

dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.31

Obtención y Análisis del Espectro de Absorción Óptico de Sangre de Rata Fisher con Daño Hepático Mediante Espectroscopía Fotoacústica

Obtaining and Analysis of Optical Absorption Spectrum of Fisher Rat Blood with Hepatic Damage by Photoacoustic Spectroscopy

M.L. Alvarado-Noguera¹, E. Cano-Europa², M. Franco-Colín², C. Hernández-Aguilar¹, F.A. Domínguez-Pacheco¹, A. Cruz-Orea³

¹Instituto Politécnico Nacional - SEPI-ESIME, Zácatenco, Edificio 5, 3er. Piso,

Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Col. Lindavista, C.P. 07738, Ciudad de México, CDMX, México.

²Instituto Politécnico Nacional - ENCB, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Col. Lindavista, C.P. 07738, Ciudad de México, CDMX, México.

³Departamento de Física, CINVESTAV - IPN, A.P. 14-740, C.P. 07738, Ciudad de México, CDMX, México.

RESUMEN

La Espectroscopía Fotoacústica (EFA), ha destacado de entre las técnicas fototérmicas por su versatilidad para la caracterización de diversos tipos de muestras, incluyendo las de tipo biológico. En este estudio, se compararon y analizaron mediante EFA, las diferencias entre los espectros de absorción ópticos de sangre de ratas macho Fisher en tres casos, control (ratas sanas), con daño hepático, y con daño hepático tratadas con *Curcuma longa*. Los resultados experimentales demostraron diferencias en los espectros de absorción ópticos de cada caso analizado, por lo que EFA se propondría como una técnica complementaria, no convencional para el estudio del efecto de la *Curcuma longa* en daño hepático inducido en modelo animal.

PALABRAS CLAVE: Curcuma longa, Daño hepático, Espectroscopía fotoacústica, Sangre de rata Fisher.

ABSTRACT

Photoacoustic Spectroscopy (PAS) stand outs among Photothermal techniques due to its versatility for the characterization of different types of materials, including biological samples. In this study, were compared and analyzed by PAS, the differences between the optical absorption spectra of blood of male Fisher rats, in three cases, control (healthy rats), liver damage and liver damage treated with *Curcuma longa*. The experimental results show differences in the optical absorption spectra of each analysed case, therefore PAS would be proposed as a non conventional complementary technique, to study the effect of *Curcuma longa* in induced liver damage for an animal model.

KEYWORDS: Curcuma longa, liver damage, photoacoustic spectroscopy, Fisher rat blood.

Correspondencia

DESTINATARIO: A. Cruz-Orea

INSTITUCIÓN: Depto. Física, CINVESTAV-IPN

DIRECCIÓN: Av. IPN #2508, Col. San Pedro Zacatenco,

C.P. 07360, Ciudad de México, CDMX, México

CORREO ELECTRÓNICO: orea@fis.cinvestav.mx

Fecha de recepción:

16 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

14 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, de entre los cuales, destaca el cáncer hepático con 745, 000 defunciones al año, situándose como el quinto cáncer más común en hombres y el noveno cáncer más común en las mujeres, además es considerado como la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo y es en gran medida un problema de las regiones menos desarrolladas, en México, el cáncer de hígado se encuentra entre los primeros 7 lugares de mayor incidencia ^[1]. En los últimos años, se han estudiado distintos tipos de alimentos con el propósito de conocer sus bondades médicas, como elementos antioxidantes y antiinflamatorios, que ayuden a la prevención y disminución de distintos tipos de cánceres o enfermedades crónicas, como es el caso de la *Curcuma longa*, la cual es una raíz de origen Hindú ^[2], dicha raíz posee propiedades altamente desinflamantes, antioxidantes y antitumorales ^[3, 4, 5] cuyo elemento activo, la curcumina ^[6], produce efectos anti-inflamatorios, analgésicos, antialérgicos, citotóxicos, hepatoprotectores, etc. ^[7]. Además debido a sus propiedades nutritivas (fuente de vitaminas B6 y fibra, además de altas concentraciones de magnesio, potasio y hierro) ^[8], podría mejorar el estado de la sangre, de esta manera se pudiera manifestar en cambios en los espectros de absorción óptico lo cual, fue el objetivo de la presente investigación empleando un modelo animal. Por otro lado, a lo largo de los años, la Espectroscopía Fotoacústica (EFA), ha mostrado su potencial en las áreas biomédicas ^[9], debido a que es una técnica no destructiva que requiere una pequeña cantidad de la sustancia en estudio y que factores ópticos que limitan la espectroscopía en materiales biológicos, tales como la dispersión de la luz, no son impedimento en la EFA para la investigación óptica de dichas muestras. La validación de la técnica de EFA al compararla con otras técnicas convencionales como es el caso de espectroscopía UV-Vis se ha realizado en otros estudios, de tal manera los datos obtenidos serían inversos a los obtenidos en reflectancia para muestras opacas ^[10]. Dentro de las ventajas que presenta la EFA se encuentra que la transmitancia y dispersión de la luz

