

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA CÁMARA DE FLUJO CONTROLADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DEFORMABILIDAD Y LA ENERGÍA DE ADHESIÓN ERITROCITARIA.

Londero Carolina M.^{A,B}

^AFacultad Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura FCEIA-UNR

^BFacultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia FBIOyF-UNR

Área: Física

Sub-Área: Física óptica aplicada a la biología

Grupo: Y

Palabras clave: eritrocitos, deformación, energía de adhesión.

INTRODUCCIÓN

El glóbulo rojo (GR), eritrocito o hematíe, cumple la función de proteger y transportar la hemoglobina para que ésta pueda efectuar la oxigenación de los tejidos. Es una célula cuyo núcleo y estructuras citoplasmáticas han sido sustituidos por una solución muy concentrada de hemoglobina que mantiene reducido el metabolismo. La forma de un GR normal en condiciones estáticas es la de disco bicóncavo, denominado discocito, como resultado del equilibrio entre las fuerzas internas y externas que actúan sobre su membrana, además de la falta de núcleo (Mehta, 1983). Esta forma le otorga las propiedades mecánicas características: *resistencia a las fuerzas de cizallamiento* en los grandes vasos, y *deformabilidad elástica*, en circulación dentro de los capilares. La membrana eritrocitaria (ME) se aproxima con un modelo simple que combina una componente *elástica*, formada por el citoesqueleto (red de proteínas retráctiles), y una *fluida* (la bicapa lipídica). Las fuertes interacciones entre éstas componentes le confieren al GR sus características esencialmente viscoelásticas (Chien y col., 1978). Cuando se aplican tensiones externas pequeñas en cortos intervalos de tiempo, el comportamiento reológico viscoelástico de la membrana del GR le permite deformarse disipando energía interna. Este proceso resulta ser reversible y ocurre sin variación de área superficial total ni de volumen. La restricción de variación volumétrica surge de la impermeabilidad de la membrana eritrocitaria a los cationes (aunque la membrana es altamente permeable al agua, la incapacidad de las sales para atravesarla logra evitar pérdidas significativas de agua a fin de mantener el equilibrio osmótico). Por otro lado, la restricción en área superficial es consecuencia de la gran resistencia de las membranas biológicas a cambios en el área por molécula. Estas dos restricciones son las condiciones que establecen los estrictos límites en los tipos de deformaciones que pueden sufrir estas células y en el tamaño de la abertura que la célula puede atravesar (Waugh et al, 1995; Chasis et al, 1989). Entonces, la deformabilidad es una propiedad crucial para que la célula pueda atravesar los microcapilares y adoptar formas hidrodinámicas en circulación. Cualquier alteración de la misma dará lugar a problemas en la oxigenación celular. Además, es uno de los factores principales de supervivencia de los GR, pues los que no poseen la capacidad de deformarse adecuadamente son retenidos en el bazo para luego ser destruidos.

Proyecto: Proyectos de Innovación Tecnológica 2015 - Fundación Banco Santa Fe

Director del proyecto: D'Arrigo Mabel

Co-Director del proyecto: Riquelme, Bibiana

Durante el flujo sanguíneo, el eritrocito adopta una forma hidrodinámica en la dirección del flujo, es decir, cambia su forma de discoidal a elipsoidal (posee menor resistencia a la circulación) a medida que los valores de tensiones aplicadas aumentan.

Existen varias técnicas que permiten medir parámetros de deformabilidad y viscoelasticidad eritrocitaria (Riquelme, 1997), pero los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas resultan difíciles de comparar, pues cada una posee maneras diversas de manipular las células y de aplicar las tensiones con magnitudes variables (Chien, 1997). Además, en cada método difiere la influencia que los diversos factores (forma, medio interno y membrana) tienen en la deformabilidad, no permitiendo entonces discernir qué factor introduce la alteración en la misma (Riquelme, 1997).

Un modo de medir deformaciones es bajo un flujo laminar controlado, aplicando tensiones de corte a GR inmovilizados dentro de un microcanal rectangular y determinar las elongaciones resultantes del cizallamiento creado por el flujo de líquido, mediante microfotografía (Hochmuth y col., 1973).

