

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE SUSPENSIÓN PARA LA OBSERVACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS HUMANOS FRESCOS CON MICROSCOPIOS ÓPTICOS

C.M. Londero^{a,b}, M. D'Arrigo^{b,c}, B.D. Riquelme^{b,c*}

^a Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Pellegrini 250. 20000 - Rosario, Santa Fe, Argentina.

^b Facultad De Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Suipacha 531. 20000 - Rosario, Santa Fe, Argentina.

^c Instituto de Física Rosario, CONICET-UNR, Argentina. Bv. 27 de Febrero 210 bis. 20000 - Rosario, Santa Fe, Argentina

*Autor de Correspondencia : E-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar, riquelme@ifir-conicet.gov.ar, Tlf: +54 (0341) 4853222, Fax: +54 (0341) 4808584.

Recibido: Junio 2016. Aprobado: Noviembre 2016.

Publicado: Noviembre 2016.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las condiciones para que los glóbulos rojos humanos frescos puedan ser observados por microscopia convencional sin que se altere su morfología por el llamado "efecto vidrio" (crenación de los glóbulos rojos por contacto con el soporte de vidrio). Para esto, se ensayaron medios de suspensión con distintas concentraciones de albúmina sérica humana en solución fisiológica (0,002 a 20% v/v). En estas soluciones se suspendieron eritrocitos separados por centrifugación de muestras de sangre de donantes sanos. En ausencia de las proteínas del plasma, los eritrocitos se crenan al estar en contacto con el vidrio. Con el fin de obtener un porcentaje de crenación de estas muestras, se registró su evolución en el tiempo tomando fotografías de cada muestra en un microscopio óptico invertido a intervalos de tres minutos. Mediante el análisis de las imágenes digitales obtenidas, se confeccionaron gráficas del porcentaje de crenación de los GR en función del tiempo transcurrido para cada una de las concentraciones estudiadas. El análisis estadístico de los resultados permite concluir que el medio de suspensión con concentración final de 1% v/v es la opción de trabajo más adecuada, por ser la que presenta menor porcentaje de crenación, el cual, además, no se incrementa con el transcurso del tiempo.

Palabras claves: crenación, equinocito, efecto vidrio, medios de suspensión, albúmina sérica humana

OPTIMIZATION OF THE SUSPENSION MEDIUM FOR THE OBSERVATION OF FRESH HUMAN RED BLOOD CELLS WITH OPTICAL MICROSCOPES

ABSTRACT

In this paper the conditions under which fresh human red blood cells can be observed using conventional microscopy, without their morphology being altered due to "glass effect" (crenation of red blood cells in contact with the glass surface of the slide) are investigated. For this purpose, suspension media were tested with different concentrations of human serum albumin in physiological solution (from 0.002 to 20% v/v). Erythrocytes from healthy donors were previously separated by centrifuging the blood samples and suspended in these solutions. In the absence of plasma proteins, erythrocytes crenate when in contact with glass. In order to obtain a percentage of crenation of these samples, the evolution in time was captured, taking photographs of each sample under an inverted optical microscope at three minutes intervals. Graphs of the percentage of crenation of GR as a function of time for each of the concentrations studied were obtained by analysis of the digital images. Statistical analysis of the results shows that the suspension medium with final concentration of 1% v/v is the most appropriate to work with, as it has the lowest percentage of crenation which, in addition, does not increase over time.

Keywords: crenation, equinocyte, glass effect, suspending medium, human serum albumin.

INTRODUCCIÓN

En investigación biomédica es frecuente la necesidad de observar en microscopios ópticos suspensiones de

glóbulos rojos humanos frescos, a diferencia de lo que ocurre en bioquímica y hematología habituales, ya que en

las mismas se observan frotis (muestras de sangre seca con o sin tinción).

