

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE LA CARGA SUPERFICIAL ERITROCITARIA MEDIANTE LA TÉCNICA DE RETRODIFUSIÓN LÁSER

STUDY OF TRYPSIN EFFECT ON THE ERYTHROCYTE SURFACE CHARGE USING LASER BACKSCATTERING TECHNIQUE

G. Del Balzo, M. Delannoy, A. Fontana, M. D'Arrigo, B. Riquelme*

Área Física - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, (UNR)
 Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR)
E-mail: riquelme@ifir-conicet.gov.ar, gonzalodelbalzo@hotmail.com

Se estudió la alteración en la carga superficial de los glóbulos rojos humanos (GR) debido a la acción de la tripsina en diferentes concentraciones, lo que induce una modificación en la agregación eritrocitaria. Se analizó la cinética de agregación y desagregación de los GR utilizando el Eritroagregámetro, que se basa en la técnica de retrodifusión láser, donde la señal registrada es inversamente proporcional al tamaño de los agregados celulares. Los resultados de estas determinaciones fueron relacionados con los valores de carga aniónica eritrocitaria (CAE) obtenidos por la técnica espectrofotométrica. Además, se analizaron las posibles alteraciones de los parámetros viscoelásticos de los GR utilizando el Eritrodeformetro, en régimen estacionario (índice de deformabilidad, viscosidad superficial de membrana y módulo elástico) y en régimen dinámico (pérdida dinámica, módulo de almacenamiento y viscosidad compleja). Se realizó el respectivo análisis estadístico de los resultados para evaluar las diferencias significativas con respecto al grupo control. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de las alteraciones reológicas encontradas en la hipertensión arterial mediante la modelización in vitro de la disminución de la carga superficial por el tratamiento con tripsina.

Palabras Claves: retrodifusión láser, agregación eritrocitaria, hipertensión, reología.

We studied the change in surface charge of human red blood cells (RBCs) due to the action of trypsin at different concentrations, which induces an altered erythrocyte aggregation. We analyzed the kinetics of RBC aggregation and disaggregation using the Erythroaggegometer, which is based on laser backscattering technique where the recorded signal is inversely proportional to the size of cell clusters. The results of these findings were related to the values of erythrocyte anionic charge (EAC), obtained by spectrophotometric technique. In addition, we analyzed the possible alterations of the viscoelastic parameters of the RBCs using an Erythrodeformeter in steady regime (deformability index, surface membrane viscosity and elastic modulus) and dynamic regime (dynamic loss, storage modulus and complex viscosity). We performed statistical analysis of the respective results to evaluate significant differences in the control group. Our results contribute to the understanding of rheological alterations found in hypertension by in vitro modeling of the surface charge reduction by trypsin treatment.

Keywords: laser backscattering, erythrocyte aggregation, hypertension, rheology.

Recibido 28/02/11; aprobado 01/08/11

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

I. INTRODUCCIÓN

En la hipertensión arterial (HTA) se observan alteraciones en la capacidad de agregación y desagregación de los glóbulos rojos (GR) que genera perturbaciones en la microcirculación y aumenta el riesgo de accidentes cardiovasculares en el paciente hipertenso¹⁻². Además se ha observado que los GR tienen una menor deformabilidad y existe una mayor interacción entre ellos, que determina la formación de agregados anómalos o clusters³.

El ácido siálico, responsable de la carga negativa distribuida sobre la membrana celular, constituye uno de los componentes terminales de las glicoforinas, contribuyendo significativamente a las propiedades estructurales de estas moléculas. Cualquier disminución del contenido de ácido siálico en la membrana implica una disminución de la repulsión electrostática intercelular normal, favoreciendo consecuentemente la agregación eritrocitaria. Se puede observar entonces, un aumento de la viscosidad sanguínea que perturba la microcirculación⁴. Por otra parte, la disminución del contenido de ácido siálico también incrementa la interacción eritrocitaria con el endotelio vascular⁵⁻⁶.

