



Estudio preliminar del plasma sanguíneo usando espectroscopia vibracional

Blood plasma preliminary study by using vibrational spectroscopy

Estudo preliminar do plasma sanguíneo usando espectroscopia vibracional

María Fernanda Heredia-Moyano ^I
mariaf.heredia@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-0145-2098>

Sandra Fabiola Heredia-Moyano ^{II}
sandra.heredia@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-3668-1269>

Miguel Ángel Sáez-Paguay ^{III}
miguel.saez@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-0705-5402>

Yesenia Maricela Fiallos-Godoy ^{IV}
yesse.fiallos@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2397-6893>

Correspondencia: mariaf.heredia@esPOCH.edu.ec

Ciencias Técnica y Aplicadas
Artículo de investigación

***Recibido:** 10 de enero de 2021 ***Aceptado:** 15 de febrero de 2021 * **Publicado:** 05 de marzo de 2021

- I. Biofísica, Maestría en Física, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Ingeniera Química, Maestría en Química, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Biofísico, Master Universitario en Física: Radiaciones, Nanotecnología, Partículas y Astrofísica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- IV. Médico General, Hospital General, Docente, Ambato, Ecuador.

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el plasma sanguíneo de personas usando espectroscopía vibracional, este estudio preliminar nos permite tener un conocimiento de la aplicación de otros métodos en el estudio y análisis de muestras biológicas, que podría ser de interés para nuestro entorno de investigación. Para cumplir con el objetivo se estudiaron dos grupos de muestras de dos países y en diferentes años, siendo analizadas 68 muestras de sangre que fueron extraídas de personas que no presentan patologías conocidas o diagnosticadas a la fecha del estudio, una vez extraída la sangre se separó el plasma sanguíneo mediante centrifugación y estas fueron estudiados mediante espectroscopía infrarroja, los datos obtenidos del equipo están en función de la Absorción versus el Número de onda, los cuales son preprocesados antes de generar las imágenes de resultados que nos permite evidenciar la presencia de los componentes de grupos funcionales en el plasma sanguíneo. En el primer grupo de estudio se observa un pico de absorbancia predominante en 1629 cm^{-1} que representa la proteína Amida I, en el segundo grupo de estudio el pico el componente proteico se localiza en 1635 cm^{-1} , este pico representa una vibración de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ asociado a la estructura β -sheet. Se concluye evidenciando la presencia del componente proteico y lipídico en el primer grupo de estudio y el componente proteico en el segundo grupo de estudio.

Palabras clave: Plasma sanguíneo; número de onda; espectroscopia vibracional.

Abstract

The present work aims to study the blood plasma of people using vibrational spectroscopy, this preliminary study allows us to have a knowledge of the application of other methods in the study and analysis of biological samples, which could be of interest to our research environment. To meet the objective, two groups of samples from two countries were studied and in different years, 68 blood samples were analyzed that were extracted from people who do not have known or diagnosed pathologies at the date of the study, once the blood was extracted, it was separated. the blood plasma by centrifugation and these were studied by infrared spectroscopy, the data obtained from the equipment is a function of the Absorption versus the Wave Number, which are pre-processed before generating the images of results that allows us to demonstrate the presence of the components of functional groups in blood plasma. In the first study group a predominant

absorbance peak is observed at 1629 cm^{-1} that represents the Amide I protein, in the second study group the peak of the protein component is located at 1635 cm^{-1} , this peak represents a vibration of C = O stretch associated with the β -sheet structure. It is concluded by showing the presence of the protein and lipid component in the first study group and the protein component in the second study group.