El glóbulo rojo humano (GR) normal posee una forma de disco bicóncavo que se puede modelizar mediante la descripción de su membrana con dos componentes fuertemente interactuantes, una es elástica (el citoesqueleto, red de proteínas retráctiles) y la otra es fluido-viscosa (la bicapa lipídica). Estas le confieren al GR sus características esencialmente viscoelásticas [1,2,3]. Dichas propiedades junto con su forma son responsables del alto grado de deformabilidad de los mismos en la circulación sanguínea. El modelo que explica la forma de los GR normales indica que las proteínas del citoesqueleto son las que determinan la forma [4].

Las membranas descritas por el modelo también son responsables del equilibrio osmótico en el que están los GR con el medio, debido a que el agua las atraviesa por medio de la proteína aquaporina como respuesta a cambios en la osmolaridad intra o extracelular. La concentración de solutos, para los que la membrana es relativamente impermeable (aniones polivalentes y cationes monovalentes), es la que determina la osmolaridad eritrocitaria. Cuando los aniones polivalentes disminuyen la carga aniónica (ej: al desoxigenarse la hemoglobina) ocasionan el ingreso de aniones monovalentes y agua, con lo que el GR entra en estado hipotónico y se edematiza. Estos movimientos rápidos de aniones monovalentes también están acompañados de variaciones en el contenido de cationes monovalentes [5].

Diversos estudios, [6], demostraron que muchas de las sustancias anfipáticas¹ afectan rápidamente la forma de los GR. Las soluciones aniónicas pueden ocasionar crenaciones, que se producen cuando la concentración del

soluto es mayor en el exterior de los GR, éstos pierden agua, por lo que se encogen y forman espículas en la superficie [7] (ver figura 1). En cambio las soluciones catiónicas pueden convertir a los glóbulos en estomatocitos, lo cual ocurre cuando los GR pierden una de sus concavidades pues tienen su membrana deformada). Las distintas soluciones tienen resultados opuestos, anulándose una a la otra cuando ambas están presentes. Esto se puede explicar a partir del modelo de bicapas acopladas, donde el compuesto aniónico se localiza predominantemente en la capa externa de la bicapa lipídica, por lo tanto se expande con respecto al medio interno conduciendo a la formación de espículas en la superficie exterior. En cambio, el catiónico se intercala en el medio interior de la bicapa formando así estomatocitos [8,9]. En consecuencia, las condiciones del medio en el que se encuentran los glóbulos rojos pueden modificar su forma normal (discocitos) transformándola en equinocitos I-II-III (discos crenados), estomatocitos (discos cóncavos en una cara y convexos en la otra), esféricitos (esferas de menor volumen) o falciformes (sickle red blood cells).

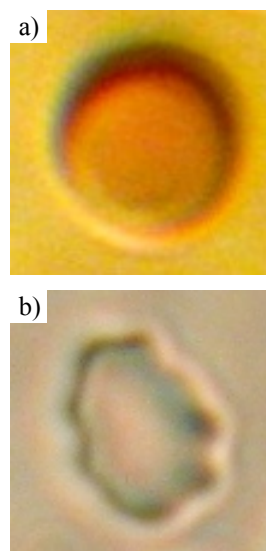


Fig. 1. Imágenes capturadas de un GR: a) discocito en plasma, y b) crenado en solución fisiológica.

¹ Las sustancias anfipáticas son aquellas sustancias que poseen moléculas con dos extremos de características diferentes, uno de los cuales es polar, hidrofílico, y el otro es apolar, hidrofóbico; pero la distancia entre ellos es tal que cada uno de los extremos manifiesta su solubilidad.

El efecto vidrio (*glass effect*) es aquel fenómeno por el cual los eritrocitos se crenan al adherirse a la superficie del vidrio [10,11,12,13]. Los eritrocitos que se encuentran en ausencia de las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, además de adherirse al vidrio se crenan. Si bien este efecto es bien conocido, hasta el momento no ha sido del todo esclarecido. En la práctica, el efecto de crenación puede evitarse suspendiendo los eritrocitos en solución fisiológica o buffer fosfato salino (pH de 7,4; osmolaridad de 280-295 mOsm/Kg) con albúmina en concentraciones similares a las encontradas en plasma [13].

