

ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE LAS RADIACIONES GAMMA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE IONES PLASMÁTICOS EN UNIDADES TRANSFUSIONALES

PRELIMINARY STUDY OF THE GAMMA-RADIATION EFFECT ON THE PLASMA IONS CONCENTRATION IN TRANSFUSION UNITS

A. I. Alet^{1,2}, S. Porini³, G. Detarsio¹, A. Aresi⁴, L. Di Tullio^{1,4}, N. Manzelli⁴, A. Acosta⁴, M. E. Galassi^{3,5} y B. D. Riquelme^{*1,2,3}

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) – Suipacha 531, (S2002LRK) Rosario, Argentina

²Consejo de Investigaciones de la UNR (CIUNR) – Maipú 1065, Rosario, Argentina

³Grupo de Física Biomédica, IFIR (CONICET-UNR) – Boulevard 27 de Febrero 210 Bis, (S2000EKF) Rosario, Argentina

⁴Centro Regional de Hemoterapia (CRH), Lavalle 356, (S2002MNB) Rosario, Argentina

⁵Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura (UNR) – Av. Pellegrini 250, (S2000) Rosario, Argentina

Recibido: 14/8/2023 ; Aceptado: 3/11/2023

Los concentrados de glóbulos rojos son el componente que se utiliza con mayor frecuencia en las transfusiones sanguíneas. La irradiación gamma de la unidad transfusional está indicada cuando un paciente corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de injerto contra huésped asociada a una transfusión. Sin embargo, esta irradiación exacerba la lesión de almacenamiento aumentando los niveles plasmáticos de potasio y disminuyendo los de sodio. Estos efectos sobre los glóbulos rojos reducen el tiempo de viabilidad de las unidades transfusionales irradiadas almacenadas. En este trabajo, estudiamos el efecto de diferentes dosis de radiación gamma sobre la concentración de los iones plasmáticos en las bolsas irradiadas, los cuales son indicativos de posibles alteraciones de las membranas de los glóbulos rojos y de los leucocitos. El análisis de los resultados obtenidos muestra que la radiación, a las dosis estudiadas, no afecta el consumo de glucosa. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos aumenta con la dosis de radiación, indicando que este tipo de alteraciones podrían ser dosis dependiente. Estos resultados podrían ayudar a diseñar nuevos medios de conservación para reducir el daño a la membrana inducido por la radiación.

Palabras Clave: irradiación, glóbulos rojos, conservación de unidades transfusionales.

Red blood cell concentrates are the most widely used component in blood transfusions. Gamma irradiation of the transfusion unit is indicated when a patient is at risk of developing transfusion-associated graft-versus-host disease. However, this irradiation exacerbates storage damage by increasing potassium and decreasing sodium plasmatic levels. These effects on red blood cells reduce the viability time of stored irradiated units. In this work, we study the different radiation dose effects on the concentration of plasmatic ions in the gamma-irradiated bags, which are attributed to possible membrane alterations of red blood cells and leukocytes. The result analysis shows that radiation, at the doses studied, does not affect glucose consumption. However, the permeability of the erythrocyte membrane increases with the radiation dose, indicating that these types of alterations could be dose-dependent. These results could help to design a new preservation medium to reduce radiation-induced membrane damage.

Keywords: irradiation, red blood cells, storage of transfusion units.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2024.35.1.21>



ISSN - 1850-1168 (online)

*bibiana_riquelme@yahoo.com.ar

I. INTRODUCCIÓN

Los concentrados de glóbulos rojos son el componente que se emplea en forma más frecuente en las transfusiones sanguíneas. La irradiación gamma de la unidad transfusional está indicada cuando un paciente corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de injerto contra huésped asociada a una transfusión (EICH o TA-GVHD), especialmente en pacientes pediátricos o inmunosuprimidos [1].

La EICH ocurre debido a que las células del sistema inmune del donante (injerto) reconocen a las células y los tejidos normales del paciente (huésped) como extraños y los atacan. La gravedad radica en que puede producir daño en el hígado, la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal. Para la prevención de la EICH se debe disminuir la capacidad funcional y de reproducción de los linfocitos T exponiendo las unidades de sangre a radiación gamma con dosis que van de 25 a 50 Gy [1]. También se suele utilizar rayos X en las mismas dosis, pero hasta el momento no se ha demostrado que tengan la misma efectividad.

