplificada por Superficie (SERS) mediante nanobarras de oro (NRs Au), han permitido la identificación de biomarcadores en fluidos biológicos según reportes científicos sobre diversos padecimientos pulmonares a excepción de asma infantil en saliva ^{33,42,43} El análisis de los espectros Raman proporcionan información de las propiedades moleculares, modos y cambios de energía, esta identificación se lleva a cabo en los picos que conforma el espectro, donde la banda principal corresponde a Rayleigh y dos bandas secundarias llamadas Raman (Stokes y anti-Stokes), así cada molécula que conforma el fluido o materia a analizar muestra un espectro característico obteniendo una huella digital del mismo que es único para cada molécula ³⁴

Por otro lado, la integración de NRs Au a las muestras de saliva ha demostrado obtener una amplificación de espectro Raman, logrando la identificación de moléculas a concentraciones mínimas, incluso de una sola molécula. Por lo cual el objetivo del presente trabajo ha sido identificar citocinas como potentes biomarcadores para el diagnóstico de asma infantil en saliva, mediante SERS. ^{33,43}

6. Hipotesis

Es posible identificar biomarcadores de asma infantil en fluidos biológicos (saliva) mediante espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS)

7. Objetivo general

Identificar biomarcadores de asma infantil en fluidos biológicos (saliva) mediante espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS)

7.1. Objetivos específicos

- Estandarizar el protocolo de recolección de muestra, traslado, conservación, preparación y análisis mediante Espectroscopia Raman amplificado por superficie.
- Recolectar fluidos biológicos (saliva) y determinar grupo de enfermos y sanos mediante historia clínica, aplicación de pruebas diagnósticas como espirometría y fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO), en colaboración con médico neumólogo pediatra
- Identificar biomarcadores con asociación estadísticamente significativa para asma infantil en fluidos biológicos (saliva) mediante Inmuno ensayo.
- Analizar y procesar datos para la determinación de la exactitud diagnóstica de SERS (sensibilidad y especificidad) para asma infantil.

8. Material y Métodos

El estudio fue dividido en dos fases que a su vez comprendieron subetapas que se mencionan a continuación:

Fase 1: Estandarización, reclutamiento y recolección

- Etapa 0. Ensayos y estandarización de métodos de recolección y análisis

- Etapa 1.1 Estudio poblacional, reclutamiento de escolares y recolección de muestras de saliva
- Etapa 1.2. Determinación de grupo sano y enfermos

Fase 2: Procesamientos y análisis

- Etapa 2.1. Identificación y cuantificación de citocinas en saliva por inmunoensayo
- Etapa 2.2. Determinación de espectro Raman de muestras de saliva y asignación de picos característicos
- Etapa 2.3. Análisis estadístico PCA-LDA

8.1. Fase I: Estandarización, reclutamiento y recolección

Etapa 0. En esta sección se realizaron pruebas preliminares para la selección y estandarización de las técnicas de recolección y análisis de muestras de saliva que incluyo la selección de nanopartículas (NRs Au sintetizadas por el equipo de laboratorio de trabajo vs nanopartículas esféricas fijadas en sustrato de casa comercial Methrom®) mezclas de 10 y 15µl de NRs Au (con y sin eliminación del sobrenadante) y 20 a 25µl de saliva con forme la metodología descrita en la literatura⁴⁴⁻⁴⁶. Así mismo se llevaron a cabo análisis Raman en equipo portátil (PeakSeeker™) y en equipo Raman con focal (XploRA Raman®) de las diferentes mezclas de muestras problema en diferentes sustratos (Aluminio, Sílice, Cuarzo vidrio) con y sin gota seca (10µl) de las diferentes mezclas de saliva con y sin NRs Au, a fin de identificar la mezcla y sustrato que lograra la mejora calidad de espectro amplificado. De dichas pruebas realizadas los mejores espectros fueron los obtenidos de la mezcla de 15 µl de NRs Au con eliminación de sobrenadante y 20µl de saliva integrados en mezcladora vórtex a 2000 rpm por un minuto, de dicha mezcla se obtuvieron 10µl que fue depositado en gota sobre sustrato de aluminio, que se mantuvo en reposo durante 60 minutos a temperatura ambiente 20 a 22°C. Logrando así la evaporación del medio que propicio una adecuada homogeneidad e interacción de las NRs Au con las moléculas contenidas en la muestra. Hecho que facilito la identificación de zonas de mayor interacción para la selección de las zonas de medición Raman.

Fueron seleccionadas las NRs Au brindadas por el equipo de trabajo del laboratorio; por lo que se reprodujo la solución para las subsecuentes mediciones. Dichas NRs Au se sintetizaron bajo el método de Turkevitch⁴⁷ Utilizando bromuro de hexadeciltrimetilamonio (98%) y cloruro de bencildimetilamonio, hidratos (98%), borohidruro sódico (99%) y ácido L-ascórbico los cuales fueron comprados de Sigma-Aldrich. Así mismo se utilizó agua desionizada (18 M) a lo largo de los experimentos, donde para la preparación de semillas se utilizó una solución de CTAB (5 ml, 0,20 M) la cual se mezcló con 5.0 mL de 0.00050M HAuCl₄. Se añadió ml de NaBH₄ 0,010M enfriado con hielo, lo que dio como resultado la formación de una solución amarilla para su agitación vigorosa continua durante 2 min.

Posteriormente la solución se mantuvo a 25° C para un crecimiento de NRs Au con bandas de plasmón menores de 850nm. Se añadió CTAB (5 ml, 0,20 M) a (0,050, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 ml) de solución de AgNO₃ 0,0040 M a 25 ° C. A esta solución, se añadieron 5,0 ml de HAuCl₄ 0,0010 M, y después fueron mezcladas con la solución 70 íL de ácido ascórbico 0,0788M que fue añadido. El ácido ascórbico como un agente reductor suave cambia la solución de crecimiento de amarillo oscuro a incoloro.

Teniendo en cuenta que las cinco soluciones de crecimiento anteriores son idénticas, excepto por su contenido de iones de plata. El paso final fue la adición de 12µl de la solución de semilla a la solución de crecimiento a 27-30°C. El color de la solución Cambió gradualmente en 10-20 min. Para NRs Au más largos, el cambio de color tiene lugar más lentamente. La temperatura del medio de crecimiento se mantuvo constante a 27-30 ° C en todos los experimentos ^{39,47}.

La estimación del factor de mejora con el uso de las NRs Au, se realizó mediante la siguiente expresión:

$$EF = (I_{SERS} \times N_{normal}) / (I_{normal} \times N_{SERS})$$

En esta expresión, I_{SERS} e I_{normal} denotan las intensidades de la misma banda para los espectros SERS y Raman normal; mientras que N_{SERS} y N_{normal} representan el número correspondiente de moléculas que contribuyen a las intensidades normal y SERS (48).

El tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo con B. Mandeville⁴⁹, donde el tamaño de muestra para estudios donde se desconoce la magnitud del efecto/problema, se analizan 15 a 20 repeticiones de medida por cada grupo de clasificación y variable, los cuales deben poseer los atributos que se desean medir en la población objetivo, esta cantidad sería suficiente para obtener una curva de normalidad en el caso de variables continuas o de razón. Así en nuestro estudio las mediciones obtenidas fueron estratificadas en dos grupos para el análisis de diferencia de medias y regresión lineal: grupo 1) escolares sanos y grupo 2) escolares con asma, resultando en un total de 36 a 48 mediciones considerando 20% de pérdidas esperadas a un IC del 95%, y alfa de 0.5.

Se realizó una selección aleatoria de escuelas primarias del centro del estado donde fueron invitados a participar aleatoriamente 180 escolares de 6 a 12 años que asistían a escuelas primarias para la identificación de escolares sanos y enfermos considerando los siguientes criterios:

a) *Criterios de inclusión:*

- Escolares de 6 a 12 años de ambos sexos.
- Escolares que asientan su participación en el estudio.
- Escolares que su(s) padre(s) o tutor firmen carta de consentimiento informado, estén presentes en el momento de la obtención de muestra y sean capaces de responder al cuestionario de historia clínica.

b) Criterios de exclusión:

- Escolares con limitaciones físicas y/o cognitivas para la realización de técnicas para medición de FEV₁, PEF, FeNO.
- Escolares con enfermedades crónicas concomitantes.
- Escolares que en el momento del reclutamiento cursen con signos y/o síntomas de infección aguda
- Escolares que no se presenten en las condiciones de evaluación solicitadas (ayuno, sin cepillado dental de 6 a 8 horas, no haber consumido corticoesteroides orales o inhalados ni antihistamínicos 24 horas previas a las pruebas.
- Escolares que el día de la prueba no cumplan con los requisitos necesarios para realizar prueba de FeNO y espirometría.
- Escolares con discapacidad cognitiva y/o motriz u otra alteración, que lo limite a realizar adecuadamente las pruebas diagnósticas de función pulmonar.

c) Criterios de eliminación

- Muestras de saliva insuficientes.
- Muestras de saliva contaminadas.
- Pacientes que sus resultados de espirometría no cumplan con los criterios de aceptabilidad y reproducibilidad determinados por la Sociedad Americana de Tórax (ATS), para un adecuado diagnóstico.
- Escolares que una vez incluidos en la valuación, decidan no completar las pruebas de función pulmonar y/o historia clínica.

De los 180 escolares invitados a participar, 80 ellos se presentaron a las evaluaciones y solo 62 cumplieron con los criterios mencionados, a quienes se les realizaron las siguientes mediciones:

- Medición de FEV₁: Se obtuvo mediante espirometría forzada, abierta pre y post broncodilatador, su interpretación se apegó a los predichos para población mexicana establecidos por Pérez Padilla¹² conforme los lineamientos de la ATS/ERS(49), mediante equipo calibrado y certificado Easy One.

Obteniendo al menos tres maniobras que cumplieran con los criterios de aceptabilidad y reproducibilidad (inicio abrupto, flujo pico, descenso suave, libre de artefactos, con volumen extrapolado menor a 150mL); considerando un resultado normal si la relación FEV₁/FVC se encuentra por encima del límite inferior de la normalidad y la FVC es normal; en el caso de que la FVC se muestre disminuida, se interpretará como sugestiva de restricción. Considerando obstrucción cuando el cociente FEV₁/FVC se encuentre por debajo del límite inferior de la normalidad; en estos casos se aplicó un β₂ agonista de corta acción (200 ug de salbutamol) en aerosol. Para evaluar la reversibilidad considerando positiva si existe un aumento de 12% y 200 mL en FEV₁ o FVC respecto al basal (12,50,51)

- Medición de fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO): La prueba fue realizada en la totalidad de la muestra (pacientes de 6 a 12 años) que mostraron facilidad para la realización correcta de la técnica mediante el equipo Niox Mino® con personal de enfermería previamente entrenado en el uso e interpretación de este (52).