El objetivo del presente trabajo es evaluar que concentración de albúmina en solución fisiológica resulta óptima para emplear con eritrocitos frescos utilizando microscopía óptica convencional, tanto para evaluación cualitativa como para tratamiento de imágenes. Asimismo, se evalúa la respuesta de los GR frente a las distintas concentraciones de albúmina, determinando un porcentaje de crenación de la muestra a distintos tiempos de contacto entre los GR y el vidrio.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó sangre obtenida por punción venosa, anticoagulada con EDTA de individuos sanos siguiendo los protocolos del Comité de Bioética de la FCByF, para lo cual se les hizo firmar el consentimiento informado previa la extracción de la muestra. Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 25x100 rpm (Paralwall modelo PWL12T) y se descartó la capa leucoplaquetaria. El plasma y el paquete globular (o coulote) fueron almacenados en tubos de plástico para su posterior utilización de acuerdo con las recomendaciones internacionales para hemorreología y hemodinámica [14]. Se prepararon soluciones de albúmina sérica humana (HSA) (20% v/v de Laboratorio de Hemoderivados UNC) en solución fisiológica (SF) (pH de 7,4 y osmolaridad de 308 mOsm/L de Laboratorios Roux-Ocefa S.A.). Se trabajó con concentraciones finales de

0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10 y 20% v/v. En portaobjetos de vidrio de dimensiones 53mm x 78mm y espesor de (0,30±0,05) mm (#3), se colocaron gotas de 30µl de las diferentes concentraciones de las soluciones, utilizando una micropipeta (Boeco de 5-50µl). Con la punta del tip se tomaron GR del paquete globular, y se los colocaron sobre la gota de solución, mezclando con el tip para homogeneizar la suspensión. Se observó la muestra en un microscopio invertido (Union Optical) utilizando un objetivo 40x y una cámara Canon Power Shot A640 colocada en uno de sus oculares mediante un adaptador de 52 mm. Como control se realizó el mismo procedimiento en una gota de 30µl de plasma autólogo.

Luego de tres minutos se tomaron 5 fotografías, utilizando un zoom digital de 1.4, en lugares diferentes de la muestra (desplazando la platina), asegurándose de evitar los bordes de la muestra puesto que en estos se producía la deshidratación de la misma. Dicho procedimiento se realizó a intervalos de 3 minutos hasta el momento en que transcurrieron 15 minutos de la muestra en el portaobjetos. Esto se realizó para cada una de las concentraciones de HSA en SF y para el plasma.

Se analizaron las imágenes capturadas, contando el número total de GR y se calcularon los porcentajes correspondientes a los GR crenados. Con el valor de cada una de las cinco imágenes se realizó una estadística (software SciDAVis), obteniendo así un porcentaje de crenación con su desviación estándar a cada uno de los tiempos medidos (3, 6, 9, 12 y 15 minutos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un ensayo preliminar realizado con concentraciones finales de 0,5; 1 y 2% v/v, durante 6 minutos evidenció que los valores de crenación disminuyen a menores concentraciones (siendo alrededor de 16% para la solución de 2% v/v, 15% para la de 1% v/v y 14% para la de 0,5% v/v) y aumentan aproximadamente un 30% luego de los primeros 3 minutos. A modo representativo

y ejemplificativo de las fotografías capturadas para cada una de las diferentes suspensiones, en la figura 2 se muestran las imágenes obtenidas para la solución de

HSA en SF con concentración final de 0,5% v/v, y la evolución temporal de la muestra en el portaobjetos.