incidente a través de la muestra analizada no limita su aplicación al estudio de propiedades ópticas en el área biológica. Los espectros obtenidos por la EFA, pueden ser útiles en investigaciones cualitativas dentro del área biomédica. Una aplicación de la EFA ha consistido en comparar información de propiedades de fluidos corporales anormales con respecto a fluidos corporales sanos, ya que mediante la teoría del efecto fotoacústico desarrollada por Rosencwaig y Gersho en 1976 ^[11], se han caracterizado diversos tipos de muestras biológicas ^[12, 13], como es el caso de la sangre, caracterizada por Soret en 1883 ^[14]; y observándose cierta relación entre la absorción de las razones de los picos característicos de la sangre γ/β y γ/α y la cantidad de hemoglobina en ella ^[15], también se ha estudiado con EFA los espectros de absorción ópticos de la sangre de pacientes con anemia y leucemia observándose variaciones entre las intensidades de los picos de absorción debidas a las diferencias de concentración de hemoglobina ^[16].

Por otro lado, es posible utilizar la EFA para caracterizar alteraciones en el tejido hemático ocasionadas por sustancias tóxicas. Para probar dicha propuesta se empleó el modelo del hepatocito resistente modificado (MHRM), el cual emplea al N- dietilnitrosamina (DEN) como iniciador el primer día (D1), seguido de tres dosis del 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) como inhibidor celular los días 7, 8 y 9. Finalmente, al día 10 se realiza una hepatectomía al 70% (Hx) como estímulo potente de liberación de factores de crecimiento para la hipertrofia hepática ^[17].

METODOLOGÍA

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Fisher 344, las cuales fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas (temperatura de 21 ± 2 °C, humedad relativa del 40%-60%, ciclos de luz:oscuridad de 12:12 h). Los animales fueron alimentados con una dieta balanceada (Purina Rat Chow 5001) y agua *ad libitum*, los cuales fueron divididos en 3 grupos de 6 ratas respectivamente:

- Grupo 1): Grupo control, recibió los vehículos y el tratamiento quirúrgico sin hepatectomía.

- Grupo 2): Grupo de daño hepático, empleando el MHRM, se induce administrando el DEN 200 mg/Kg ip (D1), el 2-AAF 20 mg/Kg/d ig (D7-9) y la Hx (D10).
- Grupo 3): Grupo de daño hepático, empleado el MHRM, con una dosis de cúrcuma de 100 mg/Kg 30 min antes y 30 min posteriores a la administración del DEN. Al administrar el DEN se inicia una etapa de estrés oxidativo, por lo tanto, al administrar la cúrcuma antes y después del DEN, se genera una respuesta en contra de este estrés debido al efecto antioxidante de dicha raíz.

La cúrcuma empleada fue de tipo comercial. La Hx se realizó previa anestesia con éter etílico. Al D25 los animales fueron sacrificados por decapitación y se recolectó la sangre en tubos con EDTA como anticoagulante. Posteriormente, se analizaron 60 ml de sangre mediante EFA, en un rango de longitud de onda de 350-650 nm.