El equipo portátil NIOX-MINO® (Imagen 1) ha sido validado en niños, analiza la FeNO por medio de una reacción electroquímica, y tiene un control de flujo que se facilita con una retroalimentación visual y acústica. El tiempo de exhalación

oscila entre 6 y 10 segundos y la presión durante la exhalación es de 10-20 cmH₂O, la cual permite un flujo espiratorio entre 45 y 55 mL/seg. Los valores de la FeNO son modificados paralelamente a la exposición alérgica, se elevan en las exacerbaciones del asma y se reducen rápidamente tras la administración de tratamiento esteroideo (53).

Entre los factores inflamatorios que pueden aumentar el FeNO, destacan las infecciones del tracto respiratorio superior. Durante la infección viral se produce un aumento de expresión de la iNOS, demostrado para el virus influenza A, virus sincicial respiratorio y rinovirus, por lo cual las recomendaciones de la ATS/ERS recomiendan posponer su medición hasta haber desaparecido por completo la infección (52,53). La interpretación de la FeNO se estableció conforme los puntos de corte establecidos para población mexicana por Soto M. y el Consenso mexicano en relación con la fracción exhalada de óxido nítrico en asma 2020 (54,55) Conforme ellos se consideró que los valores por encima de 25ppb son sugerentes inflamación eosinofílica.



Imagen 1. Escolares realizando pruebas de FeNO y espirometría. Ahualulco, S.L.P. Mayo 2017

- Historia Clínica: Para la recolección de los datos clínicos sugerentes de atopia manifestada por asma, se aplicó un cuestionario screening validado para estudios epidemiológicos en niños y adultos (56), el cual proporcione información sobre la presentación clínica, frecuencia e intensidad de los síntomas de tos, disnea, opresión de tórax, factores exacerbantes, antecedentes heredofamiliares de atopia, exposición a factores de riesgo para enfermedad pulmonar, otras presentaciones de atopia como dermatitis rinitis así como frecuencia de las exacerbaciones y hospitalizaciones por dicha causa.

En el caso de escolares que refirieron diagnóstico previo de asma, les fue aplicado además un cuestionario de control de asma con el cual es posible identificar el grado de control conforme la frecuencia e intensidad de los

síntomas que se ven reflejados en una puntuación, donde un puntaje mayor a 20 indica adecuado control(57).

- Obtención de muestra de saliva: Por método no estimulado se recolectaron 5 ml de saliva depositada directamente sobre tubo falcón, bajo condiciones de ayuno de 6 a 8 horas sin cepillado dental, ni ningún tipo de enjuague bucal, las muestras fueron rotuladas y colocadas en hielera de transporte con red de frío de 4 a 8°C para la conservación biológica de la saliva y sus componentes. El tiempo de transportación hacia el laboratorio para su preparación, oscilo entre 3 y 4 horas. Una vez en el laboratorio la saliva fue filtrada y separada en alícuotas de 2 ml, siendo conservada en congelación a -20°C por un tiempo máximo de 2 días hasta su preparación con las NRs Au.

Etapa 1.2. Diagnóstico de asma: El investigador de campo que realizo las evaluaciones y recolección de resultados, conforme con ello un expediente por cada escolar, dicho expediente fue proporcionado al médico neumólogo pediatra quien de forma segada y conforme los resultados de las evaluaciones y criterios propuestos por la GINA, ATS y Guía Mexicana de Asma, estableció una primera impresión diagnóstica que posteriormente fue confirmada durante una consulta gratuita, de esta forma se conformaron los dos grupos de estudio.

- **Aspectos éticos.** Este estudio fue sometido al Comité Estatal de Ética en Investigación de los Servicios de Salud de San Luis Potosí, para su autorización de acuerdo a la normatividad nacional vigente regida por la Comisión Nacional de Bioética (58) . (REG: SLP/005-2015).

Conforme lo establecido por la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, sobre los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, en su revisión 2010, así como buenas prácticas en investigación clínica (59), este estudio cumplió con ello y con el código de la ley general de Salud en materia de investigación para la salud, del diario oficial de la federación, específicamente: título segundo, capítulo I de los aspectos éticos

de la investigación en seres humanos. Este estudio no represento *ningún riesgo* para la salud de los participantes por tratarse un estudio de tipo transversal con recopilación de 5 ml de saliva total en solo una ocasión y realización de pruebas de función pulmonar no invasivas.

Así mismo se cumple como lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-012 SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de Investigación para la salud en seres humanos(60).

La participación de los sujetos fue de forma voluntaria. En este caso, los tutores del paciente firmaron una carta de consentimiento informado que especificó claramente los beneficios de la participación en dicho estudio, con libertad de retirarse en el momento que lo desee sin coerción o detrimento de la atención médica, el consentimiento incluye datos de contacto de los investigadores si existiera alguna duda aclaración o comentario, así mismo se solicitó asentimiento al menor para la realización de pruebas pulmonares y obtención de saliva.

Procedimiento para la obtención del consentimiento informado: Para la obtención del consentimiento informado, una vez autorizado el acceso a las escuelas públicas seleccionadas se procedió a realizar una reunión con los padres de familia para la presentación ejecutiva del protocolo de investigación, así como entrega y explicación de la carta de consentimiento informado que fue firmada por los tutores aceptando que sus hijos participaran, y quienes conservaron una copia del consentimiento informado y la responsable de protocolo conservará el original. Historia clínica y datos personales de los pacientes fueron recabados por la responsable de proyecto y manejados sólo por los investigadores, salvaguardando la información en una capeta confidencial y archivo electrónico.

Por nuestra parte; los autores, declaramos *no tener ningún conflicto de interés*, económico, social o de cualquier otro tipo, en relación con este proyecto

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas realizadas a los escolares, estas fueron entregadas a los padres de familia con la interpretación de estas, los escolares que resultaron con alguna anomalía en pruebas de función pulmonar; en primera instancia fueron canalizados al centro de salud más cercano o a su unidad de referencia según derechohabencia para atención médica.

8.2. Fase II. Procesamiento y análisis

Etapa 2.1 inmunoensayo de saliva: Una alícuota de saliva en tubo eppendorf fue centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos, extrayendo 50 μ l del sobrenadante que fue analizada por inmunoensayo en equipo Bio-Plex® MAGPIX™ para la detección y cuantificación de un panel de 37 citocinas Th1/Th2 (IL-26,IL-27p28,IL-28A / IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT / TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK / TNFSF12, APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-19, IL-20,22).

Etapa 2.2. Obtención de espectros Raman de saliva. Posteriormente la segunda alícuota de saliva filtrada, fue centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos, extrayendo 20 μ l del sobrenadante que fue integrado a 15 μ l de NRs Au las cuales fueron previamente lavadas con agua desionizada mediante centrifugación (5000 rpm durante 10min en dos ocasiones) y eliminación del sobrenadante que contenía CTAB. Una vez integrados se determinó un tiempo de homogenado de 2 horas para posteriormente colocar 10 μ l sobre sustrato de aluminio con un tiempo de secado de 1 hora a temperatura ambiente, esto permito una mayor compactación de la matriz de saliva e interacción de los componentes biológicos con las NRs Au.

Las determinaciones de los espectros de las muestras problema se obtuvieron mediante espectroscopio Raman confocal (XploRA Raman®) a una longitud de onda incidente de 780 nm, con potencia láser de 2.5Mw, obteniendo mediciones por triplicado a un tiempo de integración de 60 segundos, el promedio de las mediciones

obtenidas por triplicado fue asignado como el espectro correspondiente para cada paciente en el análisis estadístico, a fin de analizar un corrimiento por cada paciente.

Etapa 2.2.1. Procesamiento de espectros para eliminación ruido.

Durante la obtención de los espectros Raman es posible la presencia de ruidos, que son generados principalmente por cinco fuentes; de la propia muestra ya que por su naturaleza química se produce un efecto de absorción de luz por la molécula que transita a un estado energético de excitación permaneciendo por nanosegundos para realizar un salto a otro estado de menor energía y liberando un fotón de mejor frecuencia en comparación con el fotos incidente, dando como resultado la fluorescencia (Figura 1), también puede ser debido a la instrumentación, ruido computacional, fuentes externas, y ruido de disparo (61,62).

Dentro de las fuentes de ruido mencionadas, el ruido cósmico, shot y la fluorescencia son que se presenta con mayor frecuencia, siendo capaz de enmascarar bandas Raman, así como modificar su intensidad. Para minimizar esta señal deben realizarse un filtrado de los espectros, para lo cual la aplicación de herramientas matemáticas como el ajuste polinomial mediante el método de filtrado llamado algoritmo Vancouver, discrimina adecuadamente la contribución de la fluorescencia y de la señal Raman, por lo que actualmente es uno de los métodos de filtración más utilizados por su simplicidad y efectividad. Aun que persiste la búsqueda de la optimización de métodos que limiten la pérdida, enmascaramiento o creación de bandas Raman durante el proceso de filtración(63,64)

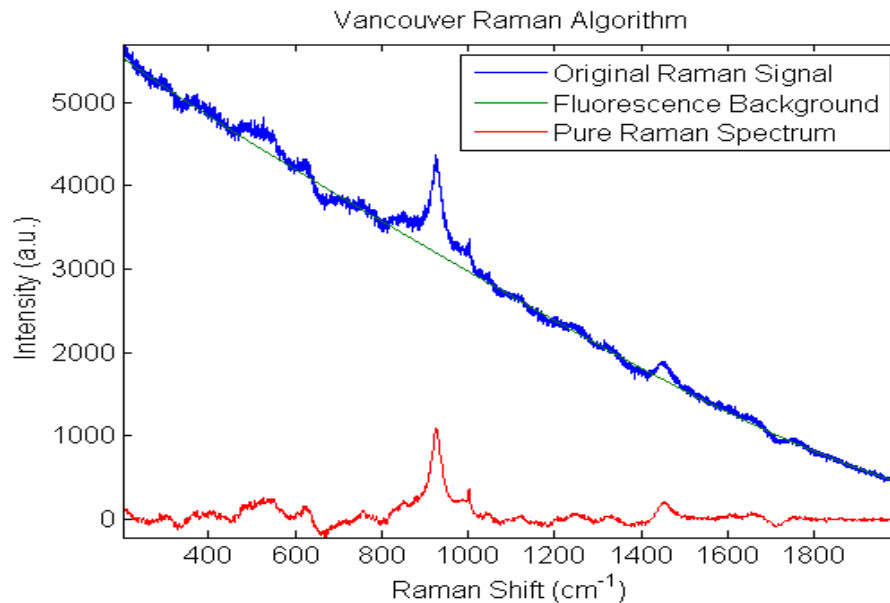


Figura 1. Representación de la aplicación de método de filtración por algoritmo Vancouver sobre espectro de una muestra de saliva para la normalización y eliminación de fluorescencia

Análisis estadístico de variables clínicas. Las variables clínicas fueron elegidas a priori, por lo que no se realizaron correcciones para comparaciones múltiples de acuerdo con la literatura. Las variables clínicas continuas en conjunto con los valores de cuantificación de citocinas fueron analizadas inicialmente representadas en frecuencias, media y desviación estándar, analizando su distribución dentro y entre los grupos de estudio (asma vs sanos), para evaluación de homogeneidad, así mismo se realizó análisis estadístico de regresión lineal, evaluación de normalidad de Shapiro Wilk evaluación de diferencia de medias y correlación global de las variables en el software estadístico R Commander versión 3.3, que se muestran en el apartado de resultados.