Numerosos trabajos demuestran que existe una relación entre el contenido de ácido siálico sérico y el desarrollo de complicaciones en enfermedades cardiovasculares (ECV), considerándolo un marcador de riesgo cardiovascular y predictor a largo plazo de ECV⁷⁻⁸.

El objetivo de este trabajo fue medir *in vitro* la disminución de carga superficial eritrocitaria debido a la acción enzimática por digestión con tripsina y analizar su incidencia en el mecanismo de interacción intercelular (agregación), modelizando lo que ocurre en la HTA.

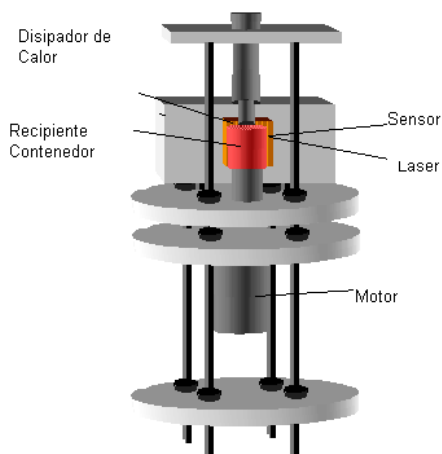


Figura 1. Esquema del Eritroagregámetro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Suspensión de GR

Las muestras de sangre provenientes de donadores sanos, fueron recolectadas en recipientes estériles conteniendo EDTA como anticoagulante. Los GR fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) de pH = 7,4 y osmolaridad = 295 mOsmol/kg.

II.2 Tratamiento enzimático

Se prepararon soluciones de tripsina (Sigma Lot. 70H0439) en PBS a las concentraciones 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/mL.

II.3 Determinación de la carga aniónica eritrocitaria

Se determinó el porcentaje de la carga aniónica eritrocitaria (%CAE) por espectrofotometría empleando el ensayo de unión al Alcian Blue 8GX (A5268). Este colorante catiónico tiene la particularidad de unirse por fuerzas electrostáticas a células que poseen carga negativa en su superficie, debido a la presencia de macromoléculas aniónicas. Por lo tanto una reducida unión del Alcian Blue con los GR se considera una medida indirecta de la disminución de la densidad de carga negativa sobre su superficie.

El porcentaje de Alcian blue unido a los GR se determinó como la diferencia entre la absorbancia en el sobrenadante y un control sin GR (100% Alcian blue), para poder así obtener los valores del % CAE.

II.4 Evaluación de la agregación eritrocitaria

Se evaluó la agregación eritrocitaria por la técnica de retrodifusión láser utilizando el Eritroagregámetro⁹ el cual permite estudiar el proceso de agregación y desagregación eritrocitaria. La señal de retrodifusión láser medida es inversamente proporcional al tamaño de los agregados y aumenta con las velocidades de corte empleadas, ya que los agregados se van disgregando y haciéndose cada vez más pequeños. Cuando finalmente se alcanza la disociación total de los agregados, la retrodifusión es máxima e independiente de la velocidad de corte.

En la Figura 1 se muestra un esquema del Eritroagregámetro donde se pueden observar los elementos que lo componen.

II.5 Evaluación de la viscoelasticidad eritrocitaria

Con el Eritrodefórmetro se determinaron los parámetros reológicos de la membrana eritrocitaria en régimen estacionario (**ID**: Índice de Deformabilidad, η_m : viscosidad superficial de membrana, μ_m : módulo elástico eritrocitario) y en régimen dinámico (**G''**: pérdida dinámica; **G'**: módulo de almacenamiento; η' : componente viscosa de la viscosidad compleja; η'' : componente elástica de la viscosidad compleja).

Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y dentro de las 48 horas de obtenida la muestra.

Se realizó el respectivo análisis estadístico de los resultados para evaluar las diferencias significativas con respecto al control.

