

dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.28

Caracterización óptica del Sistema Nervioso Central de *Haementeria officinalis*

Optical characterization of the Central Nervous System of *Haementeria officinalis*

E. Díaz-Torres¹, J. Vargas-Sánchez², P. A. Lomelí-Mejía³, A. Cruz-Orea⁴

¹Escuela Superior de Física y Matemáticas-IPN, Col. San Pedro Zacatenco, 07730 Ciudad de México, México.

²División de Neurociencias INR. Col. Arenal de Guadalupe, CP 14389, Ciudad de México, México.

³División de Investigación, INR. Col. Arenal de Guadalupe, CP 14389, Ciudad de México, México.

⁴Departamento de Física, CINVESTAV-IPN, CP 14-740, 07360 Ciudad de México, México.

RESUMEN

La falla en la regeneración de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) en vertebrados superiores es un problema que no se ha resuelto completamente, esto limita la rehabilitación de muchas conductas motoras después de una lesión en la médula espinal. En la regeneración neuronal intervienen múltiples factores y de estos, los que inducen el crecimiento neurítico se han estudiado para intentar favorecer la extensión y la reconexión de las neuronas lesionadas con sus blancos. La regeneración del SNC de sanguijuelas se ha estudiado intensamente porque permite abordar el problema a diferentes niveles con distintas técnicas, en este trabajo se obtuvo el espectro de absorción óptico, con espectroscopía fotoacústica (EFA), del SNC y de tejido de la sanguijuela *Haementeria officinalis*, con el objetivo de conocer las longitudes de onda óptimas para la irradiación posterior de células del SNC y de tejido *H. officinalis*. Los resultados de este estudio muestran que el SNC de estos organismos absorbe en la región comprendida de 300 nm a 500 nm, y las muestras de tejido tienen un máximo de absorción óptico próximo a 300 nm, además se observaron diferencias evidentes entre los espectros de absorción ópticos del SNC con lesión y el control (sin lesión).

PALABRAS CLAVE: *Haementeria officinalis*, Espectroscopía Fotoacústica, Regeneración Neuronal.

ABSTRACT

The failure in the neuron regeneration in the central nervous system (CNS) in higher vertebrates, is a not completely solved problem, this limits the rehabilitation of many motor conducts after an injury in the spinal cord. In neuronal regeneration multiple factors are involved, between them those that induce the neurite outgrowth which has been studied to try to encourage the extension and reconnection of the injury neurons with their blanks. The regeneration of the CNS of leeches has been intensely studied because allows to approach the problem at different levels with different techniques. In this study the optical absorption spectrum of the CNS and the tissue of the leech *H. officinalis* was obtained, by using photoacoustic spectroscopy (PAS), in order to investigate the optimal wavelengths for later irradiation of CNS cells and tissue of *H. officinalis*. The results of this study show that the CNS of these organisms absorbs in the region of 300 nm to 500 nm, and the tissue samples has a maximum of optical absorption near to 300 nm, besides were observed evident differences between the optical absorption spectra of CNS with injury and the control (without injury).

KEYWORDS: *Haementeria officinalis*, Photoacoustic Spectroscopy, Neuronal regeneration.

Correspondencia

DESTINATARIO: Elizabeth Díaz Torres

INSTITUCIÓN: Escuela Superior de Física y Matemáticas-
IPN, U.P.A.L.M.

DIRECCIÓN: Av. Instituto Politécnico Nacional S/N,
Edificio 9, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07730, Del.
Gustavo A. Madero, Ciudad de México, CDMX, México

CORREO ELECTRÓNICO:

elizabeth.diaz.torres@hotmail.com

Fecha de recepción:

13 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

23 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

Después de una lesión que afecta al sistema nervioso, el restablecimiento de las conductas motoras depende de que las fibras nerviosas regeneren y se conecten correctamente a sus blancos, por tanto en el campo de la rehabilitación motora se han realizado grandes esfuerzos y creado múltiples terapias tendientes a fortalecer las conexiones intactas por la lesión y a promover la reconexión de los axones dañados, sin embargo la recuperación de conductas motrices sigue siendo dependiente de la capacidad de regeneración de células del sistema nervioso central (SNC), es decir, de la conectividad de axones periféricos con sus blancos ya que el grado de rehabilitación depende del número de conexiones saludables y nivel máximo en que pueden fortalecerse.