Análisis de Componentes Principales: Los espectros Raman asignados a cada grupo de estudio fueron analizados inicialmente por Componentes Principales (PCA) como metodología no supervisada, este análisis expresa un conjunto de variables en

un conjunto de combinaciones lineales de factores no correlacionados entre sí y la variabilidad de los datos, esto permite representar los datos originales en un espacio de dimensión inferior del espacio original y limita al máximo la pérdida de información. La reducción de la dimensionalidad se realiza encontrando nuevas variables, que son funciones lineales de las del conjunto de datos original, que maximizan sucesivamente la varianza y que no están correlacionadas entre sí. Brevemente, PCA transforma las m variables originales, que consisten en los valores de señal para los m valores de número de onda, en un nuevo conjunto de m variables, denominadas componentes principales (PC), cada una de las cuales es una combinación lineal de las m variables originales(65).

Cada espectro original toma valores específicos en el conjunto de PC: tales valores se denominan puntajes. El criterio según el cual se elige el primer PC es que contiene la mayor parte de la varianza de las puntuaciones, y cada PC subsiguiente contiene menos varianza. Un gráfico de puntaje, que informa los valores de puntaje de dos PC diferentes para todas las n muestras, permite visualizar las diferencias y similitudes entre los n muestras, basadas en las características espectrales originales. (66)

Análisis discriminante lineal (LDA). Es conocido como un método de clasificación supervisado que se puede utilizar para clasificar objetos (como espectros medidos a partir de muestras desconocidas) como pertenecientes a clases que se han especificado antes de crear el modelo. En particular, LDA se basa en una transformación lineal de m variables que describen n muestras que pertenecen a diferentes clases, de modo que las muestras de la misma clase están muy juntas pero las muestras de diferentes clases están muy separadas entre sí. Este objetivo se logra mediante un algoritmo de clasificación matemática (basado en un cálculo de distancia de Mahalanobis entre las muestras para cada clase) que maximiza la distancia entre las medias de las clases y minimiza la varianza dentro de cada clase^{66,67}.

Así, se asigna una clase predicha a cada muestra. Una vez que se ha construido el modelo de clasificación, se utiliza más tarde para asignar muestras nuevas y

desconocidas a la clase más probable. Sin embargo, el método LDA no se puede aplicar cuando el número de variables espectrales es mayor que el número de muestras ($m < n$). Este problema se puede resolver calculando PCA para los datos espectrales antes de LDA y aplicando LDA a las puntuaciones de PCA: así es como funciona el algoritmo PCA-LDA⁶⁶⁻⁶⁸.

Para verificar la capacidad de diagnóstico, el análisis discriminante lineal se utilizó en las puntuaciones de PC1 y PC2 (PCA-LDA), que proporcionaron datos de clasificación basada en un criterio optimizado dirigido a una mejor clasificación de los grupos control sanos y los grupos con asma, (diagnóstico línea) eliminando el ruido de los datos y concentrándose en las variables importantes. La validación cruzada de dejar uno fuera (por sus siglas en inglés LOOCV), se realizó para validar el clasificador.

Adicionalmente se utilizó el método supervisado de random forest; este utiliza un conjunto de árboles de clasificación, cada uno de los cuales crece mediante la selección aleatoria de características a partir de una muestra bootstrap en cada rama. La predicción de la clase se basa en el voto mayoritario del conjunto. Durante la construcción del árbol, alrededor de un tercio de las instancias se dejan fuera de la muestra bootstrap. Estos datos se utilizan como muestra de prueba para obtener una estimación insesgada del error de clasificación (OOB). La importancia de la variable se evalúa midiendo el aumento del error OOB cuando se permuta, también se puede aplicar para seleccionar variables y grupos importantes, y para permitir una comprensión más profunda de las relaciones entre variables (69).

9. Resultados.

Fueron evaluados 44 escolares de los cuales 26 fueron identificados como escolares con asma y 18 como escolares sanos, la distribución de edad y sexo no mostro diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, no así el índice de masa corporal (IMC) que fue significativamente mayor en el grupo de asma vs

sanos, donde ambos grupos mostraron estar en el rango de sobrepeso, así mismo la FEV₁ en relación al valor predicho, se mostró significativamente menor en el grupo de enfermos, reflejando obstrucción leve, rango esperado para la identificación del grupo con asma.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio

Variables	Sanos (n=18)	Asma (n=26)
Edad (años)	7.6 ± 2.2	8.1 ± 1.4
Mujeres (%)	62.4%	46.5%
Hombres (%)	37.6%	53.5%
IMC	24.3 ± 6.8*	28 ± 7.9*
FEV ₁ (% predicho)	91.3% ± 4.3*	84% ± 11.1*
FVC (% predicho)	96.1% ± 5.2	90.6% ± 6.3*

*Variables con diferencias estadísticamente significativas sano vs enfermo

Así mismo los resultados de la fase I, permitieron identificar que la edad de 6 a 8 años en el sexo masculino fue el grupo de escolares que presentó con más frecuencia patrón obstructivo compatible con asma representado por un 46%, dentro de los cuales el grado de inflamación leve tuvo una frecuencia del 65% seguido del moderado y moderado-grave con 18 y 12% respectivamente y solo un 6% con asma grave. Se identificaron diferencias significativas en los grupos; sano y enfermo ($p= 0.001$) en relación con obstrucción bronquial post broncodilatador en FEV₁. Estos resultados muestran una frecuencia de asma mayor a la esperada según los reportes en la literatura, sin embargo, dada la heterogeneidad del padecimiento consideramos que la región, así como los usos y costumbres de la región rural donde fueron colectados los pacientes; como el cocinar con leña podría ser un factor que contribuye a la alta

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

prevalencia, sin embargo, se requieren estudios específicos para comprobar esta hipótesis.

GRÁFICO No. 2. Grado de obstrucción bronquial por espirometría forzada (n=19)

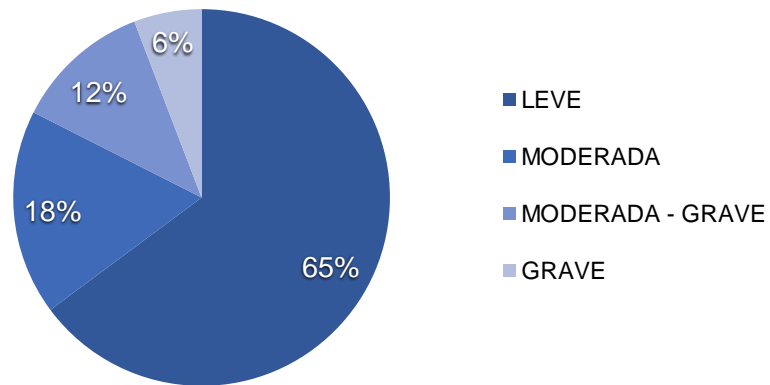
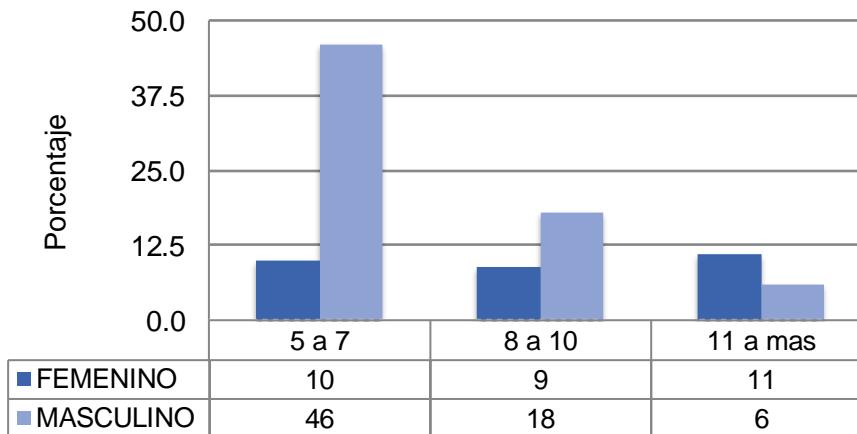


Gráfico No. 1 Frecuencia de escolares con patrón obstructivo sugerente de asma, según grupos de edad y sexo (n=19)



Para la *FASE II* El análisis de correlación y regresión lineal reveló diferencias entre los grupos sano y enfermo en relación con citocinas y obstrucción bronquial explicado principalmente por; Inter Leucina 8 (IL-8), $p= 0.03$, con una media de 274pg/ml en sanos y 458 pg/ml en enfermos, con una correlación de 0.79 para FEV1 y 0.72 para FeNO. Inter Leucina-10 (IL-10) obtuvo una significancia de $p=0.02$ con una media de 24.5pg/ml en sanos y 68.7 pg/ml en enfermos, con una correlación de 0.74 para FEV1 y 0.73 para FeNO y finalmente CD163 obtuvo una significancia de $p=0.03$ con una media de 626 pg/ml en sanos y 854pg/ml en enfermos, con una correlación de 0.0.81 para FEV1 y 0.72 para FeNO. A partir de estos resultados se logra dilucidar que el fenotipo eosinofílico con componente neutrofílico está presente en esta población concordado con lo reportado en la literatura científica, así mismo coexisten mecanismo compensador de IL-10 y CD163 como antiinflamatorias (1,2)

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal integrando las variables de estudio al siguiente modelo: ($Im = FEV1 \sim sCD1630 + IL-8 + IL-10$, dato = dato) obteniendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.03$, $r^2 = 0.61$). Cabe señalar que los niveles de citoquinas en relación con los síntomas clínicos típicos como tos nocturna, disnea de ejercicio y sibilancias, no mostraron diferencias significativas; sin embargo, para los antecedentes de dermatitis, la IL-8 fue significativa ($p = 0.04$).

Caracterización de NRs Au: Fue obtenido mediante su espectro de absorción a 785 nm, determinado por espectroscopia ultravioleta-visible (UV/vis), con un tamaño aproximado de 60x15nm por microscopía óptica de barrido (SEM), y potencial Z de 42mW, así mismo la adición de NRs Au en saliva mostraron amplificaciones en el orden de $\sim 10^4$ vs la amplificación del espectro sin NRs Au (figura 2, derecha).