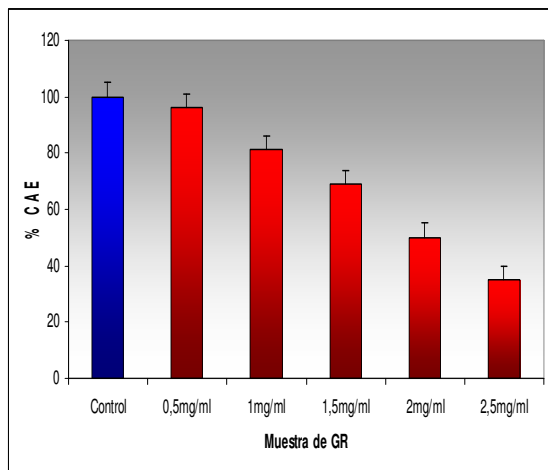


Figura 2: % de Carga Aniónica Eritrocitaria (%CAE) para la muestra control y las de GR tratadas con las distintas concentraciones de tripsina.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 2 se presentan los porcentajes de la carga aniónica eritrocitaria (% CAE) correspondiente a las muestras tratadas y al control. Los valores promedio de % CAE de glóbulos rojos tratados con soluciones de tripsina, han sido evaluados sobre un n= 8. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación al control en % CAE a medida que aumenta la concentración de tripsina.

En la Figura 3 se muestran los tiempos para alcanzar el 50% de agregación correspondientes a los valores medios correspondiente a 8 muestras de $t_{50\%}$ para los GR tratados con las soluciones de tripsina.

Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación al control en el tiempo para el 50% de agregación en los glóbulos rojos tratados con tripsina. Estas alteraciones son

mayores al aumentar la concentración de tripsina

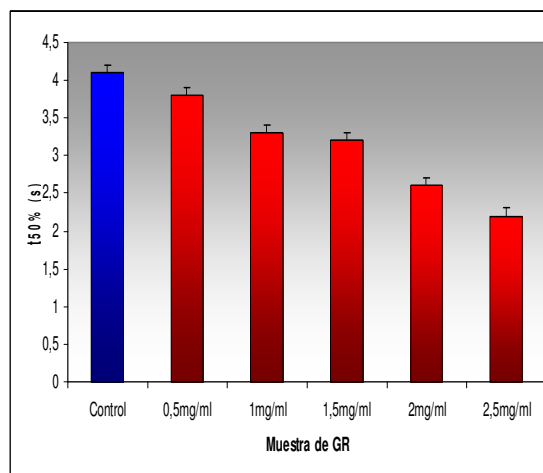


Figura 3: Valores medios de $t_{50\%}$ para la muestra control y las de GR tratadas con las distintas concentraciones de tripsina.

Los resultados de los parámetros viscoelásticos de los GR tratados con soluciones de tripsina se presentan en las tablas 1 y 2. Los valores presentados corresponden a la media \pm SD de 8 muestras de GR.

TABLA 1: PARÁMETROS REOLÓGICOS EN RÉGIMEN ESTACIONARIO DE LOS GR TRATADOS CON SOLUCIONES DE TRIPSINA

Cc. de Tripsina mg/mL	Régimen estacionario		
	ID	μ 10 ⁻³ dina/cm	η_m 10 ⁻⁴ dina.s/cm
0,0	0,56 \pm 0,02	6,9 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3
0,5	0,56 \pm 0,02	6,9 \pm 0,5	3,2 \pm 0,6
1,0	0,56 \pm 0,03	6,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,5
1,5	0,57 \pm 0,04	6,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,3
2,0	0,56 \pm 0,02	5,4 \pm 0,8	2,5 \pm 0,5
2,5	0,57 \pm 0,04	5,4 \pm 0,8	2,2 \pm 0,6

Los resultados indican que el ID se mantiene constante ($p > 0.90$), pero el módulo elástico y la viscosidad superficial de membrana disminuyen levemente en los glóbulos rojos tratados con soluciones de tripsina con respecto a los sin tratar.

En los resultados presentados en la Tabla 2, no se observan diferencias significativas ($p > 0.90$) en los parámetros viscoelásticos en régimen dinámico de los GR tratados en relación con los sin tratar.

