

## ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE AGREGACIÓN ERITROCITARIA EN PACIENTES DIABÉTICOS PEDIÁTRICOS

**Canetti, Virginia**

*Facultad de Ciencias Médicas  
Directora: Reus, Verónica  
Codirectora: Sosa, Mónica*

**Área: Ciencias de la Salud**

### INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un déficit parcial o total de insulina, que produce como consecuencia una situación de hiperglucemia. La DM se presenta con numerosos parámetros hemorreológicos alterados. Entre éstos se encuentran el hematocrito, los niveles de proteínas plasmáticas, la agregación eritrocitaria y la deformabilidad de glóbulos rojos. Cuando estas variables se alteran de forma tal que producen un aumento en la viscosidad plasmática y sanguínea, se genera una elevada resistencia al flujo vascular, lo que incrementa las probabilidades de producir complicaciones microvasculares que ocurren en la DM, tales como microangiopatía, nefropatía y retinopatía.

Puntualmente en este estudio se analiza la agregación eritrocitaria, un parámetro fundamental en las propiedades reológicas de la sangre. Es un fenómeno fisiopatológico reversible en el cual, in vivo e in vitro, en presencia de macromoléculas plasmáticas, se forman apilados lineales de glóbulos rojos como “pilas de monedas” conocidos como rouleaux. Esta agregación eritrocitaria depende del balance entre fuerzas agregantes y desagregantes. Entre las primeras se encuentran la adsorción de macromoléculas plasmáticas como el fibrinógeno y la formación de puentes intercelulares entre eritrocitos. Entre las segundas, las fuerzas de cizallamiento mecánico, la repulsión electrostática, entre otros. La agregación eritrocitaria aumentada ocurre cuando este balance se rompe.

La agregación excesiva es una característica prominente en pacientes con diabéticos (Foresto et al. 2009), sobre todo en aquellos con pobre control glucémico. Estos agregados no pueden atravesar los capilares sanguíneos, causando las complicaciones vasculares anteriormente mencionadas.

La diabetes mellitus conlleva una importante carga social y económica ya que el número de pacientes afectados crece a un ritmo exponencial. En todo el mundo existen más de 500.000 niños y niñas con diabetes, el 90% de ellos sufre diabetes tipo 1. Se calcula que cada año, otros 86.000 niños en el mundo desarrollarán este tipo de diabetes. (International Diabetes Federation, 2015). Sin embargo, la diabetes tipo 2 también está comenzando a aumentar su prevalencia, afectando de igual forma a los países desarrollados y en vías de desarrollo, y se está convirtiendo en un problema de salud pública muy preocupante.

Si bien diversos estudios demuestran la presencia de alteraciones hemorreológicas en niños diabéticos (Linderkamp, Ruef, Zilow & Hoffmann, 1999), existen también resultados contradictorios, por lo que se propone este estudio para colaborar en la interpretación

Título del proyecto: “Diabetes Mellitus: Problemas y desafíos actuales, aspectos clínicos y fisiopatológicos”

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Carrera, Larisa.

fisiopatológica de las alteraciones microvasculares en pacientes diabéticos. Además no se han evidenciado aún estudios que caractericen el patrón de agregación eritrocitaria en estos niños, proporcionando datos objetivos mediante la microscopía, con los que se puede interpretar eficientemente la información que aparece en las imágenes.

## OBJETIVOS

Analizar y cuantificar la presencia y el patrón de agregación eritrocitaria en un grupo de niños con diabetes que asiste al Hospital de Niños de Santa Fe “Dr. Orlando Alassia”. Obtener datos bioquímicos en el marco del control y seguimiento que se soliciten en estos pacientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, transversal. Para caracterizar el patrón de agregación eritrocitaria se utilizaron muestras de sangre anticoaguladas con EDTA/Na<sub>2</sub> de controles rutinarios de 14 niños entre 1 y 18 años diabéticos tipo 1 (n= 11) y tipo 2 (n=3), sin ninguna otra patología. Las muestras de sangre fueron procesadas dentro de las 6 hs de su extracción. Se centrifugaron durante 5 minutos en microcentrífuga a temperatura ambiente. Se preparó una dilución de glóbulos rojos al 0,5% en plasma autólogo y 30  $\mu$ l de ésta se colocaron en un portaobjetos excavado según el protocolo de Fontana et al. Después de 5 minutos de reposo se estudió la agregación eritrocitaria por observación microscópica de los agregados con objetivo 40x y posterior captura de imágenes. Se registraron imágenes por quintuplicado y fueron almacenadas en un archivo de computadora para ser analizadas digitalmente.