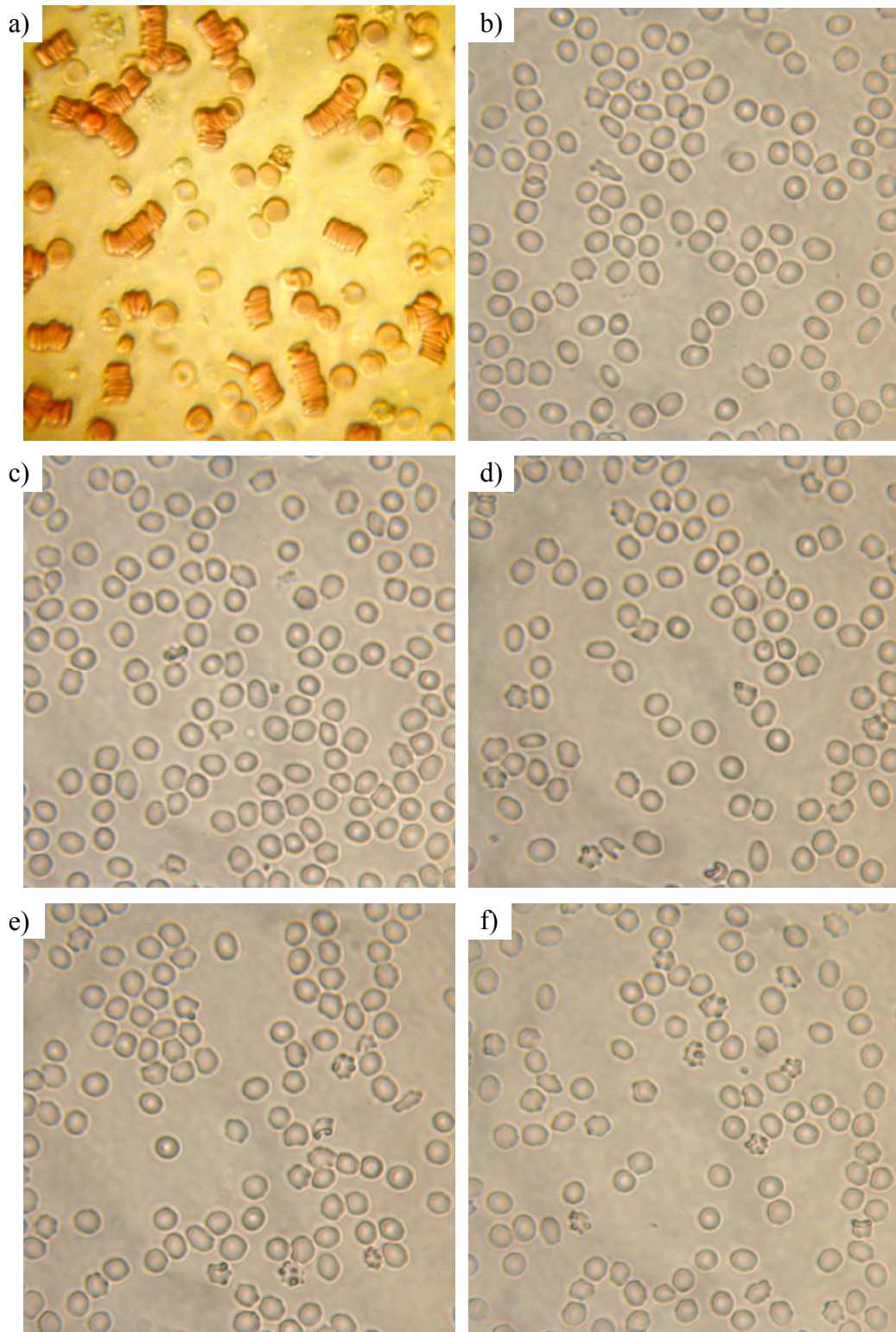


Fig. 2. Imágenes de los GR suspendidos a) en plasma; y en solución de HSA en SF con concentración final de 0,5% v/v después de b) 3 minutos, c) 6 minutos, d) 9 minutos, e) 12 minutos, y f) 15 minutos.