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

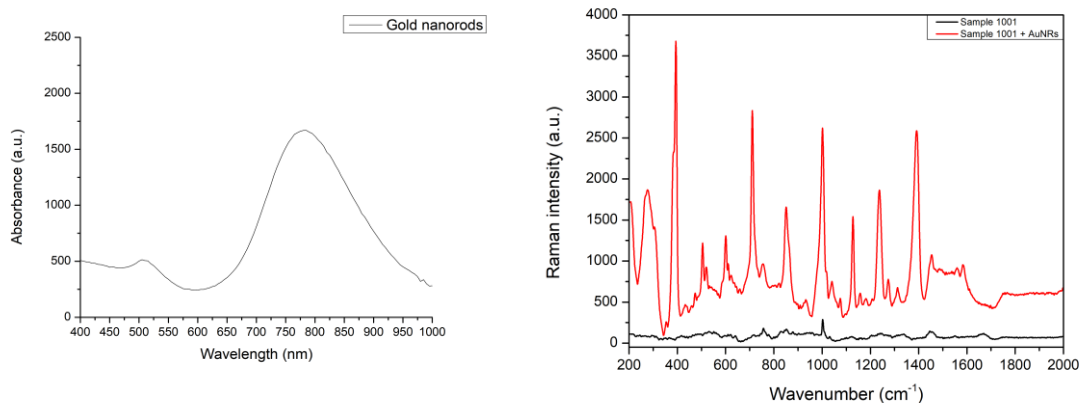


Figura 2. Espectro UV- Visible de NRs Au (izquierda), y espectro de amplificación de saliva con y sin NRs Au (derecha)

Sample Details

Sample Name: nanoAu 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Paulina.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 451

Dispersant RI: 1,330

Date and Time: miércoles, 23 de mayo de 201...

Viscosity (cP): 0,8870

Dispersant Dielectric Constant: 78,5

System

Temperature (°C): 25,0

Zeta Runs: 12

Count Rate (kcps): 13,3

Measurement Position (mm): 2,00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 7

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 42,0	Peak 1: 41,6	96,7	3,91
Zeta Deviation (mV): 4,79	Peak 2: 56,2	3,2	2,77
Conductivity (mS/cm): 0,0906	Peak 3: 86,7	0,1	1,35e-6

Result quality See result quality report

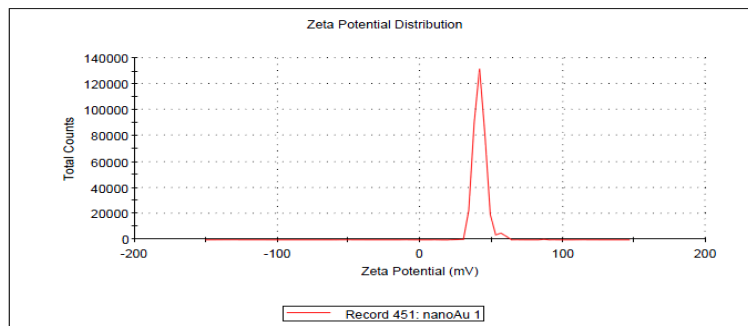


Figura 3. Potencial Z de NRs Au.

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

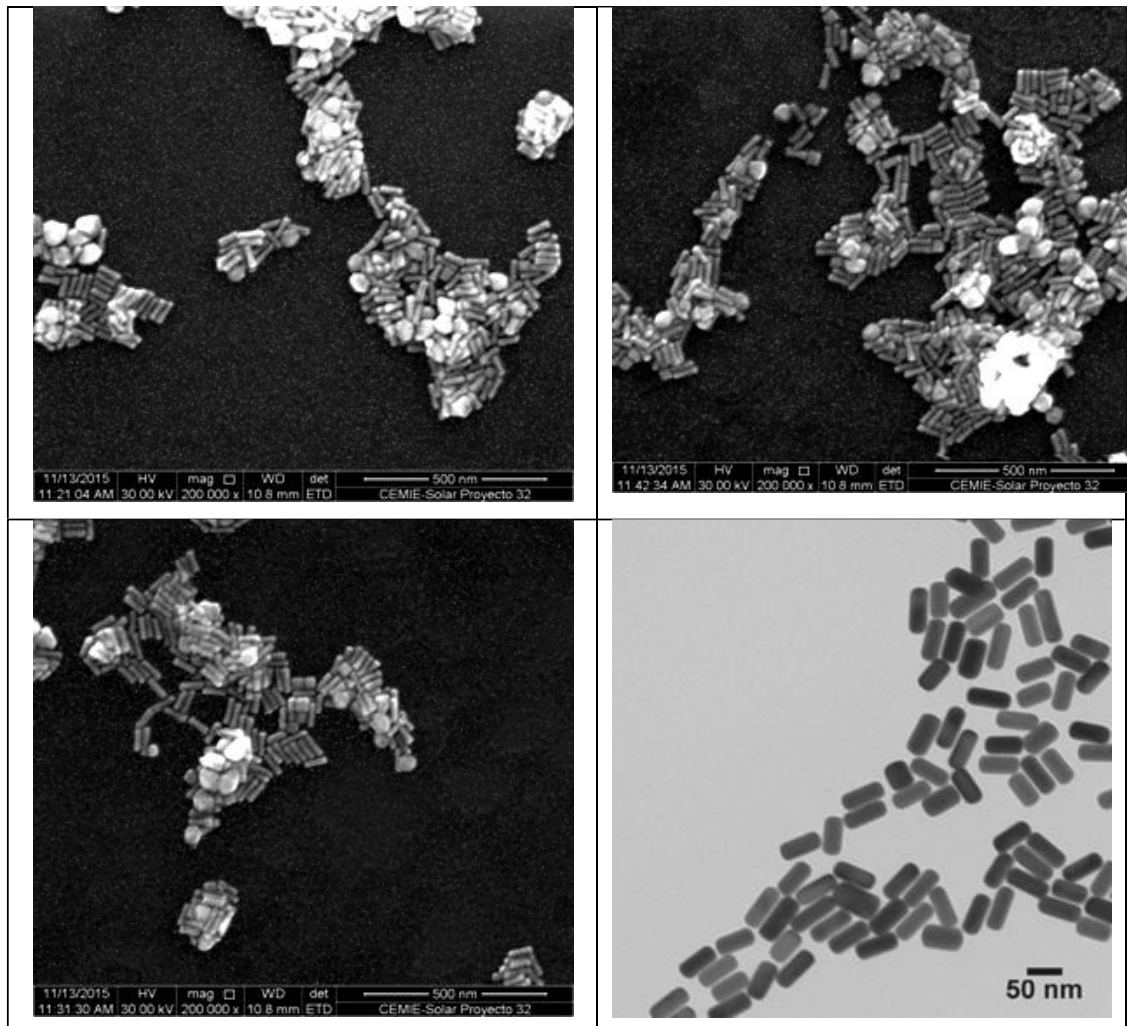


Figura 4. Micrografía por microscopía electrónica de barrido (SEM) de NRs Au. Tamaño aproximado de 60x15nm

Con relación a los espectros obtenidos, sugerimos que las mediciones de saliva integradas con NRs Au, mostraron amplificaciones en la región de 760 a 1750 cm^{-1} . El aumento de la intensidad Raman en el grupo con asma predominó principalmente en once bandas: 760, 843,901, 1000, 1231, 1290, 1326, 1420, 1456, 1591, 1750 y

región $1050-1127\text{ cm}^{-1}$. Las diferencias de intensidad Raman entre grupos se analizaron mediante la prueba t de Student ($p \leq 0.05$), los cambios mayores se dieron en seis bandas: 843, 901, 1290, 1420, 1456, 1591 y 1750 cm^{-1} que corresponden a componentes biológicos, como ácidos nucleicos, amidas, lípidos, proteínas y triglicéridos principalmente(70–76) Sin embargo, en la región $1050-1127$ se observó una disminución significativa de la intensidad Raman del grupo asmático en comparación con el grupo sano, correspondiente a la amida III, U(CeOeC), Citocromo C. Posterior a la normalización de los datos, los resultados del análisis de componentes principales mostrarón una explicación del 76% de la varianza acumulada en los cinco primeros componentes.

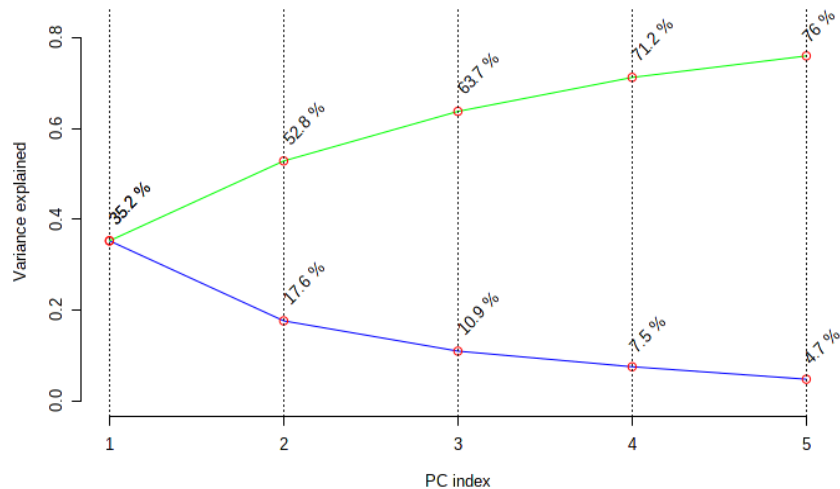


Figura 5. Representación en campana de Gauss sobre distribución de datos antes y despues de la normalización de datos centrados a la media (superior), varianza acumulada explicada en línea verde y variación por cada PC en línea azul (figura inferior)

La respresentación espacial del conjunto de variables contenidas en los tres primeros componentes (Figura 5) nos permitieron identificar un partón de distribución de las variables contenidas en los PC 1, 2 y 3 donde es posible observar una posible discriminación de grupos sanos y enfermos (Figura 15), donde al aplicar el análisis discriminante lineal obtuvimos una disminución de la explicación de la varianza pero

mejor discriminación entre los grupos al maximizar la varianza entre ellos (Figura 16), para el PC1, las bandas de mayor contribución al modelo fueron las comprendidas entre 1074 y 1418 cm^{-1} , obteniendo una sensibilidad del 85% bajo este modelo de clasificación.