## RESULTADOS

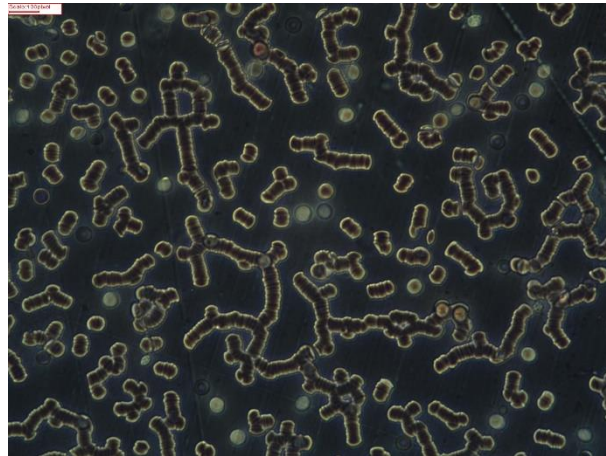
Las siguientes características fueron evaluadas: edad  $12,6 \pm 4,6$  años; tiempo de evolución de la enfermedad  $32,8 \pm 22,2$  meses; índice de masa corporal (IMC)  $23,3 \pm 6,5$ ; control metabólico correcto (hemoglobina glicosilada, HbA1c < 7,5%) 4 pacientes.

Se aplicó un método de segmentación y clasificación de los agregados, coloreados en imagen 2 de acuerdo a su forma y tamaño: eritrocitos aislados (amarillo), agregados de 2-4 eritrocitos (verde), rouleaux de  $\geq 5$  eritrocitos (celeste), cluster o amas con forma esférica (violeta) y amas con tendencia a red (rojo).

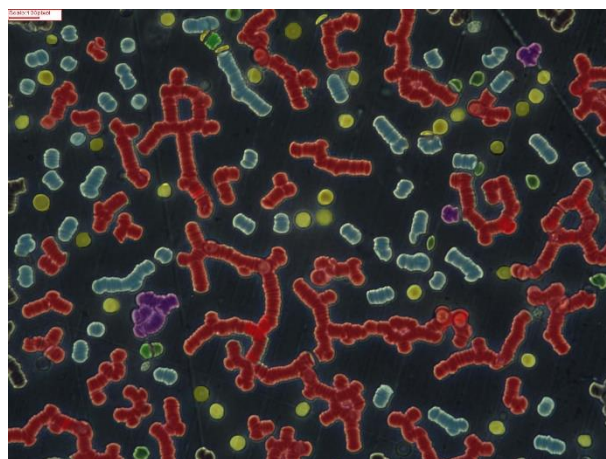
Según el gráfico 1, los niños diabéticos pediátricos forman amas con tendencia a red, irregulares, en mayor proporción que clusters.

En cuanto a los valores bioquímicos obtenidos, los niños diabéticos presentan valores de glucemia en ayunas de  $2,04 \pm 1,13$  mg/dL; HbA1c de  $8,95 \pm 2,91\%$ ; colesterol total  $176,2 \pm 37,5$  mg/dL y triglicéridos  $155,14 \pm 151$  mg/dL. El 71,4% de los pacientes diabéticos presenta un mal control metabólico, definido por una HbA1c  $\geq 7,5\%$ .