En la figura 3 se puede apreciar la variación del porcentaje de crenación de los GR a medida que transcurre el tiempo para las concentraciones entre 0,2 y 20% v/v. La gráfica evidencia que en un medio con altas concentraciones de albúmina se generan altos porcentajes de crenación, como también ocurre para medios con bajas concentraciones (ver figura 4). Como se evidencia cualitativamente en la figura 2 y cuantitativamente en la figura 3, el porcentaje de crenación aumenta a mayor

tiempo de contacto entre los GR y el vidrio, para todas las concentraciones. Se prosiguió por realizar una gráfica en tres dimensiones de todas las concentraciones estudiadas, que permite realizar una comparación cuantitativa de las soluciones y las respuestas de crenación a todos los tiempos (figura 4). En estas gráficas se observa claramente la variación del porcentaje de crenación con respecto al tiempo y a la concentración de HSA en SF (con valores entre 0,002 y 20% v/v).

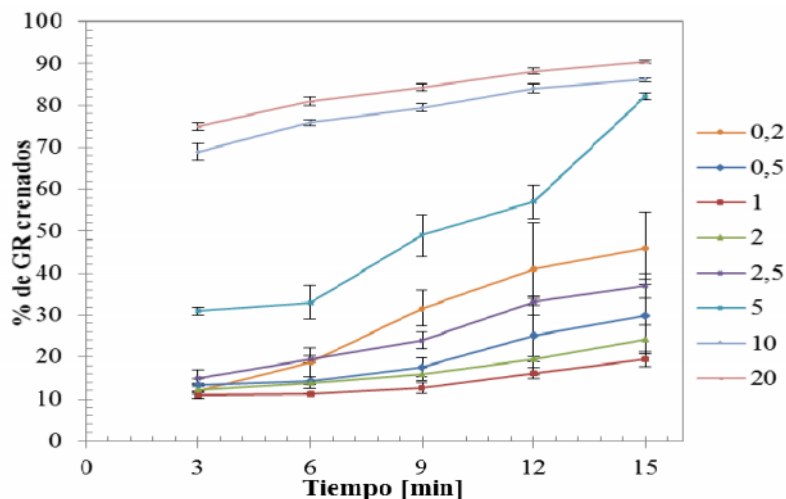


Fig. 3. Gráfica del porcentaje de crenación en función del tiempo para las soluciones de HSA en SF para las distintas concentraciones de albúmina en % v/v.