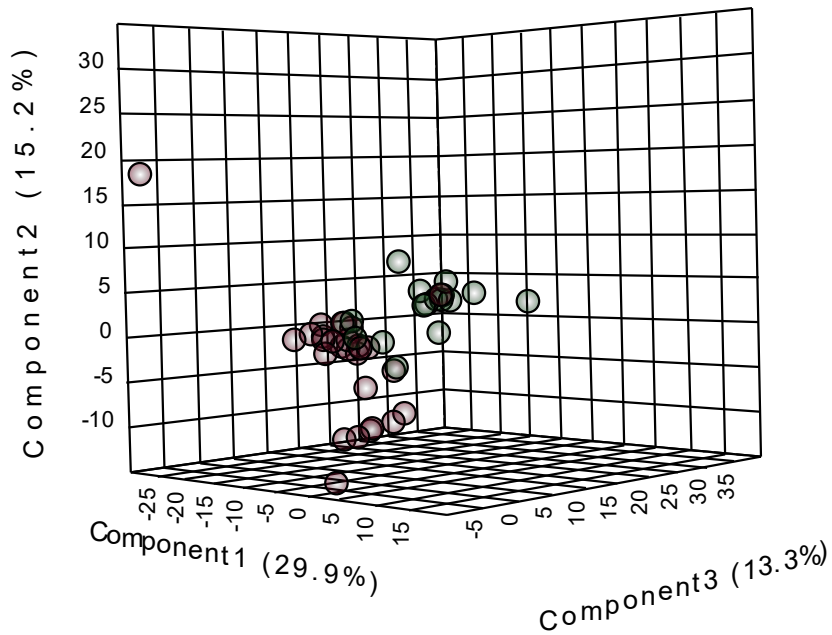


Figura 6. Representación 3D en dos ángulos de las variables contenidas en PC1, 2 y 3

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

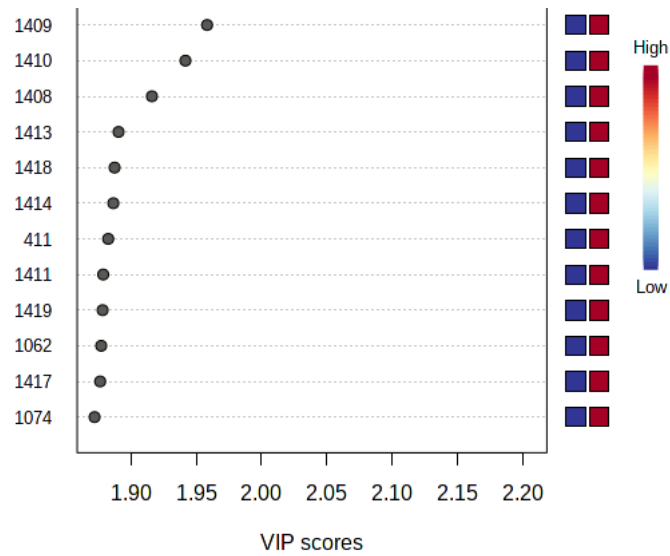
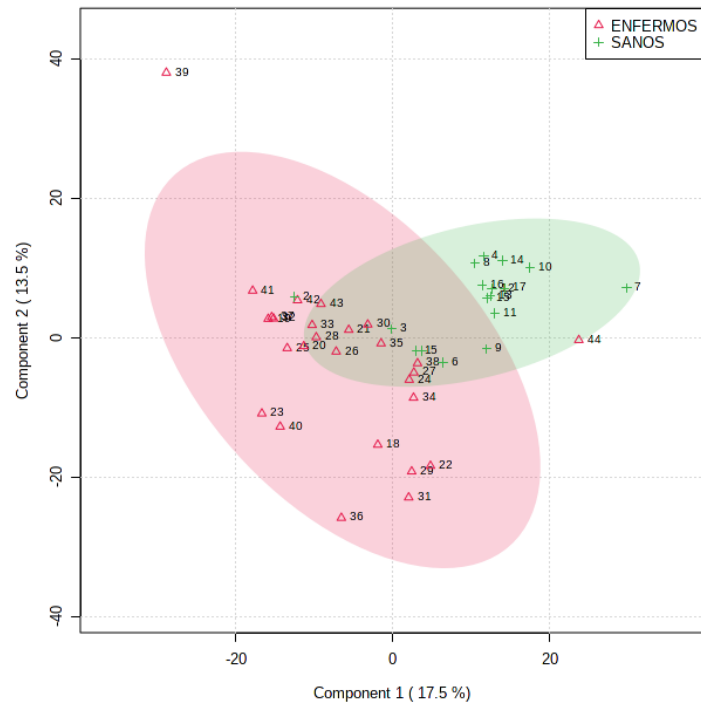


Figura 7. Representación en 2D del análisis discriminante lineal (arriba) y bandas de mayor contribución del componente principal 1(abajo)

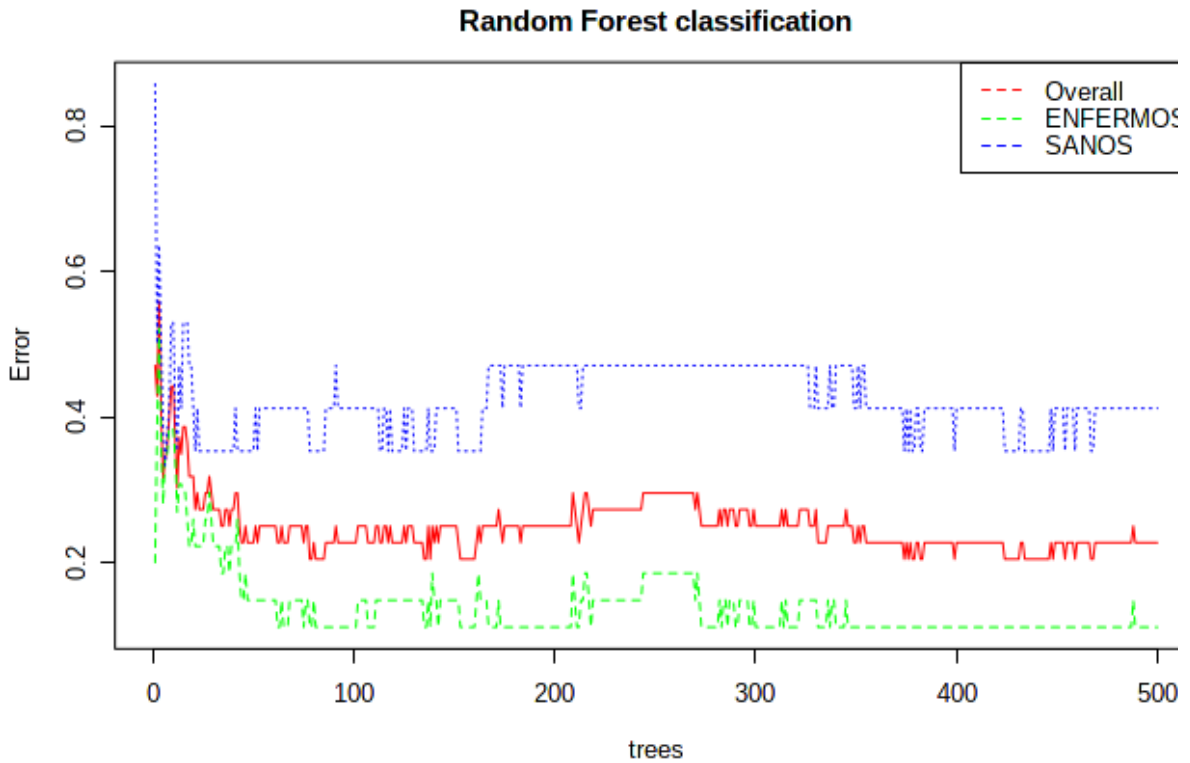
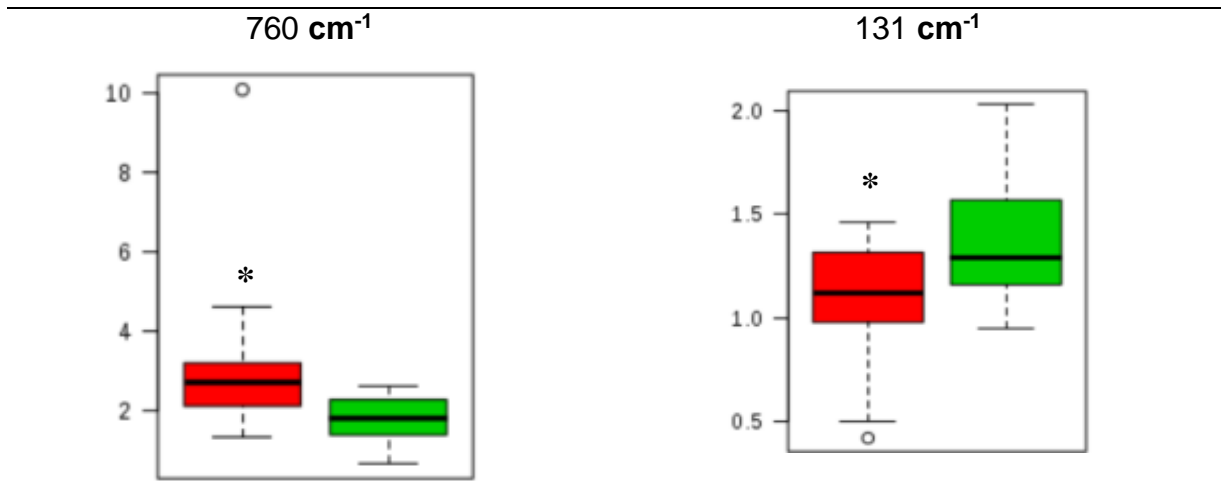


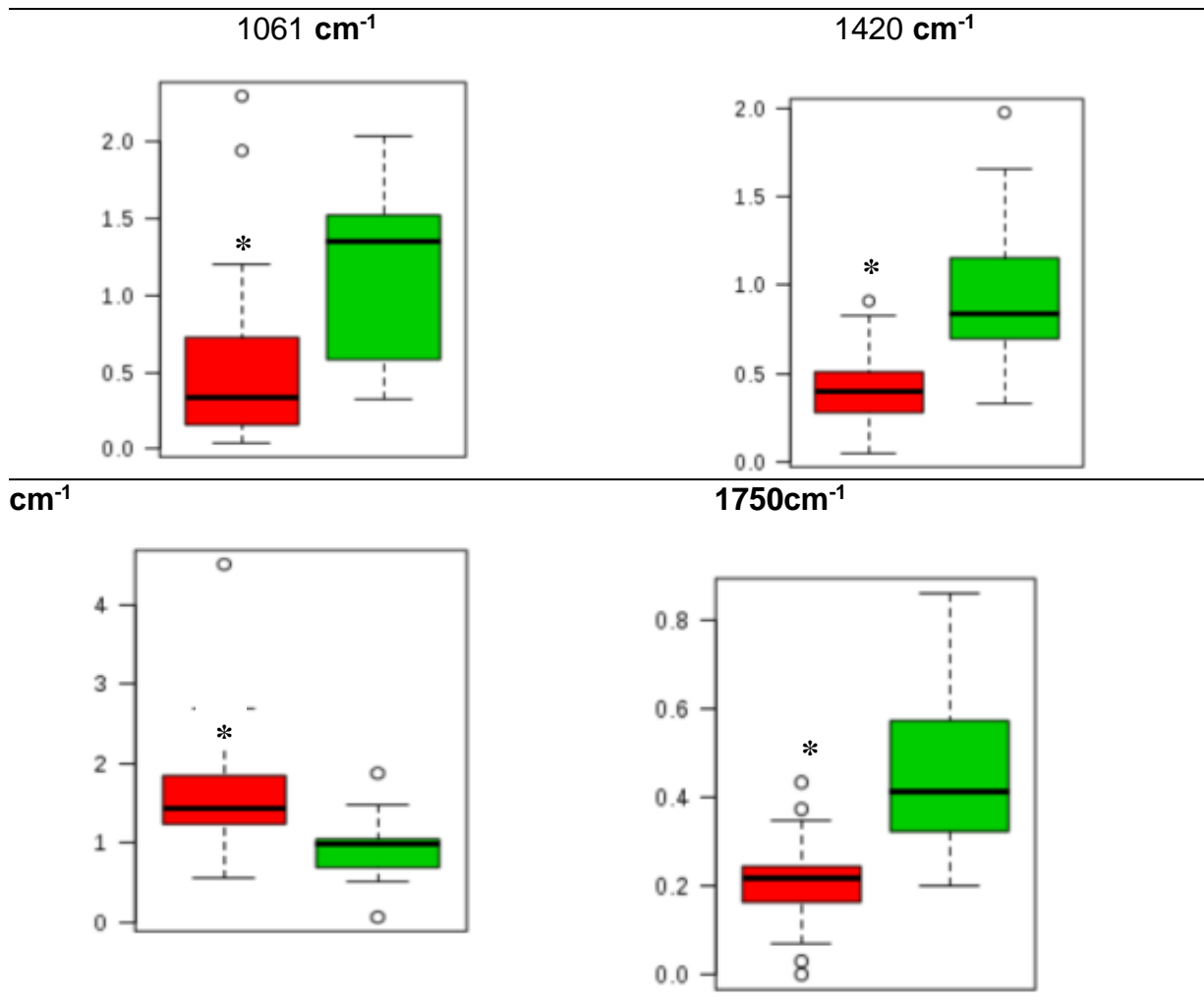
Figura 8. Representación del análisis de clasificación por método de Random Forest, Con un error de clasificación del (OOD) 20%

Tabla 4. Comparación de medias de intensidad de bandas

Comparación de medias (Intensidad a.u.) Comparación de medias (Intensidad a.u.)



IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS



10. Discusión

Este estudio revela una frecuencia esperada de asma en línea con lo reportado en la literatura para México⁷⁷⁻⁷⁹. Tanto por el aumento de FeNO en el grupo con asma como por la historia clínica sugestiva, podemos dilucidar la existencia de un endotipo eosinofílico reconociendo que actualmente la inflamación Th2 de tipo eosinofílico ocurre con una frecuencia del 70-80% en la población con asma^{80,81}.

Además, este trabajo muestra la relevancia y viabilidad de la medición de citocinas proinflamatorias en saliva, como método práctico y no invasivo. Asimismo, Williamson et al, demostraron en un estudio con 50 voluntarios sanos, que no existen diferencias significativas en los niveles de citoquinas detectados en saliva en relación con los detectados en suero utilizando la tecnología Bio-Plex (78,81). Sin embargo, el alto costo de este último es una limitación para este método, por lo que la detección con SERS podría mitigar esta desventaja.

Los niveles de IL-8, IL-10 y sCD163 podrían usarse como potenciales biomarcadores de inflamación bronquial en asma, encontrando patrones de expresión celular o endotipo sugestivos de inflamación subclínica en esta población, ya que no se encontró asociación estadística significativa con síntomas típicos de la condición, más bien una fuerte asociación entre el grado de obstrucción y niveles elevados de FeNO. La elevación de IL-8 se ha relacionado con el proceso de remodelado bronquial, ya que se ha demostrado que está presente en el medio inflamatorio como uno de los factores de crecimiento producidos por la activación y transformación del fibroblasto perivascular en miofibroblasto y miocito capaz de produciendo colágeno subepitelial y engrosamiento de la lámina reticular, generando diferentes cambios histopatológicos que se han relacionado con una mayor severidad de la enfermedad (23,82-86)

Por otro lado, Lamotte V. et al, demostraron mediante muestras de esputo inducido que la concentración de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) y Th1 (IFN gamma, IL-2 e IL-12p70) es mayor en asmáticos atópicos que en asmáticos sanos y no atópicos ($p = 0,0001$).

Asimismo, la IL-8 fue mayor en los niños con asma que en los controles ($p = 0,0001$) y la IL-10 fue mayor en los controles que en los niños con asma ($p = 0,03$)(87)

Otro estudio sobre la identificación de mediadores proinflamatorios y correlación de manifestaciones clínicas de asma en saliva reportó que existen fuertes correlaciones entre el uso de corticoides inhalados y la IL-8 en la población pediátrica en general [29]. En el presente trabajo, los hallazgos en la detección de IL-8 siguieren estar en línea con los resultados obtenidos por Kamińska A. et al, quienes caracterizaron el espectro Raman para IL-8 a 1326 cm^{-1} en una matriz de suero usando SERS (84). En este estudio se sugiere la identificación del aumento de intensidad en los picos característicos de esta citocina en los espectros del grupo con asma, a diferencia del grupo sano, sin embargo, dado que coexisten una gran cantidad de moléculas en las muestras recolectadas, en modos de vibración cercano, es posible el solapamiento de otras moléculas relevantes en la patología.

Ladiwala U. et al, caracterizaron una serie de citocinas en células madre neurales, incluida la IL-10, identificando picos característicos en la región de $775\text{--}875\text{ cm}^{-1}$ (88), donde se han informado lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y que se muestran con mayor intensidad y asociación al grupo asma lo que permite la posibilidad de sugerir la detección de esta citocina antiinflamatoria que a su vez está íntimamente ligada a la expresión de sCD163 (71)

sCD163 es particularmente interesante en el presente estudio, ya que se ha demostrado que el papel de esta proteína es un mediador importante para el Desarrollo y mantenimiento de la inflamación bronquial, así como remodelación de la vía aérea en el paciente con asma. Asimismo, se ha detectado la correlación de esta proteína con la elevación de IL-6, IL-8 e IL-10, y se ha asociado con resistencia a la insulina, mala respuesta a los corticoides en asma, enfermedad cardiovascular y obesidad (89–91) Cabe señalar que la población estudiada presenta una prevalencia de sobrepeso superior al 30% y un aumento de los índices cintura-cadera (91), hecho que en la

actualidad también constituye uno de los principales problemas de salud en América Latina, principalmente en México, mostrando alta correlación con la presencia de asma y su mal control (79). Por otro lado, Kowal K. et al, ha estudiado el efecto de los corticoides inhalados sobre la concentración de sCD163 en el esputo inducido del asma alérgica. Informaron que un cambio en la concentración de sCD163 en el esputo se correlacionó inversamente con cambios en la eosinofilia en el esputo o la concentración de FeNO y concluyeron que la terapia con corticosteroides inhalados conduce a una regulación positiva local de la expresión de sCD163, que a su vez puede participar en los efectos antiinflamatorios de la terapia con corticosteroides ⁴¹.

CD163 es una proteína que se expresa en la superficie de los macrófagos promoviendo acciones antiinflamatorias que conducen al aumento de la síntesis de IL-10 y regulan la expresión in vitro de CD163, que también está regulada por IL-4, IL-6, IL-13, IL-10 y TNF- α , y promueven el desprendimiento de CD163 a macrófagos libres M2 en su forma soluble (sCD163) [10,11]. Su expresión está condicionada por procesos inflamatorios, elevación de lípidos y obesidad. En el presente estudio observamos que el aumento en las bandas de intensidad: 760, 1231, 1591, 1456, 1750 cm^{-1} corresponden a lípidos, ésteres de colesterol, triacilglicerol, proteínas y aminoácidos principalmente (71,72,75) Varios estudios muestran la relación de los lípidos con el asma, uno de los más importantes es un metaanálisis que incluyó veinte estudios con un total de 32.604 pacientes (3458 en el grupo asmático y 2914 en el grupo sano), encontrando diferencias significativas en la media de Baja Lipoproteínas de densidad (LDL) y colesterol sérico total, este hallazgo podría respaldar los resultados obtenidos en este estudio sobre el aumento del índice de masa corporal y la presencia significativa de biomoléculas correspondientes a lípidos en el espectro Raman del grupo de asma [50].

Esta observación fue evidente en el grupo de asma donde algunas biomoléculas específicas fueron diferentes en comparación con el grupo sano, un hallazgo que debe explorarse con más detalle en estudios futuros para establecer biomarcadores de diagnóstico de asma en niños.

Por otro lado, los decrementos de la intensidad Raman en la región 1050-1127 cm^{-1} en el grupo con asma, pero ningún grupo sano corresponden a las moléculas: citocromo C, amida III, cadena hidrocarbonada de lípidos y triglicéridos podría sugerir una auto modulación del proceso inflamatorio. El papel del citocromo C no ha sido claramente descrito en esta enfermedad, sin embargo, ya que es una proteína que participa en procesos biológicos muy importantes como el transportador de electrones mitocondrial en la cadena respiratoria y activador del complejo proteico denominado "apoptosoma", desencadenando las últimas fases de la enfermedad. Apoptosis derivada del estrés oxidativo entre otros procesos. En el asma, el estrés oxidativo puede estar condicionado por el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, que superan los mecanismos de desequilibrio antioxidante en el ambiente de las vías respiratorias del asmático, proceso que a su vez promueve la generación de radicales libres, alterando a nivel celular, bioquímico, tejido la fisiología del tracto respiratorio, además de modificar la homeostasis orgánica incluso existen evidencias sobre el papel del citocromo C en la enfermedad del asma, hoy en día, no hay reportes que muestren la identificación del citocromo C por SERS en grupos asmáticos, sin embargo esta molécula juega un papel importante. importante papel fundamental de esta enfermedad. En el presente estudio, el grupo con asma, pero no en el grupo sano, presentó una disminución en la región correspondiente al citocromo C, este podría estar involucrado en los procesos de automodulación de la inflamación, sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario generar más evidencia relacionada.

Para respaldar estos hallazgos, recientemente se ha publicado un estudio en el que se evalúan en suero y mediante la técnica de Raman, los componentes biológicos en un grupo asmático de entre 29 y 47 años (92), reportando un patrón similar de intensidad Raman que aquellos incluidos en la saliva, esta observación puede reforzar nuestros hallazgos, sugiriendo que el fluido salival podría representar una matriz confiable, que refleja los componentes que contiene en sueros con la ventaja de que este esfuerzo representa un método no invasivo.

Para verificar este hecho, es necesaria la caracterización SERS, de las citocinas que participan en el proceso inflamatorio y antiinflamatorio del asma, y los roles específicos de otras proteínas y moléculas como sCD163, citocromo C, aminoácidos y lípidos, considerando estos resultados. como una primera aproximación a la comprensión de los mecanismos de inflamación mediante el uso de SERS. Finalmente, en los últimos años se han realizado varios estudios para la detección no invasiva de varios biomarcadores, en su mayoría relacionados con el cáncer, de los cuales se ha reportado una sensibilidad y especificidad de detección superior al 80% utilizando el método SERS ⁹⁴, similar al obtenido en este estudio, mostrando el amplio abanico de posibilidades de la aplicación de SERS en la detección de biomarcadores, entre ellos el asma.

11. Conclusiones

La población de estudio mostró un endotipo inflamatorio eosinofílico, explicado por el aumento de FeNO, así como un probable componente neutrofílico por la expresión de IL-8, coexistiendo con un mecanismo compensatorio de IL-10 y CD163 como citocinas antiinflamatorias, lo que sugiere también un proceso de remodelación bronquial. Este proceso podría estar representado por el aumento en la variación de intensidades del espectro Raman en los grupos asmáticos vs sanos, particularmente en la región de 1050-1127 cm^{-1} .

El aumento de sCD163 en asma vs grupos sanos, sumado a las características epidemiológicas y a la diferencia significativa de intensidades Raman entre grupos en las bandas 1231, 1290, 1456 y 1750 cm^{-1} , donde se detectan lípidos como colesterol y triglicéridos, podría determinar un endotipo de características inflamatorias para esta población que a su vez podría estar influenciado por el estado proinflamatorio que representa el sobrepeso y la obesidad. Lo anterior forma parte de las perspectivas de estudio, así como la identificación del espectro Raman que caracteriza a sCD163.

