

ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE AGENTES ANESTÉSICOS EN LOS PARÁMETROS REOLÓGICOS DE ERITROCITOS GLICADOS

A PRELIMINARY STUDY OF THE EFFECT OF ANESTHETIC AGENTS ON THE RHEOLOGICAL PARAMETERS OF GLYCATED ERYTHROCYTES

M. V. Batista da Silva¹, H. Castellini², N. A. Alet^{3,4}, B. Riquelme^{*1,5} y A. I. Alet¹

¹Área Física, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) - Rosario, Argentina.

²Departamento de Física, FCEIA (UNR) - Rosario, Argentina.

³Facultad de Cs. Médicas (UNR) - Rosario, Argentina.

⁴Hospital de Emergencias Clemente Álvarez (HECA) - Rosario, Argentina.

⁵Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR) - Rosario, Argentina.

Recibido: 01/07/2020 ; Aceptado: 15/07/2020

Este trabajo presenta un estudio preliminar de los efectos de los anestésicos *propofol*, *remifentanilo* y *bromuro de vecuronio* sobre las propiedades reológicas de eritrocitos glicados *in vitro*, modelizando la glicación por hiperglucemia observada en la diabetes. Se determinaron los parámetros viscoelásticos y de cinética de agregación de los eritrocitos utilizando un reómetro eritrocitario y un agregómetro de chip óptico desarrollados en nuestro laboratorio. Los resultados mostraron alteraciones significativas en la viscosidad superficial de membrana, el módulo elástico y el índice de deformabilidad eritrocitaria para los distintos anestésicos estudiados. También los parámetros de cinética de agregación mostraron diferente tipo de alteraciones por efecto de los anestésicos. Este estudio preliminar sugiere que el uso de estos anestésicos en pacientes diabéticos podría inducir alteraciones hemorreológicas que perturben la microcirculación. Por tal motivo, se recomienda profundizar estas investigaciones a fin de prevenir complicaciones en procedimientos quirúrgicos.

Palabras clave: viscoelasticidad, agregación eritrocitaria, glicación, anestésicos, diabetes.

This paper presents a preliminary study of the effects of the anesthetics *propofol*, *remifentanil*, and *vecuronium bromide* on the rheological properties of glycated erythrocytes *in vitro*, modeling the glycation by hyperglycemia observed in diabetes. Viscoelastic and aggregation kinetic parameters of erythrocytes were determined using an erythrocyte rheometer and an optical chip aggregometer developed in our laboratory. The results showed significant alterations in the membrane surface viscosity, the elastic modulus, and the erythrocyte deformability index for the different anesthetics studied. Also, the kinetics aggregation parameters showed different types of alterations due to the effect of anesthetics. This preliminary study suggests that the use of these anesthetics in diabetic patients could induce hemorreological alterations that disturb the microcirculation. For this reason, it is recommended to deepen these investigations to prevent complications in surgical procedures.

Keywords: viscoelasticity, erythrocyte aggregation, glycation, anesthetics, diabetes.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2020.31.4.117>



ISSN 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes es un grupo de trastornos que presentan la ausencia relativa o absoluta de insulina, y se caracteriza por hiperglucemia [1]. Debido a esta condición, los glóbulos rojos (**GR**) son modificados químicamente por efecto de la glicación [2], la cual produce una disminución de la carga eléctrica superficial negativa [3]. En consecuencia, la glicación de los **GR** por efecto de la hiperglucemia disminuye la repulsión electrostática, favoreciendo la agregación eritrocitaria y alterando sus parámetros hemorreológicos [4, 5].

Por otra parte, se ha observado que las técnicas anestésicas pueden afectar los parámetros hemorreológicos y hemostáticos [6, 7]. Los anestésicos aplicados por vía intravenosa más usuales consisten en una combinación de los anestésicos *propofol*, *remifentanilo* y *bromuro de vecuronio* [8]. El *propofol* es un agente hipnótico de corta duración y

rápida recuperación anestésica. El *remifentanilo* se emplea como analgésico, y para ayudar a la inducción y mantenimiento de la anestesia general. El *bromuro de vecuronio* es un bloqueador neuromuscular que no afecta el potencial de membrana [9].