Keywords: Blood plasma; wave number; vibrational spectroscopy

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo estudar o plasma sanguíneo de pessoas através da espectroscopia vibracional, este estudo preliminar permite-nos ter um conhecimento da aplicação de outros métodos no estudo e análise de amostras biológicas, que podem ser de interesse para o nosso meio de investigação. Para cumprir o objetivo, foram estudados dois grupos de amostras de dois países e em anos diferentes, foram analisadas 68 amostras de sangue extraídas de pessoas que não tinham patologias conhecidas ou diagnosticadas à data do estudo, uma vez que o sangue foi extraído, foi separado. o plasma sanguíneo por centrifugação e estes foram estudados por espectroscopia de infravermelho, os dados obtidos no equipamento são função da Absorção versus Número de Onda, que são pré-processados antes de gerar as imagens dos resultados que nos permitem evidenciar a presença de componentes de grupos funcionais no plasma sanguíneo. No primeiro grupo de estudo um pico de absorbância predominante é observado em 1629 cm^{-1} que representa a proteína Amida I, no segundo grupo de estudo o pico do componente proteico está localizado em 1635 cm^{-1} , este pico representa uma vibração de C = O trecho associado à estrutura da folha β . Conclui-se mostrando a presença do componente proteico e lipídico no primeiro grupo de estudo e do componente proteico no segundo grupo de estudo.

Palavras-chave: Blood plasma; número da onda; espectroscopia vibracional

Introducción

La espectroscopia vibracional es una técnica experimental que proporciona datos sobre la vibración de las moléculas al interno de un sistema molecular y a través de esta se puede estudiar la composición, la estructura y la función de sistemas biológicos (Stuart, 2004). Esta técnica de estudio se ha convertido en una herramienta útil e importante para tener una alternativa en la

indagación de sistemas biológicos y así en el campo de diagnóstico médico, existen varios estudios y aplicaciones a través de la espectroscopía infrarroja que se aplican en otros países, como el estudio para evidenciar la presencia de una patología a través de una muestra de sangre. Además, con estos estudios se complementa el aporte entre la academia y la medicina, siendo un soporte tanto personal de grupos de investigación de universidades y personal médico de hospitales, con este tipo de investigación se busca tener una alternativa de estudios mínimamente invasivos que solo a través de una muestra de sangre se puedan diagnosticar enfermedades degenerativas como el Alzheimer, cáncer o diabetes (Mordechai S., 2017).

Es importante obtener una base de datos del estudio y análisis de plasma sanguíneo de personas del Ecuador para poder identificar los grupos funcionales presentes, el número de onda en el cual se localiza, evidenciar la presencia de las proteínas en el plasma, la localización del componente lipídico, esto porque existen estudios de otros países en el cual evidencian un biomarcador en enfermedades degenerativas y al existir la manera de detectar o diagnosticar la presencia del biomarcador a tiempo o dar un diagnóstico temprano se podría ayudar con un tratamiento temprano.

Este estudio se considera preliminar por ser el primero realizado con muestras de plasma sanguíneo de personas que residían en la ciudad de Cosenza - Italia (grupo 1) y de personas que residían en la ciudad de Riobamba – Ecuador, en total el tamaño de la muestra es de 68, el estudio del grupo 1 se realizó en el año 2017 y el estudio del grupo 2 se realizó en el año 2020.

Metodología

Este estudio experimental se prepararon las muestras obtenidas del grupo 1 ($n = 14$) de la siguiente manera: La sangre fue extraída en una unidad médica, el plasma fue separado en un laboratorio bioquímico y las muestras de plasma fueron congelados para el transporte y llegada al laboratorio de Biofísica, previo al análisis en el equipo de espectroscopía infrarroja, se descongeló cada muestra de plasma sanguíneo a temperatura ambiente se homogenizó la muestra agitándolo unos 5 segundos con un capilar, se extrajo con una micropipeta 20 μL . Para medir el fondo de la muestra se coloca una solución de dulbecco fosfato DPBS (Dulbecco phosphate buffer solution) se registra una medida de fondo y luego se colocó una muestra de plasma la cual fue analizada a

temperatura ambiente en el cristal ATR del espectrómetro infrarrojo FT-IR. Este procedimiento se realiza para cada muestra, el equipo mide el fondo cada vez que se cambia de muestra.

Cada muestra del primer grupo fue analizada 3 veces para verificar la reproducibilidad y se tomó un promedio de los datos preprocesados. El rango del número de onda es de 4000 a 900 cm^{-1}

El grupo 2 de muestras ($n = 54$) fueron extraídos y separadas en el laboratorio de Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, fueron almacenadas en un congelador hasta el análisis de cada muestra, para la toma de datos del segundo grupo se descongeló la muestra a temperatura ambiente, se homogenizó agitando con un capilar, se colocó en el cristal del equipo por un minuto para equilibrar con la temperatura ambiente y se realizó dos mediciones por cada muestra, este equipo mide una sola vez el fondo, se coloca y se retiran las muestras sin la necesidad de medir el fondo cada vez.