En conclusión, la metodología SERS ofrece la ventaja de lograr la identificación del endotipo de inflamación bronquial de forma no invasiva y sencilla, aun cuando el paciente no presente signos o síntomas clínicos evidentes, los cuales son cruciales para el diagnóstico y control. Esta metodología podría facilitar el seguimiento del control de la enfermedad, así como la dirección del tratamiento farmacológico, ya que debido a la heterogeneidad de la enfermedad existe una amplia gama de fármacos dirigidos a endotipos específicos, como corticoides, antileucotrienos, inmunomoduladores, etc., hecho que también conduce a una prevención oportuna de la remodelación bronquial y la limitación fija del flujo aéreo.

12. Limitaciones y Perspectivas:

Una de las limitaciones a resaltar en este estudio es en relación a la identificación de bandas Raman, ya que aun cuando fueron obtenidos espectros amplificados, estos no reflejan moléculas de interés específico ya que las NRs Au no fueron funcionalizadas para este fin, por lo que la representación del espectro mostro un patrón molecular de todo el contenido biológico de la muestra en donde también es posible la sobre posición de bandas espectrales de otros componentes no siempre debido a la concentración de estos si no a su modo vibratorio.

Así mismo para una validación completa del método diagnóstico es necesario incrementar el tamaño de la muestra evaluada para la identificación de estadios de la gravedad y fenotipificación del padecimiento, a fin de identificar cambios en los patrones moleculares entre el mismo grupo, ya que en esta muestra piloto no es posible identificar dicha variabilidad que podría ser un importante para la clasificación.

La aplicación de análisis estadísticos más robustos con ajustes de corrección de comparaciones múltiples que a su vez limiten la pérdida de datos durante la creación del modelo, así como aplicación de técnicas mejoradas de filtrado de ruido y normalización durante el procesamiento de los espectros, son algunos de los aspectos estadísticos de mayor relevancia a considerar como perspectivas de aplicación en

estudios posteriores, ya que en el presente fueron aplicados análisis estadísticos de primera y segunda línea como un acercamiento que pudieran dilucidar una validación diagnóstica futura.

En relación con el procesamiento de las muestras, como primer enfrentamiento es este proyecto fue la gran variabilidad de métodos reportados en la literatura para la preparación de la muestra, así como del uso de sustratos, por lo que la construcción de una adecuada plataforma de funcionalización parece ser una dirección común en el desarrollo de proyectos de la ciencia de materiales presentaron una limitante inicial que se convirtió en una fortaleza por la gran cantidad de información en el campo de la ciencia de materiales aplicada a la salud, que exigió la participación de un grupo multi y transdisciplinario para el desarrollo de este proyecto, pero que aún es necesario reforzar y consolidar.

Así una perspectiva a futuro de este proyecto es el desarrollo transdisciplinario de biosensores encaminados a la medicina personalizada, particularmente en el ámbito del asma donde las vías de señalización de la inflamación bronquial difieren entre pacientes, requiriendo un tratamiento farmacológico específico.

13. Bibliografía.

1. Informe principal de GINA 2022 - Iniciativa global para el asma - GINA. Accessed July 2, 2022. <https://ginasthma.org/gina-reports/>
2. Larenas-Linnemann D, Salas-Hernández J, del Río-Navarro BE, et al. MIA 2021, comprehensive asthma management: Guidelines for Mexico. *Rev Alerg Mex.* 2021;68(5):S1-S122. doi:10.29262/RAM.V68I5.880
3. Enfermedades Respiratorias Crónicas | NCD Alliance. Accessed July 2, 2022. <https://ncdalliance.org/es/acerca-de-las-ent/ent/enfermedades-respiratorias-cr%C3%B3nicas>
4. FENOTIPOS EPITELIALES EN EL ASMA.pdf - OneDrive.
5. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 2012;18(5):716-725. doi:10.1038/nm.2678
6. Pazmiño FA, Navarrete-Jiménez ML. *Immunologic Mechanisms Involved in the Pathology of Allergic Asthma.* Vol 62.; 2014.

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

7. Pickler R, Munro C, Grap MJ, Elswick RK, Williamson S. Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. *Nurs Res Pract.* 2012;2012:1-4. doi:10.1155/2012/246178
8. Rodr REZ, Fern G, Morales RDE. Niveles normales de interleucinas 6 y 8 en suero y orina de niños sanos asintomáticos. *Boletín De La Sociedad De Pediatría De Asturias, Cantabria, Castilla Y León.* Published online 2005:177-184.
9. Wexler PJ, Mitchell P, Matsui EC, et al. Salivary Inflammatory Mediator Profiling and Correlation to Clinical Disease Markers in Asthma. *PLoS One.* 2014;9(1):e84449. doi:10.1371/journal.pone.0084449
10. Pazmiño1 FA, Navarrete-Jiménez2 ML, Resumen J. Mecanismos inmunológicos implicados en la patología del asma alérgica Immunologic mechanisms involved in the pathology of allergic asthma. Published online 2013. Accessed March 15, 2018. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v62n2/v62n2a13.pdf>
11. Rodríguez MC, Gómez F, Sánchez-Yagüe J. LAS CITOCINAS Y SU PAPEL EN EL ASMA BRONQUIAL Y LA RINITIS. 1999;11(2). Accessed March 15, 2018. <https://www.neumosur.net/files/NS1999.11.2.A05.pdf>
12. Benítez-Pérez RE, Torre-Bouscoulet L, Villca-Alá N, et al. Spirometry: Recommendations and procedure. *Neumología y Cirugía de Torax(Mexico).* 2019;78:S97-S112. doi:10.35366/NTS192C
13. (PDF) Evaluación funcional del niño con asma. Inflamometría. Accessed July 5, 2022. https://www.researchgate.net/publication/325089500_Evaluacion_funcional_del_nino_con_asma_Inflamometria
14. Vista de Actualización del asma | Revista Medica Sinergia. Accessed July 5, 2022. <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/717/1752>
15. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(17):2352-2363. doi:10.1089/ARS.2012.4834
16. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163 + Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1-31. doi:10.3390/IJMS21155497
17. Nielsen MC, Andersen MN, Rittig N, et al. The macrophage-related biomarkers sCD163 and sCD206 are released by different shedding mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2019;106(5):1129-1138. doi:10.1002/JLB.3A1218-500R
18. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2012;18(17):2352-2363. doi:10.1089/ars.2012.4834
19. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2012;18(17):2352-2363. doi:10.1089/ars.2012.4834
20. Periyalil HA, Wood LG, Scott HA, Jensen ME, Gibson PG. Macrophage activation, age and sex effects of immunometabolism in obese asthma. *European Respiratory Journal.* 2015;45(2):388-395. doi:10.1183/09031936.00080514
21. Bernatowicz PL, Golec P, Bielecki P, Kowal K. Systemic corticosteroid therapy augments ex vivo release of sCD163 by peripheral blood monocytes of asthmatic patients. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii.* 2020;37(1):61-65. doi:10.5114/ADA.2020.93384
22. Alvarado-Vazquez PA, Bernal L, Paige CA, et al. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology.* 2017;222(8-9):900-912. doi:10.1016/J.IMBIO.2017.05.011
23. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 2005;202(11):1459-1463. doi:10.1084/JEM.20052211
24. Pablo Juárez R, Domínguez Machado S, Romero MA. Fisiología y significación clínica de los complejos proteicos salivales. *Revista Estomatológica Herediana.* 2016;26(3):179-183. doi:10.20453/REH.V26I3.2964
25. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva - A review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 2002;13(2):197-212. doi:10.1177/154411130201300209
26. Zalewska A, Waszkiewicz N, López-Pintor RM. The Use of Saliva in the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Dis Markers.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/9149503
27. Cui Y, Yang M, Zhu J, et al. Developments in diagnostic applications of saliva in human organ diseases. *Med Nov Technol Devices.* 2022;13:100115. doi:10.1016/J.MEDNTD.2022.100115

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

28. Downes A, Elfick A. Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors (Basel)*. 2010;10(3):1871. doi:10.3390/S100301871
29. Lin L, Bi X, Gu Y, Wang F, Ye J. Surface-enhanced Raman scattering nanotags for bioimaging. *J Appl Phys*. 2021;129(19):191101. doi:10.1063/5.0047578
30. Brauchle E, Schenke-Layland K. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol J*. 2013;8(3):288-297. doi:10.1002/BIOT.201200163
31. Shipp DW, Sinjab F, Notingher I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Advances in Optics and Photonics, Vol 9, Issue 2, pp 315-428*. 2017;9(2):315-428. doi:10.1364/AOP.9.000315
32. Cordero E, Latka I, Matthäus C, Schie IW, Popp J. [i]In-vivo[/i] Raman spectroscopy: from basics to applications. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.071210>. 2018;23(7):071210. doi:10.1117/1.JBO.23.7.071210
33. Das RS, Agrawal YK. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. *Vib Spectrosc*. 2011;57(2):163-176. doi:10.1016/j.vibspec.2011.08.003
34. Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK. Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Research Letters* 2019 14:1. 2019;14(1):1-34. doi:10.1186/S11671-019-3039-2
35. Ember KJI, Hoeve MA, McAughtrie SL, et al. *Raman Spectroscopy and Regenerative Medicine: A Review*. Vol 2. Springer US; 2017. doi:10.1038/s41536-017-0014-3
36. Advantages and disadvantages of Raman Spectroscopy - Romanian Database of Raman Spectroscopy. Accessed August 9, 2022. <http://www.rdrs.ro/blog/articles/advantages-disadvantages-raman-spectroscopy/>
37. Purwidyantri A, Hsu CH, Yang CM, Prabowo BA, Tian YC, Lai CS. Plasmonic nanomaterial structuring for SERS enhancement. Published online 2019. doi:10.1039/c8ra10656h
38. Tong L, Wei Q, Wei A, Cheng JX. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation, and photothermal effects. *Photochem Photobiol*. 2009;85(1):21. doi:10.1111/J.1751-1097.2008.00507.X
39. Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*. 2003;15(10):1957-1962. doi:10.1021/CM020732L/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CM020732LN00001.GIF
40. Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, et al. Airway Remodeling in Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:191. doi:10.3389/FMED.2020.00191/BIBTEX
41. Kowal K, Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A. The Effect of Inhaled Corticosteroids on the Concentration of Soluble CD163 in Induced Sputum of Allergic Asthma Patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(1):49-55.
42. Kami A, Sprynskyy M, Winkler K. Ultrasensitive SERS immunoassay based on diatom biosilica for detection of interleukins in blood plasma. Published online 2017:6337-6347. doi:10.1007/s00216-017-0566-5
43. Bonifacio A, Dalla Marta S, Spizzo R, et al. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Blood Plasma and Serum Using Ag and Au Nanoparticles: A Systematic Study*. Vol 406.; 2014. doi:10.1007/s00216-014-7622-1
44. Cabrera-Alonso R, Guevara E, Ramírez-Elías MG, Moncada B, González FJ. Detection of hydroquinone by Raman spectroscopy in patients with melasma before and after treatment. *Skin Res Technol*. 2019;25(1):20-24. doi:10.1111/SRT.12589
45. Zermeño-Nava JDJ, Martínez-Martínez MU, Ramírez-De-Ávila AL, et al. Determination of sialic acid in saliva by means of surface-enhanced Raman spectroscopy as a marker in adnexal mass patients: ovarian cancer vs benign cases. *J Ovarian Res*. 2018;11(1). doi:10.1186/S13048-018-0433-9
46. Sahu A, Dalal K, Naglot S, Aggarwal P, Krishna CM. Serum based diagnosis of asthma using Raman spectroscopy: An early phase pilot study. *PLoS One*. 2013;8(11). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0078921
47. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc*. 1951;11:55-75. doi:10.1039/DF9511100055