Para comprender el proceso de regeneración del SNC se han estudiado a las sanguijuelas desde hace más de 40 años ^[1], pues en ellas se conoce la ubicación, la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas mecano-sensoriales así como sus conexiones en el SNC, además ofrecen diversas ventajas, como lo son: la capacidad de regenerar *in vivo* como *in vitro*, la posibilidad de realizar diversos estudios, tanto moleculares, como electrofisiológicos, bioquímicos y conductuales entre otros, por tanto permite abordar el problema de regeneración neuronal a diferentes niveles con técnicas modernas ^[2], y puesto que este organismo es capaz de recuperarse de lesiones en su SNC de forma natural, el estudio de la recuperación motriz después de una lesión inducida en el SNC da la posibilidad de probar diversas formas de estimulación tanto físicas como químicas en un tiempo relativamente corto (2 a 4 semanas), además, las propiedades eléctricas de la membrana neuronal, los canales iónicos y los neurotransmisores, son semejantes o idénticos a los del resto de los animales ^[3].

Por otra parte, estudios realizados en animales, han generado resultados alentadores al colocar dispositivos generadores de campos eléctricos en la zona de lesión de médula espinal, lo que ha favorecido la reha-

bilitación de conductas motoras en animales adultos ^[4], también se ha probado la estimulación eléctrica en la rehabilitación periférica ^[5,6] y se ha mostrado que favorece la regeneración de neuronas cultivadas del SNC ^[7], sin embargo los resultados siguen siendo limitados y aún quedan muchas preguntas por responder. Por este motivo la implementación de técnicas físicas, como lo es espectroscopía fotoacústica (EFA), en áreas biomédicas ^[8,9] ha permitido comprender como es la interacción de la luz visible con muestras biológicas, para poder diagnosticar ^[10,11] o tratar algunas enfermedades, como lo son diferentes tipos de cáncer ^[12,13]. La absorción de luz modulada ^[14] y luz continua en la región visible del espectro electromagnético puede generar fenómenos físicos y químicos, ejemplo de esto es la fotosíntesis, la fluorescencia, absorción de vitamina D, entre otros. Para el problema específico de la regeneración del SNC, en este trabajo se propone estudiar la absorción óptica de muestras de tejido y de SNC de la sangujuela *Haementeria officinalis*, y con esto determinar cuál es el rango de longitudes de onda óptimo en el que las moléculas de estas muestras están absorbiendo la radiación, y posteriormente analizar si la absorción de luz puede inducir regeneración en estas células y bajo qué condiciones lo haría, si bien existen otros grupos de investigación que trabajan con *H. officinalis*, hasta donde se sabe no se han reportado estudios acerca de sus propiedades ópticas. Los estudios en sanguijuelas buscan los mecanismos básicos de funcionamiento y respuesta del SNC, precisamente, estos estudios pretenden ayudar a comprender como responde el sistema nervioso a un protocolo de estimulación y dar la pauta para aplicarlos en organismos más cercanos evolutivamente al humano.

METODOLOGÍA

Para producir la lesión en el SNC del organismo adulto completo de *H. officinalis*, esta se anestesia durante 15 minutos en 10% de etanol, luego se fija con alfileres entomológicos en un plato con cera y se realiza una incisión ventral en la piel para descubrir el nervio

conectivo, el esquema de las partes del organismo de la sanguijuela se muestra en la Figura 1, luego se genera la lesión del cordón nervioso aplicando compresión con unas pinzas (Dumont No. 5) en una extensión de $300 \mu\text{m}$, con lo cual los axones se separan interrumpiéndose la continuidad física y eléctrica ^[15,16], como se aprecia en la Figura 2. Después se realiza una microdissección para extraer el SNC lesionado, este procedimiento es el mismo para extraer el SNC sin lesionar. También se tomaron segmentos de tejido de la pared corporal del lado ventral de la sanguijuela con aproximadamente $500 \mu\text{m}$ de espesor.