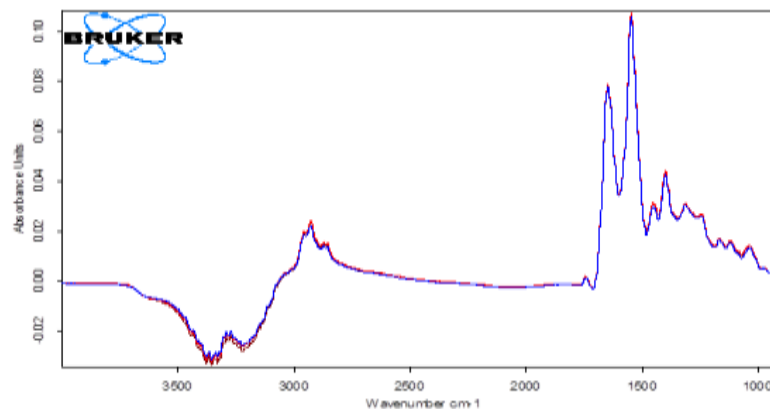
El rango de número de onda de este equipo es de 4180 y 580 cm^{-1} .

Una vez que se obtuvieron los datos de los dos grupos se muestran a continuación los resultados.

Resultados

En la figura 1 se muestra el espectro del análisis del plasma sanguíneo del grupo 1, en el cual se pueden identificar dos picos prominentes que representan la absorción en la parte proteica del plasma. La banda de vibración se encuentra entre el rango 1700 – 1500 cm^{-1} para la parte proteica y en el rango 3000-2800 cm^{-1} y en 1400 cm^{-1} se presenta la parte lipídica. Se puede observar los picos de la Amida I y de la Amida II que son los picos mas altos de izquierda a derecha y describen los componentes de la hélice-alpha o la estructura-beta.

Figura 1: Espectro del plasma sanguíneo del grupo 1

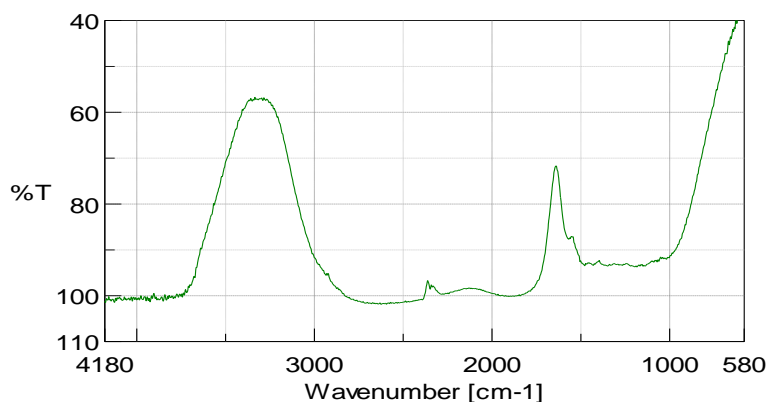


Para el grupo 2 que fue estudiado se puede observar en la figura 2 que se presenta solo un pico prominente en un rango de 1669 y 16111 cm^{-1} que en la grafica es el pico de la derecha y representa a la parte proteica del plasma sanguíneo, el otro pico elevado que está entre 3498 y 3150 cm^{-1} representa el componente de agua que contiene el plasma.

El espectro que se presenta en esta figura fue analizado en las mismas condiciones y siguiendo el diseño experimental del grupo 1, pero respresenta al grupo de 54 muestras de sangre de personas que residian en la ciudad de Riobamba, y el equipo que se utilizó para analizar las muestras es un modelo diferente al del grupo 1 pero tiene el mismo principio físico.

Es importante destacar las diferencias entre los grupos sanguíneos, el primer grupo son de personas que residian en la ciudad de Cosenza – Italia en el 2017 y el segundo grupo de ecuatorianos en el 2020.

Figura 2: Espectro del grupo 2 del plasma sanguineo



Fuente: Autores

Los componentes en el plasma sanguíneo suelen ser en porcentajes los mismos pero este estudio preliminar nos indica que al realizar un estudio de plasma sanguíneo de dos diferentes países que el espectro obtenido de los dos grupos no son exactamente iguales.