Montaje experimental del espectrómetro fotoacústico

La obtención del espectro de absorción óptico de las muestras de sangre se hizo mediante la técnica de espectroscopía fotoacústica. Al tratarse de una muestra ópticamente opaca, se utilizó la configuración de celda fotoacústica cerrada, de un espectrómetro fotoacústico montado en el Departamento de Física del CINVESTAV-IPN, el cual consta de: una lámpara de xenón como fuente de haz de luz, un monocromador para la selección de diferentes longitudes de onda provenientes de la lámpara, un cortador óptico mecánico para modular la luz monocromática a frecuencia fija de 17 Hz, una fibra óptica la cual guía la luz monocromática y modulada hacia la celda fotoacústica cerrada. Dentro de la celda fotoacústica, se encuentra un micrófono de electreto, el cual captta las variaciones de presión en ella producidas por el efecto fotoacústico en la muestra ^[11]. La onda sonora captada por el micrófono es convertida en una señal eléctrica por este sensor, amplificada y enviada a un amplificador Lock-in. Finalmente, la señal fotoacústica (SF) es procesada y almacenada por una PC (Ver Figura 1).

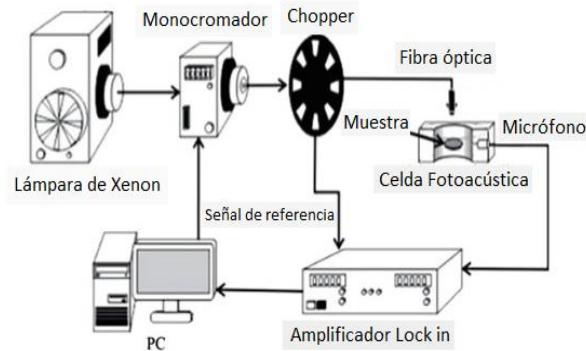


FIGURA 1. Montaje experimental del espectrómetro fotoacústico (Figura adaptada de Ref. ^[18]).

Los 60 ml de sangre fueron colocados dentro de la celda fotoacústica, y sellada herméticamente con grasa de vacío por una ventana de vidrio en la parte inferior, y una ventana de cuarzo en la parte superior donde incide la luz. Se llevaron a cabo dos repeticiones de las muestras analizadas de sangre de cada grupo (1, 2, 3).

Al tratarse de muestras de sangre, se espera observar los picos característicos de absorción de la sangre α , β , γ alrededor de 575 nm, 540 nm y 412 nm respectivamente, este último pico corresponde a la banda de Soret ^[14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los picos de absorción α , β y γ se deben a la presencia de distintos anillos fenólicos presentes en la muestra analizada, particularmente, el pico γ se atribuye a una transición permitida $\pi -$ desde una región remota del átomo de hierro. Los picos α y β , menos intensos que el γ , son debidos a transiciones electrónicas asociadas con la interacción de transferencia de carga de los orbitales del átomo de hierro con los estados ligados ^[15].

Los espectros de absorción ópticos que se muestran en la Figura 2, revelan que para el Grupo 2, los picos α , β y γ , tienen una menor absorción comparada con los espectros de los Grupos 1 y 3, además para estos dos grupos anteriores, los valores de las razones de los picos de absorción γ/β y γ/α , son aproximadamente iguales y de

menor magnitud (Ver Tabla 1), lo cual indicaría una mayor concentración de hemoglobina en la sangre ^[14].

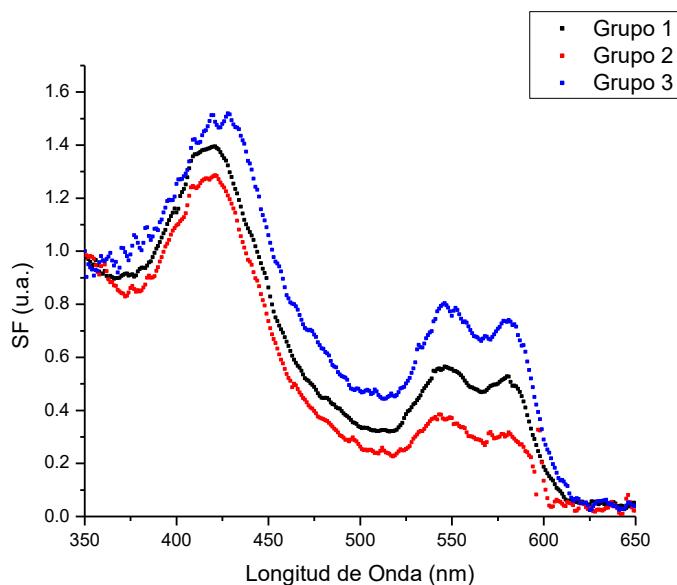


FIGURA 2. Comparación de los espectros de absorción ópticos de los diferentes tipos de sangre analizados mediante EFA.