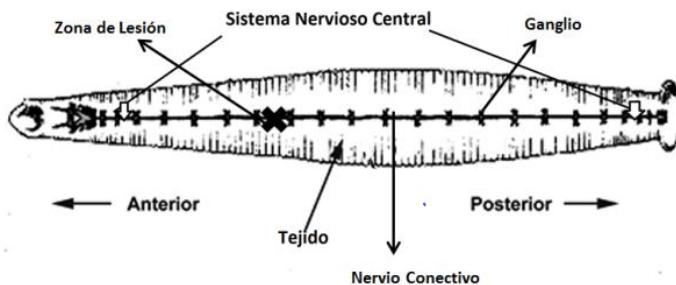


FIGURA 1: Diagrama de una sanguijuela y de su SNC, el cual está compuesto de 21 ganglios intermedios y ganglios fusionados en la cabeza y en la cola del animal. La lesión se hace por obturación con pinzas de microdissección sobre el nervio conectivo entre los ganglios segmentales 7 y 8.

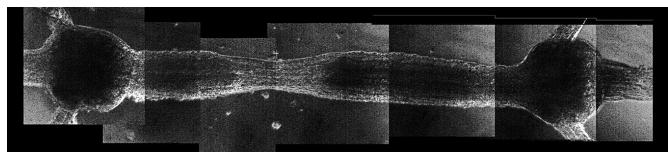


FIGURA 2: Lesión inducida en el SNC de *H. officinalis*, se muestra parte del nervio conectivo que une dos ganglios segmentales y el efecto de obturar las fibras nerviosas que conectan a los mismos debido a la lesión.

Después las muestras de SNC con lesión, sin lesión y de tejido fueron procesadas en un espectrómetro fotoacústico empleando la configuración de transmisión,

para cada medición se utilizaron organismos con masa de 0.3 gr . Los espectros de absorción ópticos fueron obtenidos en un rango de longitudes de onda de 250 nm a 900 nm , el arreglo experimental se muestra en la Figura 3 y consta de una lámpara de Xe con monocromador, y un modulador mecánico con una frecuencia fija de 17 Hz . La luz modulada es guiada a través de una fibra óptica hasta la celda fotoacústica, donde se encuentran las muestras a estudiarse. La señal fotoacústica, generada por la absorción óptica de la muestra, es detectada por un micrófono que está conectado a un amplificador Lock-in que a su vez está acoplado a una PC que procesa los datos de amplitud (reportados en unidades arbitrarias *u.a.*) y fase en función de la longitud de onda.

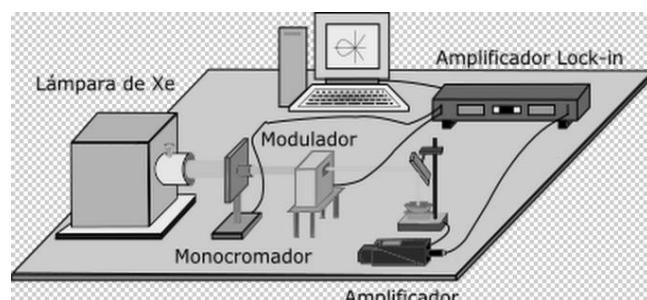


FIGURA 3: Arreglo experimental usado para realizar espectroscopía fotoacústica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 4 muestra que el SNC de estos organismos absorbe en la región comprendida de 300 nm a 500 nm con 0.20 u.a. ($\sigma = 0.018 \text{ u.a.}$, con $n=4$) y 0.23 u.a. ($\sigma = 0.018 \text{ u.a.}$, con $n=4$) respectivamente en estas longitudes de onda, esto cuando el SNC no está lesionado, a su vez el SNC con lesión tiene una banda de absorción óptica que comienza próxima a 300 nm con 0.25 u.a. ($\sigma = 0.065 \text{ u.a.}$, con $n=4$) decayendo paulatinamente a mayores longitudes de onda. Para el caso de las muestras de tejido se encontró que la absorción óptica presenta un máximo alrededor de 300 nm ($\sigma = 0.039 \text{ u.a.}$, con $n=2$), seguido de un decayamiento lineal hasta 600 nm ($\sigma = 0.063 \text{ u.a.}$, con $n=2$), como lo muestra la, poste-

riormente una banda de absorción en el rango de 600 nm a 800 nm debida a la presencia de algas que viven en simbiosis con *H. officinalis*, entonces es posible atribuir esta última banda de absorción a que las algas contienen clorofillas.