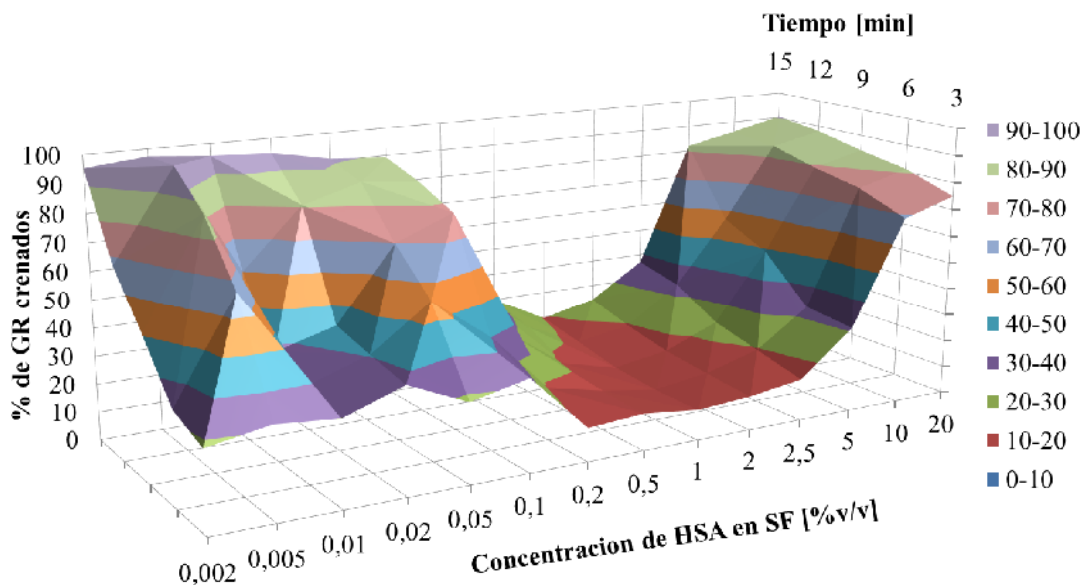


Fig. 4. Gráfica del porcentaje de crenación en función del tiempo y de las concentraciones de HSA en SF, la incerteza de las determinaciones es del 19%.

CONCLUSIONES

Debido a que la solución con concentración final de 1% v/v presenta los porcentajes más bajos de crenación, y a que la gráfica de evolución temporal del porcentaje de crenación se aproxima a una constante en el tiempo, es posible concluir que resulta ser la opción de trabajo adecuada.

Los resultados obtenidos son de interés para la observación de suspensiones de glóbulos rojos frescos en microscopía convencional, ya que permiten establecer las condiciones óptimas del medio de suspensión para la realización de ensayos con soportes de vidrio, sin que un porcentaje mayor al 20% del total de los GR de la muestra se encuentre alterado luego de 15 minutos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe, por becar la investigación de innovación tecnológica de Londero, Carolina. Asimismo, desean reconocer la buena disposición de las investigadoras del Área Química Analítica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas perteneciente a la Universidad Nacional de Rosario, que contribuyeron con las extracciones de las muestras de sangre.

REFERENCIAS

[1] Mohandas, N.; Gallagher, P. G. (2008). "*Red Cell Membrane: past, present and future*". Blood, Vol 112 (10), pp. 3941.

[2] Riquelme B.D. and Rasia R.J. (1997) "*Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano*", Anales AFA 9:255-259.

[3] Riquelme, B.; Foresto, P.; D'Arrigo, M.; Valverde, J. and Rasia R.J. (2005). "*A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes...*", J Biochem Biophys Methods 62(2):131-41.

[4] Mehta, N.G. (1983) "*Role of membrane integral proteins in the modulation of red cell shape by*

albumin, dinitrophenol and the glass effect", Biochimica et Biophysica Acta 762:9-18.

- [5] Delfino, S. (1993) "*Estructura y función de la membrana eritrocitaria*", Revista Argentina de Transfusión 19(1):5-23.
- [6] Deuticke, B. (1968) "*Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment*", Biochimica et Biophysica Acta 163:494-500.
- [7] Donnersberger A.B. and Lesak A.E. (2002) "*Libro de laboratorio de anatomía y fisiología*", Editorial Paidotribo, pp. 37.
- [8] Sheetz, M.P. and Singer, S.J. (1974) "*Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions*", Proceedings of the National Academy of Sciences 71:4457-4461.
- [9] Aldana, D.H; Brailsford, J.D and Bull, B.S. (1989) "*Red cell membrane crenation: a macromodel of the echinocyte*", J of Theoretical Biology 140:185-192.
- [10] Eriksson, L.E. (1990) "*On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces - the 'glass effect'*", Bioc et Biop Acta 1036:193-201.
- [11] Wu, Y.; Hu, Y.; Cai, J.; Ma, S.; Wang, X.; Chen, Y. and Pan, Y. (2009) "*Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM*", Micron 40:359-364.
- [12] Wong, P. (2005) "*A hypothesis of the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations*", J Theoretical Biology 223:127-135.
- [13] Baskurt, O. K. et al. (2009). "*New guidelines for hemorheological laboratory techniques*". Clin Hemorheol and Microcirc 42 :75-97
- [14] Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling, MW, Meiselman, HJ. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. IOSPress, Ámsterdam, 2007.