Los espectros obtenidos en este trabajo, muestran diferencias entre el grupo de daño hepático empleando el MHRM, con los grupos control y el de daño hepático al que se le administró cúrcuma. Hasta el momento, con la EFA se mostró que el grupo con daño hepático tiene un espectro de absorción óptico diferente al control. No obstante es necesario de diversas pruebas químicas para poder identificar los componentes de la sangre que modifican dicho patrón. Sin embargo, se muestra que la cúrcuma tiene un efecto protector debido a que el espectro de absorción óptico de la sangre de los animales con daño hepático, que recibieron dicho antioxidante, se asemeja a la absorción del espectro correspondiente al grupo control. Se sabe, que la cúrcuma contiene compuestos fenólicos como flavonoides ^[3] los cuales poseen capacidad antioxidante al neutralizar las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas ocasionadas por las alteraciones celulares inducidas por el DEN y el 2-AAF. Otro tipo de estudio fue el realizado en el año 2014, donde se comparó

la absorción de glucosa en ratas con ingesta de Cúrcuma, con ratas sin ingesta de cúrcuma (control), reportando que la *Curcuma longa* disminuye el nivel de absorción de glucosa en el intestino, reduciendo así, el nivel de glucosa en la sangre, por lo que se señala en este artículo, que existe una variación de componentes en la sangre debido a la ingesta de la Cúrcuma ^[19].

CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en este trabajo, revelan que mediante EFA, es posible observar el potencial antioxidante de la *Curcuma longa* a través del cambio en el espectro de absorción óptico en la sangre, debido a un daño hepático, colocando a la EFA como una técnica útil y de bajo costo para diversos estudios en el área biomédica.

Al comparar los 3 grupos evaluados, se observa una tendencia de comportamiento favorable debido al consumo de Cúrcuma, como se observa en la Tabla I en la razón de los picos γ/β y γ/α , sin embargo, en el análisis de varianza con la prueba de diferencias mínimas significativas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad de error del 5%.

Descripción	Picos característicos de la sangre	Picos		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
λ (nm)	α	579	571	584
	β	546	537	546
	γ	417	420	418
Absorción Óptica (u. a.)	α	0.017	0.014	0.024
	β	0.019	0.015	0.027
	γ	0.045	0.056	0.050
γ/β		2.368	3.733	1.852
	γ/α	2.647	4	2.083

TABLA 1. Picos α , β , γ y razones de los picos γ/β , γ/α .

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Ivonne Memije, Alejandra Torres, Jorge Tapia y Plácido Rojas de la ENCB-IPN por el apoyo brindado en la realización de este protocolo. El autor A. Cruz-Orea agradece el apoyo financiero del CONACYT a través del Proyecto No. 241330.