Conclusiones

Con este estudio preliminar se estudió dos grupos sanguíneos de personas que residían en diferentes países, el grupo 1 Italia y el grupo 2 Ecuador, y se observa que el espectro típico del

plasma sanguíneo difiere al presentar las dos aminos y una sola amina. Se evidenció también la presencia del componente lipídico y la ausencia del componente lipídico.

El complemento entre la parte física, biomolecular y química del estudio abre una posibilidad de estar inmersos a conocer más sobre los componentes del plasma sanguíneo de ecuatorianos y así avanzar a temas más actuales de estudio que podrían ser de gran utilidad.

Es importante realizar este tipo de estudios para acercarnos a tener una base de datos del espectro de plasma sanguíneo de personas del Ecuador y posteriormente involucrarnos en estudios de comparación y análisis de plasma sanguíneo de personas con patologías.

Referencias

1. Anderson L, Anderson N (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects, *Molecular & Cellular Proteomics*. 8:847-867.
2. Baker M, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler H, Dorling K, Fielden P, Fogarty S, Fullwood N, Heys K, Hughes C, Lasch P, Martin-Hirsch P, Obinaju B, Sockalingum G, Sulé-Suso J, Strong R, Walsh M, Wood B, Gardner P and Martin F (2014) Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials, *Nat Protoc*. 8:1771-1791
3. Barth A (2007) Spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1073-1101
4. Bogomolny E, Huleihel M, Salman A, Zwielly A, Moreh R and Mordechai S (2010) Attenuated total reflectance spectroscopy: a promising technique for early detection of premalignancy, *Analyst*. 135:1934-1940.
5. Burtis C, Ashwood E and Bruns D (2012) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*, Elsevier, St. Louis, USA.
6. Galindo M and Vicente P (2013) *Estadística para investigadores - Universidad de Salamanca*. Salamanca, España.
7. Garbett N, Miller J, Jenson A and Chaires J (2009) Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring, *Elsevier*. 86:186-191.
8. Griffiths P, Haseth (2007) *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, New Jersey: John Wiley & Sons, INC.
9. Ghuman J, Zunszain P, Petitpas I, Bhattacharya A, Otagiri M and Stephen Curry (2005) Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *J. Mol. Biol.* 353:38-52.

10. Hankins J (2006) The role of albumin and fluids and electrolyte balance, *Infusion Nursing*. 29:260-265.
11. Heinz F and Schultz C (2006) *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, John Wiley & Sons.
12. Leigh A, Anderson N (2002) The human plasma proteome, *Perspectives*. 845 - 867.
13. Mordechai S, Shufan E, Katz B, Salman A (2017) Early diagnosis of Alzheimer's disease using Infrared spectroscopy of isolated blood samples followed by multivariate analyses, *Royal Society of Chemistry*. 1276-1285.
14. Paraskevaidi M, Morais C, Lima K and Snowden J (2017) Differential diagnosis of Alzheimer's disease using spectrochemical analysis of blood, *PNAS*. 7929-7938.
15. Pasquini C (2003) *Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications*, Brazilian Chemical Society. 14(2):198-219.
16. Putnam F (1975) *The Plasma Proteins Structure, Function and Genetic Control*, New York, Academic Press.
17. Russell P (2010) *Stereoisometry of Amino Acids*, Pearson Education, Inc.
18. Stuart B. (2004) *Infrared Spectroscopy; fundamentals and applications*. Sydney: Wiley.
19. Susuki K (2010) Myelin: A Specialized membrane for cell communication, *Nature Education*. 3:9-59.
20. Theophanides T (2012) *Infrared spectroscopy - Life and biomedical sciences*, Rijeka: InTech.
21. Tamm L, and Tatulian S (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Q Rev Biophys*. 4:365-429.
22. Trevisan J, Angelov P, Scott A, Carmichael P and Martin F (2013) IRRootLab: a free and open-source MATLAB toolbox for vibrational biospectroscopy data analysis, *Bioinformatics* 29(8):1095-1097. doi: 10.1093/bioinformatics/btt084.