

# DETERMINACIÓN POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA DE GASES Y SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR EL ÁCIDO $\delta$ -AMINOLEVULÍNICO EN RATONES.

Ramón-Gallegos E. \*, Stolik Suren \*\*†, Benítez-Ibarra R. \*, Pacheco M. \*\*+, Tomás Velázquez S.A. \*\*, Cruz-Orea A. \*\*, Pérez-Zapata A. J. \*, Glaeber R. \*\* y Sánchez-Sinencio F. \*\*.

\*Lab. de Citopatología Ambiental. Depto. de Morfología. ENCB-IPN. Carpio y Plan de Ayala S/N. Col. Sto. Tomás. Delegación Miguel Hidalgo. C.P. 11340. México, D.F. Tel/Fax 57296300 Ext. 62519. E-mail: evaramong@portugalmail.pt

\*\*Lab. de Técnicas Fototérmicas. Depto. de Física, CINVESTAV-IPN. A.P. 14-740, México, D.F. Tel. 57473800 Ext. 619. E-mail:stomas@fis.cinvestav.mx

†CICATA-IPN. Legaria 694. Col. Irrigación. C.P. 11500, México, D.F. Tel. 57296300 ext. 67767

**Resumen:** A pesar del creciente uso del ácido *d*-aminolevulínico (ALA) en el tratamiento del cáncer, son escasos los estudios de los efectos secundarios causados por la acumulación de este ácido en organismos sanos, por lo que se planteó el siguiente *objetivo*: Determinar por dos métodos (invasivo y no invasivo) la lipoperoxidación (LPO) provocada por la acumulación del ALA residual (ALA-res) en ratones tratados con diferentes dosis de ALA exógeno. Las dosis administradas fueron 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA, y 160 mg/kg de ALA más 100 mg/kg de  $\alpha$ -tocoferol, a los tiempos en que inducen la mayor acumulación de PpIX. Se cuantificó el ALA-res y se valoró la LPO en diferentes órganos por la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), así como por la detección de etileno en la exhalación del ratón por Espectroscopia Fotoacústica (PAS) de gases. En el intervalo de dosis de 80 a 320 mg/kg de ALA, el ALA-res provocó LPO en el hígado, cerebro y riñones. El  $\alpha$ -tocoferol confirmó que el ALA-res produce especies de oxígeno reactivo. La determinación del grado de LPO por PAS, coincidió con la técnica TBARS, aunque sólo cuando existió daño en el hígado. Sin embargo, PAS presentó algunas ventajas, tales como el ser un método no invasivo (no se tiene que sacrificar al animal), además de ofrecer una determinación *in vivo* y en tiempo real, y ser altamente sensible, ya que detecta hasta 100 pptV (1 pptV=10<sup>-12</sup> partes en volumen).

## INTRODUCCION

El ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) se ha utilizado desde 1990 en la terapia fotodinámica (PDT), con el fin de inducir la formación de la PpIX, uno de los fotosensibilizadores más potentes para tratar diferentes tipos de cáncer [1]. A pesar de su importancia, hasta ahora no han sido estudiados los efectos secundarios que eventualmente pueden ser ocasionados por la acumulación del mismo.

Por ejemplo, se ha reportado que en algunas enfermedades donde se detecta una acumulación de ALA endógeno, como en la porfiria intermitente aguda y en la intoxicación por plomo, han sido observados también daños neurológicos [2,3]. En este trabajo se determina por 2 métodos, uno invasivo (determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico en tejidos frescos) y otro no invasivo (determinación del etileno en la exhalación del ratón), la lipoperoxidación (LPO) provocada por la acumulación de ALA residual en ratones tratados

con diferentes dosis de ALA exógeno. La determinación de la LPO por cuantificación del etileno en la exhalación, es un método nuevo que se desarrolló en nuestros laboratorios y ha sido realizado por primera vez en este trabajo.

## METODOLOGÍA

Se inyectaron ratones CD1 (n=7) por vía intraperitoneal (I.P.) con 40, 80, 160, 160 más  $\alpha$ -tocoferol y 320 mg/kg de ALA (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA). Los ratones fueron sacrificados a los tiempos 1, 0.75, 0.50, 0.50 y 1 h, respectivamente, después de la administración. Se tomaron muestras de sangre por vía intracardiaca, así como fracciones del hígado, cerebro, riñón y piel para la cuantificación del ALA-res por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [4]. Asimismo, se valoró la LPO por las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) [5].

La determinación del etileno en la exhalación del ratón se realizó por Espectroscopia Fotoacústica de gases. Para ello, se diseñó un contenedor de vidrio, en forma de dos conos acoplados por sus bases, de 10 cm de largo y 7 cm de diámetro de las bases. El contenedor se construyó con una entrada y una salida para permitir que un flujo de gas continuo transportara la exhalación del ratón hacia el sistema de detección, denominado celda fotoacústica. Se empleó también un termostato para mantener una temperatura adecuada del ambiente donde se colocaron los ratones.