Estudios realizados por Alet *et al.* [10, 11] en muestras de sangre de pacientes diabéticos tratadas *in vitro* con *propofol* describen alteraciones hemorreológicas al comparar con los valores correspondientes a muestras de dadores sanos. Asociado a esto se encontraron alteraciones en la agregación eritrocitaria, debidas probablemente a alteraciones de la carga eléctrica superficial y, en menor grado, de la bicapa lipídica. Además, Batista da Silva *et al.* [12] encontraron que el *propofol* puede alterar las propiedades viscoelásticas dinámicas de la membrana del **GR**.

Dado que los pacientes diabéticos presentan alteraciones hemorreológicas de base, el uso de anestésicos podría agravarlas. Por ese motivo la detección y cuantificación de di-

* riquelme@ifir-conicet.gov.ar, briquel@fbioyf.unr.edu.ar

chas alteraciones antes de una cirugía, es de gran importancia para poder tomar medidas preventivas y obtener el máximo beneficio para el paciente.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio preliminar de los efectos de agentes anestésicos (*propofol*, *remifentanilo* y *bromuro de vecuronio*) en **GR** glicosados *in vitro* simulando el estado de hiperglucemia *in vivo*. El estudio se realizó utilizando técnicas ópticas de difracción láser y de transmisión láser para determinar parámetros viscoelásticos y de cinética de agregación eritrocitaria.

II. MÉTODOS

Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de sangre de donadores sanos ($n = 3$) obtenidas por punción venosa y anticoaguladas con EDTA. Posterior a la extracción, los **GR** se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS: 300 mOsm, pH = 7.4), y se reservó el plasma para uso posterior. La extracción y el procesamiento de las muestras se realizó según las recomendaciones del panel de expertos en Hemorreología del Consejo Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) [13].

Glicación *in vitro*

La glicación no enzimática *in vitro* difiere de la glicación *in vivo*, particularmente por los cambios fisiológicos, el consumo de glucosa y la continua renovación de las células sanguíneas que ocurre en el cuerpo humano. Por tal motivo, a fin de modelizar *in vitro* la glicación que se produce *in vivo* en la diabetes, se han propuesto diversas técnicas que utilizan distintas concentraciones de glucosa y en las cuales el tiempo de incubación puede variar desde minutos hasta días [14-17]. En nuestro grupo de investigación se han realizado ensayos poniendo a punto diversos protocolos en los cuales se analizó el grado de glicación, y las alteraciones bioquímicas y hemorreológicas de las muestras incubadas con soluciones de glucosa [18-22].

Teniendo en cuenta las experiencias previas y las condiciones del presente experimento, se estableció como condición óptima la incubación de volúmenes iguales de **GR** con una solución de glucosa 0.5% p/v (equivalente a una glicemia de 250 mg/dL), adicionada con albúmina sérica humana 0.5% v/v en PBS, durante 5 horas a 37°C con agitación constante. Luego de que los **GR** fueron incubados, se lavaron dos veces con PBS. La muestra control (**C**) consistió en una alícuota de la misma muestra de sangre, pero utilizando solo PBS durante la incubación.

Tratamiento con anestésicos

Los anestésicos utilizados para la incubación fueron:

- **P**: propofol (Propofol Gray® 10 mg/mL, DR. GREY, Buenos Aires, Argentina).
- **R**: remifentanilo (5 mg - Fresenius Kabi, L: 76KL521041. Martínez, Buenos Aires - Argentina).
- **V**: bromuro de vecuronio (Scott Cassara - 10 mg).

Los anestésicos fueron diluidos en forma seriada hasta llegar a la concentración de trabajo en solución fisiológica. Para realizar el tratamiento *in vitro*, los **GR** glicosados y

sin glicar se suspendieron en plasma autólogo al 40%, y se incubaron por partes iguales con la solución del anestésico correspondiente en PBS, siendo la concentración final de incubación la presentada en *steady-state* durante una cirugía:

- **P** en 4 µg/mL de plasma.
- **R** en 10 ng/ml de plasma.
- **V** en 0.15 µg/ml de plasma.

El esquema de incubación consistió en muestras glicosadas y sin glicar, tratadas con cada anestésico por separado (**P**, **R** y **V**) y sus combinaciones (**PR**, **PV** y **RV**) y los respectivos controles. La incubación se realizó en estufa a 37°C durante 30 minutos bajo agitación suave y constante. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 533 RCF y los **GR** se lavaron dos veces con PBS. Los **GR** lavados de cada muestra fueron suspendidos al 40% en plasma autólogo.