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

48. Kudelski A. Raman studies of rhodamine 6G and crystal violet sub-monolayers on electrochemically roughened silver substrates: Do dye molecules adsorb preferentially on highly SERS-active sites? *Chem Phys Lett.* 2005;414(4-6):271-275. doi:10.1016/J.CPLETT.2005.08.075
49. Mandeville PB. TIPS BIOESTADÍSTICOS Tema 12: Tamaño de la muestra VII. *CIENCIA UANL.* 2006;3.
50. Graham BL, Steenbruggen I, Barjaktarevic IZ, et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(8):e70. doi:10.1164/RCCM.201908-1590ST
51. Esperanza Benítez-Pérez R, Torre-Bouscoulet L, Villca-Alá N, et al. www.medigraphic.org.mx Espirometría: recomendaciones y procedimiento. *Revisión Neumol Cir Torax.* 2016;75(2). Accessed July 3, 2022. www.medigraphic.org.mx
52. Graham BL, Steenbruggen I, Barjaktarevic IZ, et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. <https://doi.org/10.1164/rccm201908-1590ST>. 2019;200(8):E70-E88. doi:10.1164/RCCM.201908-1590ST
53. Khatri SB, Iaccarino JM, Barochia A, et al. Use of fractional exhaled nitric oxide to guide the treatment of asthma an official american thoracic society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;204(10):E97-E109. doi:10.1164/RCCM.202109-2093ST
54. New Clinical Practice Guideline on Fractional Exhaled Nitric Oxide (FeNO) to Help Guide Asthma Treatment. Accessed July 5, 2022. <https://www.thoracic.org/about/newsroom/press-releases/journal/2021/new-clinical-practice-guideline-on-fractional-exhaled-nitric-oxide-feno-to-help-guide-asthma-treatment.php>
55. Larenas-Linnemann D, Gochicoa-Rangel L, Macías-Weinmann A, et al. [Mexican consensus on fractional exhaled nitric oxide (FeNO) in asthma 2020]. *Rev Alerg Mex.* 2020;67 Suppl 2:S1-S25. doi:10.29262/RAM.V67I0.760
56. Evaluación multidimensional del control en el paciente con asma. Aplicaciones clínicas en la toma de decisiones para el tratamiento. Accessed August 9, 2022. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40236>
57. Mancilla-Hernández E, Barnica-Alvarado RH, Morfín-Maciel B, Larenas-Linnemann D. Validación de un cuestionario diagnóstico de asma en niños y adultos para estudios epidemiológicos. *Rev Alerg Mex.* 2014;61(2):73-80. doi:10.29262/RAM.V61I2.29
58. Pérez-Yarza EG, Castro-Rodríguez JA, Villa Asensi JR, Garde Garde J, Hidalgo Bermejo FJ. Validation of a Spanish version of the childhood asthma control test (SC-ACT) for use in Spain. *Anales de Pediatría (English Edition).* 2015;83(2):94-103. doi:10.1016/J.ANPEDE.2014.10.003
59. Comisión Nacional de Bioética | Gobierno | gov.mx. Accessed July 3, 2022. <https://www.gob.mx/salud/conbioetica>
60. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos Elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) Ginebra 2016 OFICINA REGIONAL PARA LAS.
61. DOF - Diario Oficial de la Federación. Accessed July 6, 2022. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013#gsc.tab=0
62. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1225-1232. doi:10.1366/000370207782597003
63. Uso del método de descomposición empírica de modos para eliminar fluorescencia en espectros Raman de tejido biológico | Memorias del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica. Accessed August 10, 2022. <http://memoriascnib.mx/index.php/memorias/article/view/269>
64. León-Bejarano F, Méndez MO, Ramírez-Elías MG, Alba A. Improved Vancouver Raman Algorithm Based on Empirical Mode Decomposition for Denoising Biological Samples. *Appl Spectrosc.* 2019;73(12):1436-1450. doi:10.1177/0003702819860121

65. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1225-1232. doi:10.1366/000370207782597003
66. Gautam R, Vanga S, Ariese F, Umopathy S. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. *EPJ Techniques and Instrumentation* 2015 2:1. 2015;2(1):1-38. doi:10.1140/EPJTI/S40485-015-0018-6
67. Lasalvia M, Capozzi V, Perna G. A Comparison of PCA-LDA and PLS-DA Techniques for Classification of Vibrational Spectra. *Applied Sciences* 2022, Vol 12, Page 5345. 2022;12(11):5345. doi:10.3390/APP12115345
68. Horton RB, Duranty E, McConico M, Vogt F. Fourier transform infrared spectroscopy and improved principal component regression (PCR) for quantification of solid analytes in microalgae and bacteria. *Appl Spectrosc.* 2011;65(4):442-453. doi:10.1366/10-06122
69. Seifert S. Application of random forest based approaches to surface-enhanced Raman scattering data. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020;10(1):1-11. doi:10.1038/s41598-020-62338-8
70. Hernández-Arteaga A, de Jesús Zermeño Nava J, Kolosovas-Machuca ES, et al. Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles. *Nano Res.* 2017;10(11):3662-3670. doi:10.1007/S12274-017-1576-5
71. Oleszko A, Hartwich J, Wójtowicz A, Gąsior-Głogowska M, Huras H, Komorowska M. Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2017;183:239-246. doi:10.1016/J.SAA.2017.04.020
72. Bands R. RAMAN DATA AND ANALYSIS Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring. Accessed July 11, 2022. www.jobinyvon.fr
73. Ladiwala U, Bankapur A, Thakur B, Santhosh C, Mathur D. *Raman Spectroscopic Detection of Rapid, Reversible, Early-Stage Inflammatory Cytokine-Induced Apoptosis of Adult Hippocampal Progenitors/Stem Cells.*
74. Reyes-Goddard JM, Barr H, Stone N. Photodiagnosis using Raman and surface enhanced Raman scattering of bodily fluids. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(3):223-233. doi:10.1016/S1572-1000(05)00066-9
75. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy.* 2015;46(1):4-20. doi:10.1002/JRS.4607
76. de Gelder J, de Gussem K, Vandenabeele P, Moens L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy.* 2007;38(9):1133-1147. doi:10.1002/JRS.1734
77. Ajuste de varias ecuaciones de referencia espirométrica a una muestra poblacional en México. Accessed July 18, 2022. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=12681>
78. Rathnapala A, Fries A, West Y, et al. P176 Diagnosing asthma in children using spirometry: evidence from a birth cohort study. *Thorax.* 2016;71(Suppl 3):A179-A179. doi:10.1136/THORAXJNL-2016-209333.319
79. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy J v. The Cytokines of Asthma. *Immunity.* 2019;50(4):975-991. doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.018
80. Galicia-Negrete G, Falfán-Valencia R. Mediadores de la respuesta inflamatoria en asma y su relación con obesidad. *Rev Alerg Mex.* 2017;64(2):198-205. doi:10.29262/RAM.V64I2.259
81. Larenas-Linnemann D, Gochicoa-Rangel L, Macías-Weinmann A, et al. Consenso mexicano en relación con la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) en asma 2020. *Rev Alerg Mex.* 2020;67:s1-s25. doi:10.29262/RAM.V67I0.760
82. Marugán Miguelsanz J, Suárez Rodríguez M, Rodríguez Fernández L, García Ruiz Morales J de. *Niveles Normales de Interleucinas 6 y 8 En Suero y Orina de Niños Sanos Asintomáticos.* Vol 45.; 2005.
83. Ordoñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy J v. *Increased Neutrophil Numbers and IL-8 Levels in Airway Secretions in Acute Severe Asthma Clinical and Biologic Significance.* Vol 161.; 2000. www.atsjournals.org

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ASMA INFANTIL Y SU DETECCIÓN EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SERS

84. Junttila IS. Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol.* 2018;9(JUN). doi:10.3389/FIMMU.2018.00888/FULL
85. Wang Z yu, Li W, Gong Z, Sun P rong, Zhou T, Cao X wei. Detection of IL-8 in human serum using surface-enhanced Raman scattering coupled with highly-branched gold nanoparticles and gold nanocages. *New Journal of Chemistry.* 2019;43(4):1733-1742. doi:10.1039/C8NJ05353G
86. IL-10 AND IL-35 AS INFLAMMATION REGULATORS IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS AND MILD ATOPIC ASTHMA. *American International Journal of Biology and Life Sciences.* Published online January 6, 2022:1-12. doi:10.46545/AIJBL.V4I1.229
87. Sudha SD, Makant N, Chaitali M, Pramod V. Importance of IL-10 and IL-17 cytokines in human asthma as studied by ELISPOT. *International Journal of Medicine and Biomedical Research.* 2013;2(2):103-112. doi:10.14194/ijmbr.223
88. Vizmanos Lamotte Gerardo. Tipificación del fenotipo inflamatorio en el asma bronquial en niños de 7 a 14 años, mediante recuento celular y determinación de citoquinas en esputo inducido. Published online 2011.
89. Zhang S, van der Mee FAM, Erckens RJ, Webers CAB, Berendschot TTJM. Raman spectroscopic detection of interleukin-10 and angiotensin converting enzyme. *Journal of the European Optical Society-Rapid Publications.* 2021;17(1):1-5. doi:10.1186/S41476-021-00152-Z/FIGURES/1
90. Periyalil HA, Wood LG, Scott HA, Jensen ME, Gibson PG. Macrophage activation, age and sex effects of immunometabolism in obese asthma. *European Respiratory Journal.* 2015;45(2):388-395. doi:10.1183/09031936.00080514
91. Sharma N, Akkoyunlu M, Rabin RL. Macrophages—common culprit in obesity and asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;73(6):1196-1205. doi:10.1111/all.13369
92. Shamah-Levy TT, Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, et al. Sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes en México, actualización de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Publica Mex.* 2018;60(3, may-jun):244-253. doi:10.21149/8815
93. Sahu A, Dalal K, Naglot S, Aggarwal P, Krishna M. Serum Based Diagnosis of Asthma Using Raman Spectroscopy: An Early Phase Pilot Study. *PLoS One.* 2013;8(11):78921. doi:10.1371/journal.pone.0078921
94. Bhattacharya A, Ashouri R, Fangman M, Mazur A, Garrett T, Doré S. Soluble receptors affecting stroke outcomes: Potential biomarkers and therapeutic tools. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1-17. doi:10.3390/ijms22031108