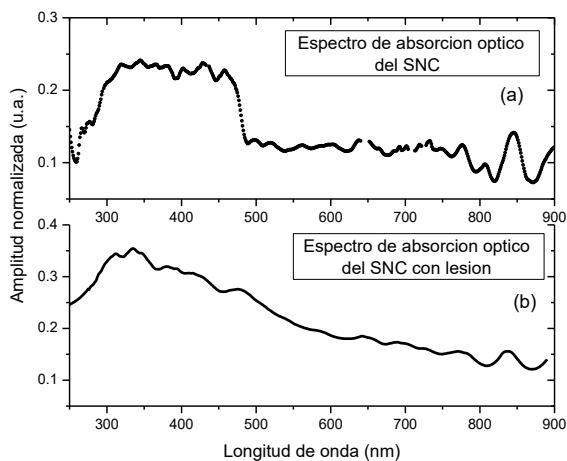


FIGURA 4: Espectros de absorción ópticos, obtenidos por EFA, del SNC de *H. officinalis*. a) Sin lesión, b) con lesión.

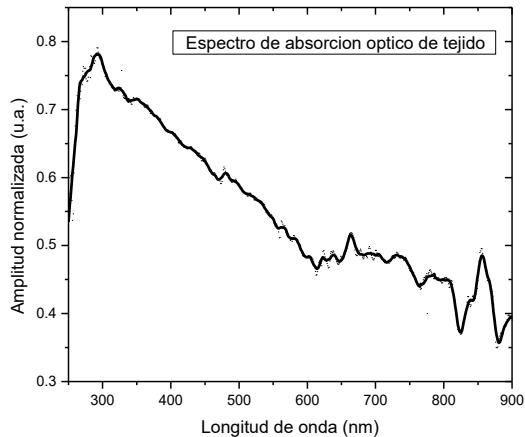


FIGURA 5: Espectro de absorción óptico, obtenidos por EFA, de tejido de *H. officinalis*.

Los resultados mostraron que la absorción de luz modulada, en la región visible del espectro electromagnético, es mayor cuando el SNC se ha lesionado, esto podría atribuirse a que después de una lesión en el nervio conectivo existe una acumulación de células

microgliales en la zona de lesión [17], por tanto la densidad de la muestra cambia después de la lesión y entonces la luz que llega a la muestra puede ser mayormente absorbida y dispersada, lo cual provoca cambios en el espectro de absorción óptico. Las diferencias obtenidas entre los espectros abren la posibilidad de estudiar la evolución en la regeneración del nervio lesionado y de distinguir ópticamente un SNC con lesión de uno sin lesión.

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió determinar las longitudes de onda en las cuales el SNC y tejido de *H. officinalis* está absorbiendo más la radiación electromagnética, lo cual indica una mayor interacción con las moléculas que los componen. Es necesario mencionar que este estudio no es posible con técnicas espectroscópicas convencionales, por la naturaleza biológica de las muestras, siendo así importante la implementación de espectroscopía fotoacústica en este tipo de estudios, pues además, esta técnica no es invasiva con la muestra a estudiar. A partir de esto se propone el uso de luz modulada o continua, en las regiones de absorción obtenidas, para investigar si es posible inducir regeneración en el SNC con un haz de luz LED que emita en las longitudes de onda específicas obtenidas en el presente estudio.