Parámetros viscoelásticos

Para observar los posibles efectos de los anestésicos en los **GR** glicosados analizamos los parámetros hemorreológicos utilizando el Reómetro Eritrocitario [23, 24] (Patente AR 091467 A1, 2013). Este instrumento se basa en la técnica de difracción láser y permite obtener los siguientes parámetros viscoelásticos de los **GR** en estudio [25]:

ID: índice de deformabilidad.

μ : módulo elástico de la membrana del **GR**.

η : viscosidad superficial de la membrana del **GR**.

Para cada tratamiento los datos fueron obtenidos por quintuplicado.

Parámetros de agregación

Se estudió la cinética de agregación de los **GR** utilizando el Agregómetro de Chip Óptico [26, 27] también desarrollado en nuestro grupo de investigación y basado en la técnica de transmisión láser. Mediante el análisis de las curvas obtenidas es posible calcular los siguientes parámetros de agregación eritrocitaria:

Amp_{1/2}: amplitud de la intensidad luminosa, indicando el grado de agregación de glóbulos rojos.

t_{1/2}: tiempo necesario para alcanzar la mitad intensidad de la luz **Amp**_{1/2}, lo que indica la constante de tiempo característica para el nivel de agregación en un momento dado.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba *t* de Student utilizando Scientific Python. Se consideraron que las diferencias son significativas [28] cuando el *p*-valor de comparación contra el control (**C**) correspondiente fue $p < 0.05$.

TABLA 1: Parámetros Viscoelásticos de **GR** de muestras glicadas y no glicadas incubadas con los anestésicos. DND: dato no determinado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Muestra	No Glicados			Glicados		
	η [10^{-7} dina.s/cm]	μ [10^{-6} dina/cm]	ID	η [10^{-7} dina.s/cm]	μ [10^{-6} dina/cm]	ID
C	1.7 ± 0.2	4.98 ± 0.08	0.66 ± 0.03	1.7 ± 0.4	5.0 ± 0.1	0.67 ± 0.02
P	1.7 ± 0.4	$5.07 \pm 0.02^{***}$	0.64 ± 0.01	1.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	$0.63 \pm 0.03^*$
R	$1.6 \pm 0.3^{**}$	$4.92 \pm 0.02^*$	$0.69 \pm 0.01^*$	1.8 ± 0.5	4.92 ± 0.01	$0.69 \pm 0.01^{**}$
V	1.8 ± 0.5	5.00 ± 0.07	0.66 ± 0.03	$2.0 \pm 0.4^{***}$	4.97 ± 0.06	0.67 ± 0.02
PR	$1.9 \pm 0.4^*$	$5.06 \pm 0.01^*$	0.64 ± 0.01	DND	DND	DND
PV	$2.2 \pm 0.8^{***}$	5.03 ± 0.02	0.64 ± 0.01	1.8 ± 0.7	5.0 ± 0.1	0.66 ± 0.02
RV	1.6 ± 0.6	$4.91 \pm 0.03^*$	$0.70 \pm 0.01^{**}$	DND	4.939 ± 0.007	$0.69 \pm 0.01^{**}$

TABLA 2: Parámetros de cinética de agregación de las muestras glicadas y no glicadas incubadas con los anestésicos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Muestra	No Glicados		Glicados	
	$t_{1/2}$	Amp _{1/2}	$t_{1/2}$	Amp _{1/2}
C	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.03
P	$1.37 \pm 0.02^{***}$	0.96 ± 0.02	$0.90 \pm 0.02^*$	$1.07 \pm 0.02^*$
R	$1.29 \pm 0.02^*$	1.02 ± 0.03	$0.85 \pm 0.05^*$	$1.07 \pm 0.03^*$
V	1.06 ± 0.03	0.97 ± 0.03	1.06 ± 0.06	0.98 ± 0.02
PR	$0.92 \pm 0.04^*$	$1.12 \pm 0.04^*$	$0.86 \pm 0.08^*$	$1.21 \pm 0.04^*$
PV	$0.95 \pm 0.03^*$	$1.09 \pm 0.05^*$	1.36 ± 0.03	0.95 ± 0.05
RV	1.12 ± 0.03	0.99 ± 0.03	1.08 ± 0.06	0.94 ± 0.05

III. RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores medios de los parámetros viscoelásticos de los **GR** controles, glicados, y tratados con los diferentes anestésicos, solos y en combinación. En la Tabla 2 se presentan los parámetros de cinética de agregación $t_{1/2}$ y la **Amp**_{1/2} normalizados al control correspondiente, para las muestras sin glicar y para las muestras glicadas. Todos los resultados son presentados como Media \pm SD.

IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa que los valores de η aumentaron significativamente en las muestras no glicadas tratadas con **PR** y **PV** ($p < 0.05$; $p < 0.001$). También se observó un aumento de η para las muestras glicadas tratadas con **V** ($p < 0.001$). Por el contrario, el tratamiento con **R** disminuyó levemente la viscosidad en los **GR** de las muestras no glicadas ($p < 0.01$).

En los **GR** no glicados el μ disminuyó para los tratados con **R** y **RV** ($p < 0.05$) indicando una disminución en la rigidez de la membrana eritrocitaria por la acción de dichos anestésicos. En cambio, se observó un aumento de μ debido al tratamiento con **P** y **PR** ($p < 0.01$; $p < 0.05$). Para los **GR** glicados no hubo variaciones significativas de μ , indicando un posible efecto protector de la glucosa a la concentración utilizada.

Los valores de **ID** estuvieron aumentados significativamente para los **GR** no glicados y glicados tratados con **R** y **RV** ($p < 0.01$). En cambio, el **P** presentó una leve disminución del **ID** la cual fue significativa solo para las muestras glicadas ($p < 0.05$).

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos de los parámetros de cinética de agregación. El $t_{1/2}$ de los **GR** no

glicados presentaron un aumento significativo para los tratamientos con **P** y **R** ($p < 0.001$; $p < 0.05$) y una disminución significativa para los tratados con **PR** y **PV** ($p < 0.05$), indicando que los anestésicos modificarían la velocidad de agregación de los **GR**. Por otro lado, la **Amp**_{1/2} presentó un aumento significativo solo para las mezclas **PR** y **PV** ($p < 0.05$).

Los **GR** glicados tratados con **P**, **R** y **PR** mostraron una disminución significativa en el $t_{1/2}$ ($p < 0.05$). La **Amp**_{1/2} también presentó un aumento significativo para los **GR** glicados tratados con **P**, **R** y **PR** ($p < 0.05$).

V. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que los anestésicos podrían afectar los parámetros viscoelásticos de **GR** glicados de diferentes maneras. Se observan alteraciones similares a las encontradas previamente por Alet *et al.* [11] por la acción del **P**. El estudio sobre los anestésicos **V** y **R** también mostraron alteraciones significativas de la viscosidad superficial de membrana, del módulo elástico y del **ID**. Este resultado es de importancia dado que Lupton *et al.* [8] señalan que esos anestésicos junto con el *propofol* forman la combinación más utilizada en procedimientos quirúrgicos. Los resultados obtenidos con el agregómetro de chip óptico también mostraron alteraciones significativas por efecto de los anestésicos en los **GR** incubados con la concentración de glucosa equivalente a una glicemia de 250 mg/dL.

Si bien este es un estudio preliminar, los resultados obtenidos son una importante contribución para la evaluación de la prevención de complicaciones en procedimientos quirúrgicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Rosario por el apoyo financiero para esos estudios a través del proyecto BIO604. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral.