REFERENCIAS

- [1] Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC, disponible en: <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/wcr-order.php>. ISBN: 978-92-832-0432-9
- [2] A. Benavides; R. E. Hernández; H. Ramírez, A. Sandoval. Tratado de Botánica Moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México. 2010. ISBN: 968844-050-7.
- [3] C. Hernández-Aguilar, A. Domínguez-Pacheco, A. Cruz-Orea, J. L. González-Domínguez, E. Rojas Lima J. López Bonilla. "Curcuma, Anticancer Food: Photoacoustic Spectroscopy". The SciTech, Journal of Science & Technology. Vol-4, Issue-1, pp. 40-45, 2015. ISSN: 2348 -098X (Online)
- [4] C. Tamvakopoulos, K. Dimas, D. Z., S. Hatziantoniou, Z. Han, Z. Liu, J. H. Wyche and P. Pantazis, "Metabolism and Anticancer Activity of the Curcumin Analogue, Dimethoxycurcumin". Clinical Cancer Research, vol. 13(4), pp. 1269-1277, 2007. [DOI: 10.1158/1078-0432](https://doi.org/10.1158/1078-0432)
- [5] A. J. Rubya, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K. N. Rajasekharan, R. Kutta, "Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoid". Cancer Letters, vol. 94, pp. 79-83, 1995. [DOI: 10.1016/0304-3835\(95\)03827-J](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03827-J)
- [6] Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H., "Curcumin: the Indian solid gold". In The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, Springer US, pp. 1-75. 2007. [DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1)
- [7] Lobo, R., Prabhava, K. S., Shirwaikara, A., & Shirwaikar, A., "Curcuma zedoaria Rosc.(white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties". JPP, 61, pp. 13-21. 2009. [DOI: 10.1211/jpp.61.01.0003](https://doi.org/10.1211/jpp.61.01.0003)
- [8] Saiz de Cos, P., & Pérez-Urria Carril, E. "Cúrcuma I (Curcuma longa L.)". REDUCA Biología, 7(2), pp. 84-99, 2014. ISSN: 1989-3620
- [9] A. Rosencwaig , Photoacoustics and Photoacoustic spectroscopy. Wiley, Universidad de Michigan, 1980, pp. 219-242. ISBN: 9780471044956
- [10] C. Hernandez-Aguilar, A. Cruz-Orea, R. Ivanov, A. Dominguez, A. Carballo, I. Moreno, R. Rico, "The Optical Absorption Coefficient of Maize Seeds Investigated by Photoacoustic Spectroscopy". Food Biophysics, Vol 6, pp. 481-486, 2011. [DOI: 10.1007/s11483-011-9229-9](https://doi.org/10.1007/s11483-011-9229-9)
- [11] A. Rosencwaig, A. Gersho. "Theory of the Photoacoustic Effect". J. Appl. Phys., vol. 47, pp. 64, 1976. [DOI: 10.1063/1.322296](https://doi.org/10.1063/1.322296)
- [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, April, vol.17, 2001. ISSN 0910-6340.
- [13] S. Hong-Wei, H. Men-Cai, W. Qing-Hua, W. W. Chun. "The application of photoacoustic detection in the primary diagnosis of cancer". Photoacoustic and Photothermal Phenomena II pp. 431-434, 1990. [DOI: 10.1007/978-3-540-46972-8_109](https://doi.org/10.1007/978-3-540-46972-8_109)
- [14] J.L. Soret. "Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette". Compt Rend, vol. 97, pp. 1269-1273, 1883.
- [15] 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". Int J Thermophys , vol. 33, pp. 1827-1833, 2012. [DOI: 10.1007/s10765-012-1304-z](https://doi.org/10.1007/s10765-012-1304-z)
- [16] Q. Pan, S. Qiu, S. Zhang, J. Zhang, S. Zhu. "Application of Photoacoustic spectroscopy to Human Blood." Photoacoustic and Photothermal Phenomena Proceedings of the 5th International Topical Meeting, Heidelberg, Fed. Rep. of Germany, July 27-30, 1987 (Vol. 58). Springer. 2013. [DOI: 10.1007/978-3-540-48181-2_146](https://doi.org/10.1007/978-3-540-48181-2_146)
- [17] E. Semple-Roberts, M.A. Hayes, D. Armstrong, R.A. Becker, W.J. Racz, E. Farber, "Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene", Int. J. Cancer vol. 40, pp. 643-645, 1987. [DOI: 10.1002/ijc.2910400512](https://doi.org/10.1002/ijc.2910400512)
- [18] R. Rico Molina, C. Hernández Aguilar, Dominguez Pacheco, A. Cruz-Orea, J. L. López Bonilla, "Characterization of Maize Grains with Different Pigmentation Investigated by Photoacoustic Spectroscopy", Int. J. Thermophys vol. 35, pp.1933-1939, 2014. [DOI: 10.1007/s10765-013-1445-8](https://doi.org/10.1007/s10765-013-1445-8)
- [19] D. Dhianawaty, A. M. S., S. Surialaga, "Effect of Curcuma Longa L. Rhizome decoct on glucose absorption level in Intestine of male rat of wistar strain". International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol 6 (4), pp. 532-535, 2014. ISSN- 0975-14