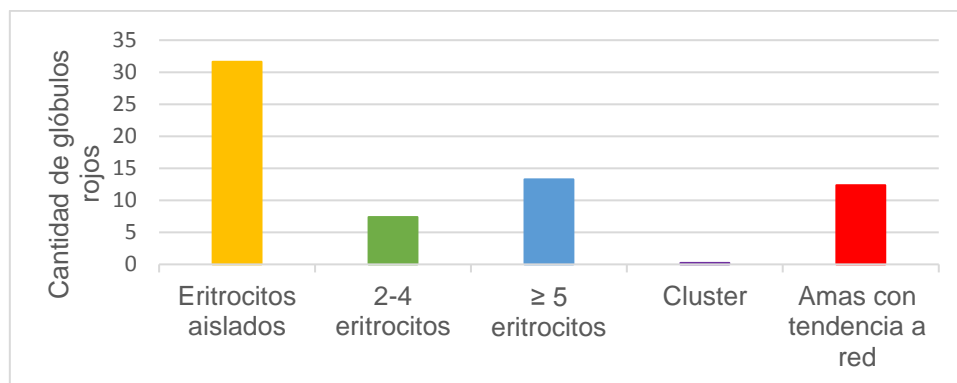
Los niños diabéticos presentan ya un trastorno marcado en la microcirculación evidenciado por un patrón alterado de agregación eritrocitaria (Imagen 1). Además se observa que se genera un patrón de agregación que difiere al que se presenta en adultos diabéticos.



**Imagen 1.** Patrón de agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos pediátricos



**Imagen 2.** Análisis de la distribución del tamaño de los agregados eritrocitarios



**Gráfico 1.** Distribución en función del tamaño de la agregación

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio contribuyen así a comprender las alteraciones hemorreológicas en pacientes diabéticos pediátricos. Con este trabajo se logró identificar objetivamente el patrón de agregación eritrocitaria que presentan niños diabéticos, mediante la obtención de imágenes microscópicas, lo que resulta en un aporte sustancial para futuras posibles aplicaciones clínicas.

Este prototipo de análisis de imágenes microscópicas de agregados de eritrocitos proporciona resultados satisfactorios, es rápido, eficiente y económico, posibilitando su aplicación clínica e intervención precoz en pacientes diabéticos.

## BIBLIOGRAFÍA

**Cho, Y. I., Mooney, M. P., Cho, D. J.**, 2008. Hemorheological Disorders in Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2(6), 1130–1138.

**Federación Internacional de Diabetes**, 2015. Atlas de Diabetes 7<sup>o</sup> edición. Bruselas, Bélgica.

**Fontana, A. B., Lerda, N., Delannoy, M. M., Alessi, A. C., Riquelme, B. D.**, 2012. Técnica de cuantificación de la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes. *Acta Bioquim. Clín. Latinoam.*, 46(1), 47-52.

**Foresto, P., D'Arrigo, M., Carrera, L., Cuezco, R. E., Valverde, J., Rasia, R.**, 2000. Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes by computerized image analysis. *Medicina*. 60(5), 580-572.

**Koscielny, J., Latza, R., Wolf, S., Kiesewetter, H., Jung, F.**, 1998. Early rheological and microcirculatory changes in children with type I diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 19(2), 139-150.

**Lebensohn, N., Re, A., Carrera, L., Barberena, L., D'Arrigo, M., Foresto, P.**, 2009. Ácido siálico sérico, carga aniónica y agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. *Medicina*, 69(3), 331-334.

**Linderkamp, O., Ruef, P., Zilow, E. P., Hoffmann, G. F.**, 1999. Impaired deformability of erythrocytes and neutrophils in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetología*, 42(7), 865-869.

**Menichini, P., Larese, M., Riquelme, B.**, 2015. Automatic analysis of microscopic images of red blood cell aggregates. *Biophotonics South America*.

**Moggi, L.**, 2011. Hemorreología y microcirculación. *Rev Argent Anestesiol.*, 69(1), 61-84.

**Singh, M., Shin, S.**, 2009. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: A brief review. *Indian J Exp Biol.*, 47(1), 7-15.

**Ziegler, O., Guerci, B., Muller, S., Candiloros, H., Mèjean, L., Donner, M., Stoltz, J. F., Drouin, P.**, 1994. Increased erythrocyte aggregation in insulin-dependent diabetes mellitus and its relationship to plasma factors: A multivariate analysis. *Metabolism*, 43(9), 1182-1186.