REFERENCIAS

- [1] K. J. Muller, S. Carbonetto. The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the C.N.S. of the leech. *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 185, pp. 485-516, 1979.
- [2] F. F. De-Miguel, K. J. Muller, W. B. Adams, J. G. Nicholls. Axotomy of single fluorescent nerve fibers in developing mammalian spinal cord by photoconversion of diaminobenzidine. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol 117 pp.73/79, March(2002).
- [3] D.H. Hubel, T.N. Wiesel. Plasticity of ocular dominance columns in the monkey striate cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, Vol 278, pp. 377-409, 1977.
- [4] D. Graupe, H. Cerrel-Bazo, H. Kern, U. Carraro. Walking performance, medical outcomes and patient training in FES of innervated muscles for ambulation by thoracic-level complete paraplegics. *Neurol Research*. 31: 123-130. (2008).
- [5] S. Hamid, R. Hayek. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview. *European Spine Journal*. 17: 1256-1269. (2008).
- [6] R. C. Miller, M. R. Popovic, T. A. Thrasher, M. Verrier. Functional electrical stimulation therapy improves grasping in chronic cervical spinal cord injury: Two case studies. *Journal of Automatic Control*, January (2009).
- [7] C. D. McCaig, A. M. Rajnicek, B. Song, M. Zhao. Controlling cell behaviour electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*. 85: 943-978. (2005).
- [8] P. A. Lomelí Mejía, J. L. Jiménez Pérez, A. Cruz Orea, H. Villegas Castrejón, H. Lecona Butron, M. Meléndez Lira. Photoacoustic analysis of bone osteogenesis to different doses of laser irradiation, *Journal of Vacuum Science Technology A* Vol. 23, pp.761-763, June (2005).
- [9] P. A. Lomelí Mejía, G. Urriagoitía, J.L. Jiménez Pérez, L. H. Hernández Gómez, H. Lecona Butron, A. Cruz Orea. Photoacoustic Spectroscopy Applied to the Study of Bone Consolidation In Fractures, *Materials Science Forum* Vols. 480-48, pp. 339-344, (2005).
- [10] J. L. González-Domínguez, C. Hernández-Aguilar, F. A. Domínguez-Pacheco, E. Martínez-Ortiz, A. Cruz-Orea, F. Sánchez-Sinencio. Absorption Peaks: α , β , γ and Their Covariance with Age and Hemoglobin in Human Blood Samples Using Photoacoustic Spectroscopy, *International Journal of Thermophys*, Vol. 33, pp. 1827-1833.
- [11] E. Maldonado Alvarado, E. Ramón-Gallegos, J. L. Jiménez Pérez, A. Cruz-Orea, J. Hernández Rosas. Photothermal Techniques Applied to the Thermal Characterization of Cysteine Nanofluids, *International Journal of Thermophys*, Vol. 34, pp.:948-954, (2013).
- [12] E. Ramón-Gallegos, S. Stolik, C. Ponce-Parra, G. López-Bueno, A. J. Pérez-Zapata, A. Calderón, R. A. Muñoz-Hernández, A. Cruz-Orea, F. Sánchez-Sinencio. Photoacoustic Spectroscopy Applied to the Study of Protoporphyrin IX Induced in Mice, *Analytical Sciences*, Vol.17 Special Issue, April (2001).
- [13] A. Liopo, R. Su, A. A. Oraevsky. Melanin nanoparticles as a novel contrast agent for optoacoustic tomography, *Photoacoustics*, Vol. 3, pp. 35-43, (2015).
- [14] Y. Zamora-Juárez, A. J. Pérez-Zapata, L. Solano Rodriguez, E. Ramón-Gallegos, A. Cruz-Orea. Photodynamic Effect of Modulated and Continuous LASER Radiationon Cancerous Cells Cultivated InVitro, *Physica Scripta*. Vol. T118, pp. 136-139, (2005).
- [15] K. J. Muller, S. Carbonetto. The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the CNS of the leech, *Journal of Comparative Neurology* Vol. 185 pp. 485-516. (1979).
- [16] E.J. Elliot, K.J. Muller. Sprouting and regeneration of sensory axons after destruction of ensheathing glial cells in the leech central nervous system, *The Journal of Neuroscienc,e* Vol. 3, pp. 1994-2006, (1983).
- [17] E. McGlade-McCulloh, A.M. Morrissey, F. Norona, K.J. Muller. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 86, pp. 1093-1097, (1989).