REFERENCIAS

- [1] A. C. Powers. *Diabetes mellitus: diagnóstico, clasificación y fisiopatología* en K Dennis, Fauci A, Hauser S, et al. *Harrison Principios de Medicina Interna*. (19ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., 2016).
- [2] G. Basta, A. M. Schmidt y R. De Caterina. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 582-592 (2004).
- [3] S. Kelm y R. Schauer. Sialic acids in molecular and cellular interaction. *Int. Rev. Cytol.* **175**, 137-240 (1997).
- [4] N. Lebensohn, A. Re, L. Carrera, L. Barberena, M. D'Arrigo y P. Foresto. Ácido siálico sérico, carga aniónica y agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. *Medicina* **3**, 331-334 (2009).
- [5] Y. I. Cho, M. P. Mooney y D. J. Cho. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol.* **2**, 1130-1138 (2008).
- [6] A. Alet, M. Chiesa, L. Racca, M. D'Arrigo, P. Foresto, J. Valverde y R. Rasia. Hemorreología comparativa. Estudios en diabéticos e hipertensos. *Acta Bioq Clin Lat* **35**, 63-68 (2001).
- [7] C. Pinnock, T. Lin y T. Smith. *Fundamentals of Anesthesia* (3 ed. Cambridge University Press, 2009).
- [8] T. Lupton y O. Pratt. Fármacos endovenosos utilizados para indução anestésica. *Sociedade Brasileira de Anestesiologia*, 1-10 (2013).
- [9] R. L. Videira y J. R. Cruz. Remifentanil in the Clinical Practice. *Rev Bras Anesthesiol.* **54**, 114-128 (2004).
- [10] A. I. Alet, S. S. Basso, H. V. Castellini, M. Delannoy, N. Alet, M. D'Arrigo y B. D. Riquelme. Hemorheological in vitro action of propofol on erythrocytes from healthy donors and diabetic patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* **64**, 157-165 (2016).
- [11] A. Alet, N. Alet, M. Delannoy, A. Fontana y B. Riquelme. In vitro study of rheological effects of propofol on human erythrocyte membrane. *Series on Biomechanics* **27**, 39-44 (2012).
- [12] M. Batista da Silva, A. Alet, N. Alet, H. Castellini, M. D'Arrigo y B. Riquelme. Alteration of red blood cells viscoelastic properties by in vitro action of Propofol. *Series on Biomechanics* **31**, 25-29 (2017).
- [13] O. Baskurt, M. Hardeman, M. Rampling y H. Meiselman. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics* (1 ed. Amsterdam: IOS Press, 2007).
- [14] J. E. Raftos, A. Edgley, R. M. Bookchin, Z. Etzion, V. L. Lew y T. Tiffert. Normal Ca^{2+} extrusion by the Ca^{2+} pump of intact red blood cells exposed to high glucose concentrations. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**, C1449-C1454 (2001).
- [15] R. Nagai, E. K. Deemer, J. W. Brock, S. R. Thorpe y J. W. Baynes. Effect of glucose concentration on formation of AGEs in erythrocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* **1043**, 146-150 (2005).
- [16] H. Resmi, H. Akhunlar, A. Temiz Artmann y G. Güner. In vitro effects of high glucose concentrations on membrane protein oxidation, G-actin and deformability of human erythrocytes. *Cell Biochem Funct.* **23**, 163-168 (2005).
- [17] G. S. D. Lemos, L. F. Márquez-Bernardes, L. R. Arvelos, L. F. Paraíso y N. Penha-Silva. Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys* **61**, 531-537 (2011).
- [18] B. Riquelme, P. Foresto, M. D'Arrigo, J. Valverde y R. Rasia. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *J Biochem Biophys Meth* **62**, 131-141 (2005).
- [19] A. Brandoni, A. Rojas, B. Riquelme, P. Foresto, M. D'Arrigo, J. Valverde y R. Rasia. Influence of membrane protein non-enzymatic glycosylation in the erythrocyte surface properties. *Biocell* **25**, 206 (2001).
- [20] A. Korol, O. Rosso, M. Martín, M. D'Arrigo y B. Riquelme. Impairment of erythrocytes incubated in glucose medium: a wavelet-information theory analysis. *Cell Biochem Biophys.* **60**, 329-334 (2011).
- [21] A. Korol, B. Riquelme y M. D'Arrigo. Crossover from Weak to Strong Nonlinear Disorder in the Viscoelasticity of Glucose Incubated Erythrocytes. *Open J Biophys* **3**, 191-197 (2013).
- [22] P. Buszniew, H. Mascaro Grosso, R. Pusillico, M. D'Arrigo y B. Riquelme. Relationship between glucose consumption and alteration in erythrocyte aggregation in a non-enzymatic glycosylation model in vitro. *Biocell* **43**, A13 (2019).
- [23] B. Riquelme, H. Castellini y B. Albea. Linear and non-linear viscoelasticity of red blood cells using a New Optical Erythrocyte Rheometer. *Latin America Optics and Photonics Conference*, Th4A.41 (2018).
- [24] B. Riquelme, J. Valverde y R. Rasia. Complex viscoelasticity of normal and lectin treated erythrocytes using laser diffractometry. *Biorheology* **35**, 325-334 (1998).
- [25] B. Riquelme, P. Foresto, M. D'Arrigo, F. Filippini y J. Valverde. Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. *Clin Hemorheol Microcirc.* **35**, 277-281 (2006).
- [26] M. A. Toderi, B. D. Riquelme y H. V. Castellini. Simplified variant of an optical chip to evaluate aggregation of red blood cells. *Biophotonics South America, Proc. SPIE* **9531**, 95313X (2015).
- [27] M. A. Toderi, H. V. Castellini y B. D. Riquelme. Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip. *J Biomed Opt.* **22**, 017003 (2017).
- [28] J. Devore. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (7 ed. México, Editorial Latinoamericana, 2013).