A través de una entrada para la cánula de una aguja con mariposa se le administró el ALA al ratón, sin tener que sacarlo del contenedor. La determinación del etileno se realizó de la siguiente manera: los ratones fueron anestesiados por vía I.P. con 90 mg/kg de pentobarbital. Estos fueron introducidos, uno a la vez, en el contenedor de vidrio, previamente montado y calentado a 27 °C. A través de la cubeta pasó un flujo de aire de 4L/h.

De este flujo, solo 1L/h se introdujo a la celda fotoacústica, desechándose el resto. Después de obtener una línea base constante (debido a la emisión natural de etileno por el ratón), lo cual ocurrió regularmente a los 15 min, se procedió a inyectar al ratón con la dosis de ALA a probar. De esta forma, la LPO se pudo evaluar por medio de la concentración de etileno en el aire transportado a través de la celda fotoacústica. En el espectrómetro fotoacústico empleado, la concentración de etileno se expresa en una gráfica en función del tiempo. Para conocer la cantidad de etileno total exhalado, es necesario integrar el área bajo la curva de la concentración de etileno y considerar el flujo del gas transportador utilizado, vía la expresión:

$$\int f(X)dX = (\sum f(X_i)\Delta X_i)X_i$$

donde  $f(X)$  es la concentración del etileno y  $X$  es el tiempo de medición.

El área se expresa entonces en ppbV\*h (1 ppbV=10<sup>-9</sup> partes en volumen) y debe ser multiplicada por el flujo introducido a la cubeta (4L/h). Finalmente, el resultado se expresa en nL de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> producido durante el tiempo monitoreado.

## RESULTADOS

Se determinó el ALA en la sangre de los ratones tratados, considerando que el promedio del volumen de sangre total de un ratón de 20 g de peso es de 1.556 ml y que el 100% del ALA administrado hubiera llegado al torrente sanguíneo.

Los porcentajes de ALA que aún no se habían convertido a PpIX (ALA-res) se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 2 se indican las cantidades de ALA-res en los diferentes órganos analizados. En los tratamientos donde se detectó un alto porcentaje de ALA-res en sangre, existe una mayor lipoperoxidación en los órganos analizados.

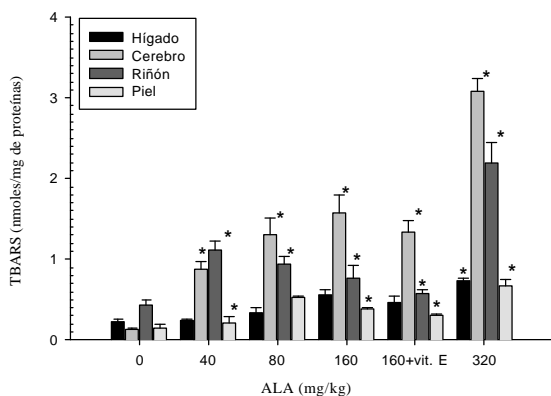
**Tabla 1.** Porcentajes de ALA-res en la sangre de los ratones tratados con diferentes dosis de ALA.

Dosis de ALA	0	40	80	160	160+ $\alpha$ -tocoferol	320
Sangre	0.2	1.05	2.33	6.27	0.78	0.21

**Tabla 2.** Concentraciones de ALA residual en el hígado, cerebro, riñón y piel de los ratones tratados con diferentes dosis de ALA.

Órgano	ALA-res en 10 <sup>6</sup> moles en los órganos de los ratones tratados con ALA (mg/kg)					
	0	40	80	160	160+ $\alpha$ -tocoferol	320
Hígado	2.77	34.7	45.8	64.4	8.38	12.7
Cerebro	1.25	3.28	8.75	24.8	12.7	28.1
Riñón	5.71	9.23	14.0	9.99	4.91	26.4
Piel	2.93	48.6	96.4	12.3	4.87	5.73

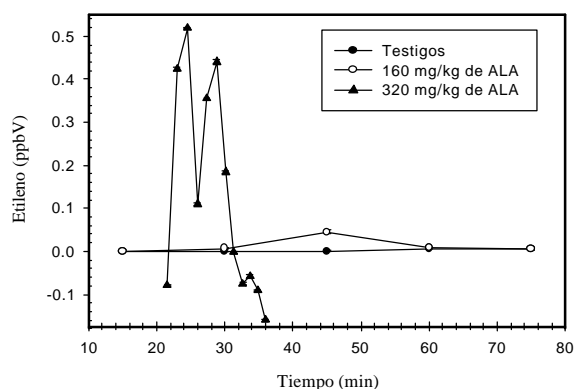
Se encontró que este ALA-res fue capaz de inducir la lipoperoxidación en todos los órganos, pero solo se observó daño histológico en el hígado, cerebro y riñones, en las dosis de 80 a 320 mg/kg de ALA. Además, el  $\alpha$ -tocoferol confirmó que el ALA-res produce especies de oxígeno reactivo, dado que, en presencia de éste, en la dosis de 160 mg/kg de ALA, se observa una disminución de TBARS (Figura 1).