TABLA 2: PARÁMETROS REOLÓGICOS EN RÉGIMEN DINÁMICO DE LA MEMBRANA DE LOS GR SIN TRATAR Y TRATADOS CON SOLUCIONES DE TRIPSINA

Cc. Trip mg/mL	Régimen dinámico							
	G'/μ		G''/μ		η'/μ		η''/μ	
	0,5 Hz	1 Hz	0,5 Hz	1 Hz	0,5 Hz	1 Hz	0,5 Hz	1 Hz
0	0,99 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,055 ± 0,001	0,064 ± 0,001	0,31 ± 0,01	0,15 ± 0,01
0,5	0,97 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,43 ± 0,06	0,071 ± 0,001	0,068 ± 0,010	0,31 ± 0,01	0,14 ± 0,01
1	0,97 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,42 ± 0,03	0,069 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,30 ± 0,01	0,13 ± 0,01
1,5	0,98 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,068 ± 0,001	0,064 ± 0,001	0,31 ± 0,02	0,14 ± 0,01
2	0,99 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,070 ± 0,001	0,065 ± 0,001	0,30 ± 0,02	0,13 ± 0,01
2,5	0,98 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,055 ± 0,003	0,070 ± 0,001	0,31 ± 0,01	0,14 ± 0,01

IV. CONCLUSIONES

Por medio de técnicas exploratorias de datos se realizó un estudio comparativo de los valores de los parámetros hemorreológicos de agregación y viscoelasticidad de los GR control con los alterados por el tratamiento *in vitro* con tripsina.

Los resultados indicarían que las alteraciones en los componentes de membrana de los eritrocitos, por el tratamiento enzimático que tiene como efecto una reducción en la carga superficial eritrocitaria, podrían relacionarse con las alteraciones intrínsecas presentes en los GR de pacientes hipertensos, lo cual demuestra la importancia de los componentes de la membrana eritrocitaria en el fenómeno de interacción celular que juega un papel crucial a nivel microcirculatorio, aumentando la probabilidad de que los hematíes se agreguen.

Este trabajo presenta un estudio interdisciplinario para evaluar, modelizar y comprender las posibles alteraciones en la carga eléctrica superficial de la membrana eritrocitaria en patologías vasculares como la HTA.

Referencias

- 1- Riquelme B, Foresto P, D'Arrigo M, Filippini F, Valverde J. Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. Clin. Hemorheol. Microcirc. 35(1-2), 277-281, (2006).
- 2- Lebensohnl N., D'Arrigo M., Re A, Filippini F., Carrera L., Valverde J., Foresto P. Ácido siálico sérico y carga aniónica Eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. Posible impacto hemorreológico Revista Bioquímica y Patología Clínica., 72: 17-20, (2008).

- 3- Ajmani R. Hypertension and Hemorheology. Clin Hemorheol Microcirc 17:397-420, (1997).
- 4- Foresto P., D'Arrigo M., Filippini F., Gallo R., Valverde J. Rasia R. Estudio de parámetros hemorreológicos en hipertensión esencial Rev. Fed. Arg. Cardiología, 31: 69-73. 0326-646X, (2002).
- 5- Kelm S., Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interaction. Int Rev Cytol, 175: 137-240, (1997)
- 6- Agosti R, D'Ettore M, Cherubini P. New aspects of erythrocyte aggregation. Clin Hemorheol; 8:603-10, (1988).
- 7- Lindbreg G., Eklund GA., Gullberg B., Rastam L. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. Br Med J; 302: 143-6, (1991).
- 8- Knuiman MW, Watts GF, Divitini ML. Is sialic acid an independent risk factor for cardiovascular disease? A 17- year follow up study in Busselton, Western Australia. Ann Epidemiol; 14: 627-3, (2004).
- 9- Altube L., Marenzana A., Valverde J., Calviño G., Foresto P., Riquelme B. Equipo automatizado para el estudio de la disociación de aglutinados celulares. Anales AFA; 17: 318-320, (2005).