En trabajos previos (D'Arrigo y col., 2000 y 2009) se utilizó una cámara de adhesión de flujo controlado diseñada y construida *ad hoc*, sobre la base de la cámara propuesta por Hochmuth y col., para determinar la energía específica del receptor de hialuronato eritrocitario (CD44) a su ligando bajo condiciones de flujo. A su vez, fue utilizada para determinar la energía de unión entre dos glóbulos rojos adheridos mediante anticuerpos monoclonales anti-A (Danieli 2005) y para determinar el índice de deformabilidad de los eritrocitos bajo dos situaciones diferentes de adhesión (Danieli y col., 2008 y 2009). El presente trabajo es una continuación de este último.

METODOLOGÍA

Deformabilidad

Como se expresó anteriormente, se asume que una célula deformada toma la forma de elipsoide de revolución y por lo tanto, vista desde arriba en el microscopio, la de una elipse. Puesto que el proceso de deformación ocurre bajo las restricciones de volumen celular y área superficial constantes, la forma celular puede ser descrita por un único parámetro que refleje la relación entre los ejes mayor y menor de la elipse. Éste es el *índice de deformabilidad eritrocitaria (IDE)*, definido mediante la **Ecuación 1** (Danieli y col., 2008).

$$IDE = \frac{L-l}{L+l} \quad (1)$$

Donde L es la longitud del eje mayor y l es la del eje menor. El IDE depende de la tensión de corte σ aplicada sobre la célula adherida. La cual se determina a partir de la **Ecuación 2**, considerando el espesor h , el ancho a de la cámara de flujo, el caudal Q y la viscosidad del medio de suspensión η_0 .

$$\sigma = \frac{6 \cdot Q \cdot \eta_0}{h^2 \cdot a} \quad (2)$$

Por el modo en el que se aplica la tensión de corte, se puede concluir que a mayor σ aplicada, mayor es la diferencia entre los valores de L y l , por lo tanto, mayor será el IDE . Vale aclarar que para una célula en reposo (sin deformar) los valores de L y l son similares (por la forma de discocito de un GR normal), siendo entonces la imagen de la célula aquella aproximada a una circunferencia, por lo que el IDE tiende a 0.

Materiales Biológicos

Se utilizaron muestras de sangre obtenida por punción venosa, anticoagulada con EDTA de individuos sanos siguiendo los protocolos del Comité de Bioética de la FCByF UNR, para lo cual se les hizo firmar el consentimiento informado previa la

extracción. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 461 g (25x100 rpm), se descartó la capa leucoplaquetaria. El plasma y el paquete globular se almacenaron en diferentes tubos de plástico para su posterior utilización de acuerdo con el *International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods* (2009).

Los GR en ausencia de las proteínas plasmáticas (en este caso fueron centrifugados), además de adherirse al vidrio se crenan (es decir, se generan finas espículas, numerosas y uniformes distribuidas en su membrana celular). El efecto de crenación puede evitarse suspendiendo los eritrocitos en solución fisiológica o buffer fosfato salino con albúmina en concentraciones similares a las encontradas en plasma (Ponder, 1948). La albúmina tiene el rol de estabilizar los GR y, asimismo, evitar que se altere su morfología (es decir, que se crenen), sin modificar las propiedades físico-químicas de los GR. Es por esto que para la realización de la suspensión de GR se utilizó albúmina sérica humana (HSA) 20% v/v de *Laboratorio de Hemoderivados UNC* en solución fisiológica (SF) de *Laboratorios Roux-Ocefa S.A.*

Cámara de adhesión

La cámara de adhesión es un prisma de acrílico transparente con espesor de 12mm y dimensiones 67mm x 43mm, construida a partir de la propuesta por Hochmuth y col. (1973), como se ve en la **Figura 1 a)**. La cámara posee un canal que rodea su perímetro y esta conectado a una salida a la mitad de su largo, la cual se conecta a una bomba de vacío. Asimismo posee dos salidas rectangulares verticales en sus laterales para la entrada y salida del fluido (suspensión de GR). La entrada está conectada a una bomba de infusión y la salida a un descarte.