**Figura 1.** Cuantificación de TBARS en el hígado, cerebro, riñón y piel de ratones expuestos a diferentes concentraciones de ALA (\*  $p < 0.05$ , diferencia significativa con respecto al grupo control).

La medida del etileno por exhalación, nos señala la LPO promedio que se está llevando a cabo en los diferentes órganos del ratón, cuando éste se trata con 40, 80, 160 y 320 mg/kg de ALA (Figura 2).

Se encontró que en las dosis de 160 y 320 mg/kg de ALA hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la emisión del etileno, ya que se determinaron 0.4269 nL y 1.007 nL para los primeros 15 minutos a partir de la administración del ALA (Figura 2). Los resultados de esta técnica coincidieron de manera general con la lipoperoxidación promedio encontrada en el hígado, cerebro y piel (figura 1).



**Figura 2.** Determinación en línea del etileno exhalado por los ratones tratados con diferentes concentraciones de ALA.

## DISCUSIÓN

Se desarrolló un método para la determinación en línea del etileno como biomarcador de la lipoperoxidación y se pudo determinar el tiempo en que se inicia y decae la exhalación de esta molécula (Figura 2). Hasta la fecha, los métodos empleados para determinar hidrocarburos en la exhalación se realizan por cromatografía de gases (GC) [6,7]. Sin embargo, por GC es común medir por métodos de acumulación, ya que la sensibilidad del equipo es del orden de ppbV. En consecuencia, no es posible seguir la cinética del proceso con tiempos de resolución satisfactorios. Aunado a esto, suele introducirse oxígeno puro a los animales bajo estudio, a pesar de que existen informes sobre la lipoperoxidación inducida en los ratones después de un período de exposición no muy grande [8]. Asimismo, en GC existe un mayor error sistemático al realizar las inyecciones de las muestras recolectadas. Los resultados obtenidos de la cuantificación del etileno por fotoacústica coincidieron con la determinación de lipoperoxidación por TBARS. No obstante, PAS presenta algunas ventajas, ya que es no invasivo (no se tiene que sacrificar al animal), ofrece una determinación *in vivo* y en tiempo real, y es altamente sensible, pues detecta hasta 100 pptV. Además, se reduce el número de animales en el experimento, ya que el mismo ratón puede ser el control.

## CONCLUSIONES

En dosis iguales o mayores a 40 mg/kg en organismos sanos, el ALA no logra convertirse totalmente en PpIX y, así, ser eliminado. Consecuentemente, una pequeña cantidad de ALA-res permanece en el organismo en cantidades suficientes para inducir LPO, aunque solo cause daños a nivel histológico en tres órganos (hígado, cerebro y riñones), en las dosis de 80 a 320 mg/kg de ALA. La Espectroscopía Fotoacústica presentó algunas ventajas con respecto a la técnica de TBARS, entre las que se destacan el ser una técnica no invasiva (no se tiene que sacrificar al animal), permitiendo la posibilidad de realizar una determinación *in vivo* y en tiempo real de la LPO. Además, PAS es altamente sensible, al detectar concentraciones del orden de 100 pptV.

## REFERENCIAS

- [1] Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C. Photodynamic Therapy with endogenous protoporphyrin IX :basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B Biol*, 6,1990,143-148.
- [2] Monteiro H. P., Bechara E. J. H., Abdalla D. S. P. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem*, 103,1991,73-83.
- [3] Hermes L. M., Valle G. R. V., Vercesi E. A., Bechara J. H. E. Damage to rat liver mitochondria promoted by  $\delta$ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochem Biophys Act*,1056,1991,57-63.
- [4] Sakai T., Morita Y.  $\delta$ -aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *Int Arch Occup Environ Health*,68,1996,126-132.
- [5] Buegue J., Aus S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzimol*,51,1978,302-310.
- [6] Frank H., Hintze T., Bimboes D., Remmer H. Monitoring Lipids Peroxidation by Breath Analysis: Endogenous Hydrocarbons and their Metabolic Elimination. *Toxicol Appl Pharmacol*, 56,1980,337-344.
- [7] Sagai M., Ichinose T. Age-related in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sciences*, 27,1980,731-738.
- [8] Halliwell B., Gutteridge J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford University Press, 1999.