Sobre este prisma se coloca una membrana de teflón de 0.25mm de espesor, **Figura 1 b)**, que posee un corte rectangular de 45mm x 18mm, el cual constituye el canal de flujo (de igual espesor que la lámina). Ésta membrana posee orificios de 2.5mm de diámetro que quedan alineados con el conducto que rodea el perímetro del prisma, cuya función es establecer una comunicación entre el conducto y el portaobjetos, con el fin que la bomba de vacío genere el canal de flujo hermético entre el

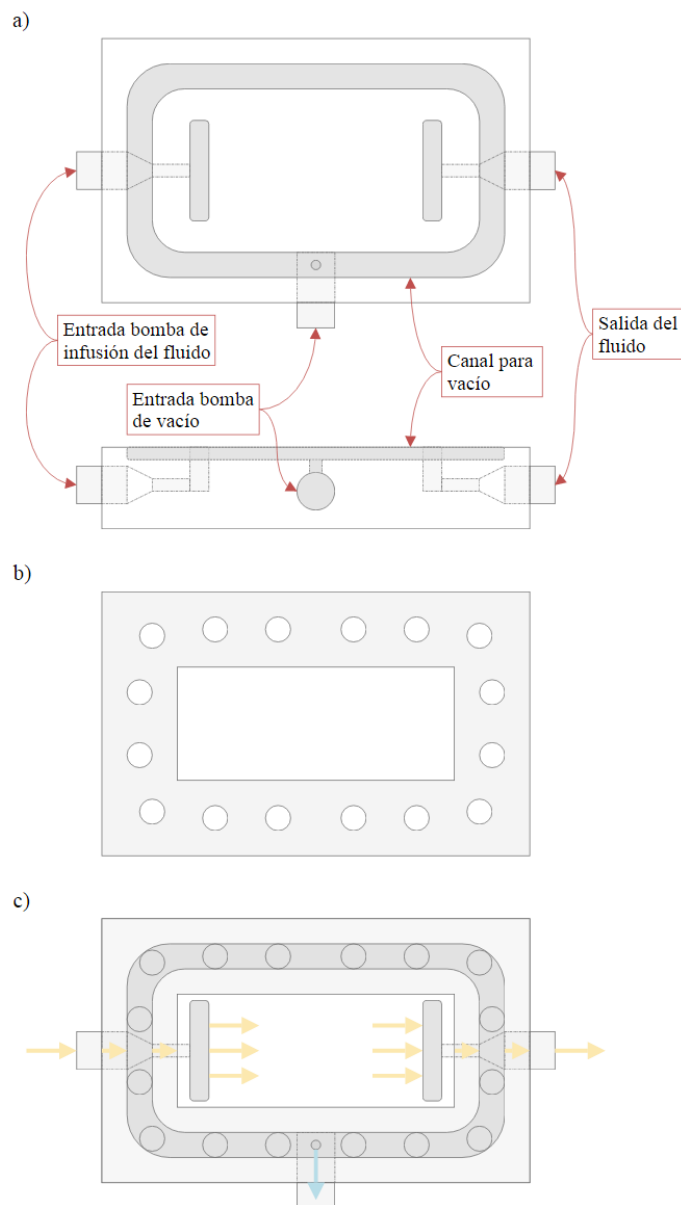


Figura 1: Diagrama de: a) la cámara de adhesión con sus conectores en vista superior y lateral, b) la membrana de teflón, y c) la cámara con membrana y portaobjetos.

acrílico y el portaobjetos que se coloca sobre esta membrana, ver **Figura 1 c**). Estos tres componentes (prisma de acrílico, membrana y portaobjetos) se colocan en el microscopio óptico invertido que posee una cámara *Mikoba 300 CMOS 3.0* conectada a una PC que comanda la captura y el procesamiento de las imágenes digitales a través del programa *IS Capture 3.0*.

Mediciones

La tensión de corte aplicada en el canal rectangular de la cámara de flujo (σ , en *Pa*), definida en un régimen laminar, está dada por la **Ecuación 1**. La altura del mismo es $h = (0,025 \pm 0,005) \text{ cm}$ y el ancho es $a = (1,800 \pm 0,005) \text{ cm}$, ambos medidos con un calibre. La viscosidad fue determinada en un viscosímetro cono-placa *Brookfield DV-II*, y el valor obtenido para todas las soluciones es $\eta_0 = (8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ Pa} \cdot \text{s}$. En cuanto al caudal, Q , es determinado por la bomba de infusión y es el parámetro que se varía para obtener los diversos valores de σ con la **Ecuación 2**.

Para los valores de *IDE*, se determinaron las longitudes que adquiere el eje mayor, L_i , y el menor, l_i , de la elipse en la que se deforma el glóbulo rojo, como se muestra en la **Figura 2**.

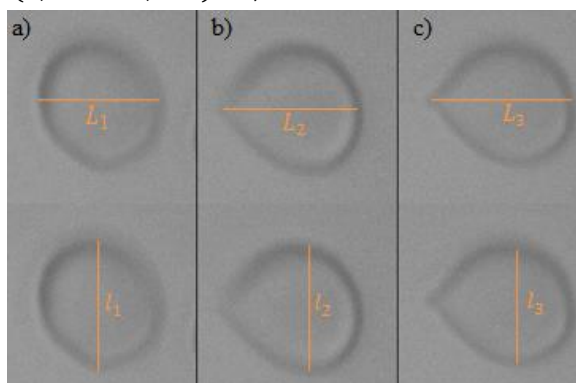


Figura 2: Determinación el eje mayor y menor para diversas tensiones de corte aplicadas:
a) $\sigma = 0 \text{ Pa}$, b) $\sigma = 5 \text{ Pa}$ y c) $\sigma = 25 \text{ Pa}$.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chasis J.A., Schrier S.L.**, 1989. Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. *Blood*, 74 (7), 2562-2568.
- Chien S., Sung K., Skalak R., Usami S., Tözere A.**, 1978. Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane. *Biophys J*, 24, 463-487.
- Chien S., Sung L.A., Kim S., Burke A. M., Usami S.**, 1997. Determination of aggregation force in rouleaux by fluid mechanical technique. *Microvasc Res*, 13(3), 327-333.
- D'Arrigo M.**, 2000. Incidencia de la relación estructura - Función del sistema de grupo sanguíneo MN y del receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria. Tesis Doctoral, FBIOyF, UNR.
- D'Arrigo M., Riquelme B., Valverde J., Foresto P.**, 2009. Análisis de la energía de adhesión intercambiada en la unión CD44-hialuronato. *e-Universitas UNR J*, 1 (2), 305-315.
- Danieli V.**, 2005. Estudio de la adhesión eritrocitaria mediada por anticuerpos mediante el procesamiento digital de imágenes. Tesina de Licenciatura en Biotecnología, FBIOyF, UNR.
- Danieli V., D'Arrigo M., Riquelme B.**, 2008. Análisis de la deformabilidad de células adheridas por medio del procesamiento digital de imágenes. *Anales Asoc. Física Arg.*, 20, 224-227.
- Danieli V., D'Arrigo M., Riquelme B.**, 2009. Deformability of adhered cells study by means of digital microscopic images. *Acta Microsc*, 18 (3), 261-268.
- Hochmuth R.M., Mohandas N., Blackshe P.I.**, 1973. Measurement of elastic-modulus for red-cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J*, 13, 747-762.
- International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods**, 2009. New guidelines for hemorheological laboratory techniques", *Clin Hemorheol Micro*, 42, 75-97.
- Mehta N.G.**, 1983. Role of membrane integral proteins in the modulation of red cell shape by albumin, dinitrophenol and the glass effect. *Biochim Biophys Acta*, 762, 9-18.
- Ponder E.**, 1948. Hemolysis and Related Phenomena. Grune and Stratton, 10-49.
- Riquelme B.**, 1997. Reología compleja de biomembranas. Aplicación a eritrocitos humanos. Tesis Doctoral, FCEIA, UNR.
- Waugh R., Hochmuth R.**, 1995. Mechanics and Deformability of Hematocytes, *The Biomedical Engineering Handbook*, 35, 474-486.