Si bien estas dosis de radiación gamma permiten desactivar los linfocitos T, se ha observado que incrementan la lesión debido al almacenamiento en los concentrados de glóbulos rojos, aumentando los niveles plasmáticos de potasio y disminuyendo los de sodio [2]. La bomba de Na^+/K^+ desempeña un papel muy importante en el mantenimiento del volumen celular, iguala la presión osmótica a ambos lados de la membrana y mantiene el potencial de membrana. Se ha visto, además, que la irradiación promueve la generación de especies reactivas del oxígeno y la peroxidación de lípidos de la membrana de los glóbulos rojos [3], incrementa la permeabilidad de la membrana eritrocitaria al potasio, sodio y hemoglobina, y disminuye su deformabilidad [4-8]. Todos estos efectos sobre los glóbulos rojos reducen la viabilidad transfusional de las unidades irradiadas almacenadas disminuyendo su viabilidad de 42 a 28 días [9].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes dosis de radiación sobre la concentración de iones plasmáticos en las bolsas irradiadas, los cuales son indicativos de posibles alteraciones de las membranas de los glóbulos rojos y de los leucocitos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron 2 unidades de concentrados de glóbulos rojos de voluntarios adultos sanos almacenados en bolsas de cloruro de polivinilo que contenían citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA) como conservante. Cada unidad de sangre se dividió en 6 alícuotas de concentrados de glóbulos rojos (almacenados a 4°C). El plasma sin irradiar fue centrifugado a 3500 rpm por 6 min (Centrífuga PresVac DCA-300RVT, rotor R12/15), fraccionado en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar y almacenado en frízer a -20°C.

Irradiación del material biológico

De las 6 bolsas de concentrado de glóbulos rojos de cada donante, una fue preservada sin irradiar como control (0 Gy), y las otras fueron irradiadas a las 24 horas de la extracción con dosis de 2, 5, 10, 15 y 25 Gy utilizando un irradiador Biobeam GM 8000. Cada bolsa se irradió independientemente, ubicándola en el interior del irradiador de tal forma que hubiese homogeneidad de dosis de acuerdo a los datos provistos por el fabricante. Luego, todas las bolsas se almacenaron a 4°C durante 35 días.

Extracción de las muestras

Cada día de medición se procedió a extraer de cada bolsa la alícuota de concentrado de glóbulos rojos a ser utilizada para las experiencias. Se tomaron muestras a los 0, 2, 7, 9, 14, 16, 21, 23, 28, 30 y 35 días post-irradiación. El plasma congelado necesario para las experiencias se retiró de -20°C el mismo día de medición, y se descongeló a 37°C hasta llegar a temperatura ambiente.

Determinación de la concentración de iones

Se realizaron determinaciones de la concentración de iones Na^+ y K^+ en el sobrenadante de cada muestra cada tres días durante los 35 días. Las determinaciones se realizaron con un equipo ion-selectivo (Diestro-103) según indicaciones del fabricante.

Determinaciones complementarias

Se evaluó el contenido de glucosa plasmática por medio de la técnica enzimática GOD-PAP con autoanalizador (Biosystems A25), el recuento de leucocitos y el volumen corpuscular medio (VCM) con un contador hematológico (Sysmex XN350).

Extendidos y análisis microscópico

Las muestras se prepararon para su observación en el microscopio realizando un extendido a partir de la fracción obtenida de cada bolsa en el Centro Regional de Hemoterapia el día correspondiente. El extendido se dejó secar al aire y posteriormente se realizó la tinción de May Grumwald Giemsa. Los preparados se observaron en microscopio directo, utilizando objetivo de inmersión 100X y las imágenes fueron digitalizadas y almacenadas para su análisis.

Análisis estadísticos

Se empleó el programa GraphPad Prism 9 para analizar los datos mediante Two-way ANOVA y regresión lineal simple con prueba de diferencia de pendiente y ordenada al origen estableciendo si las diferencias son significativas. Además, las curvas se ajustaron por decaimiento de una fase y ajuste de meseta exponencial.

III. RESULTADOS

En la Fig. 1 se presenta la variación con el tiempo de almacenamiento de la concentración de glucosa en el medio de suspensión para las distintas dosis de radiación analizadas. Estos resultados muestran que a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, la concentración de glucosa disminuyó, independientemente de la dosis de radiación. Estos resultados indicarían que el consumo de la glucosa presente en el medio de conservación no es alterado por la irradiación.

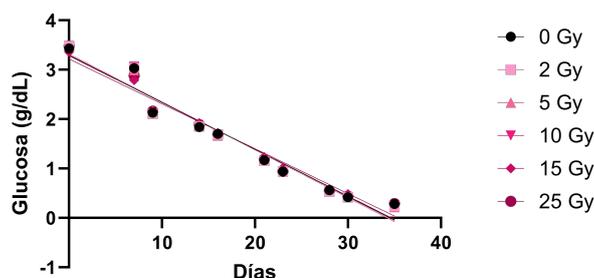


FIG. 1: Concentración de glucosa en el medio de suspensión. El error correspondiente al parámetro medido es del 2%.

En la Fig. 2 se presenta la gráfica de la variación con el tiempo de conservación de la concentración de sodio y potasio en el medio de suspensión para las distintas dosis estudiadas.

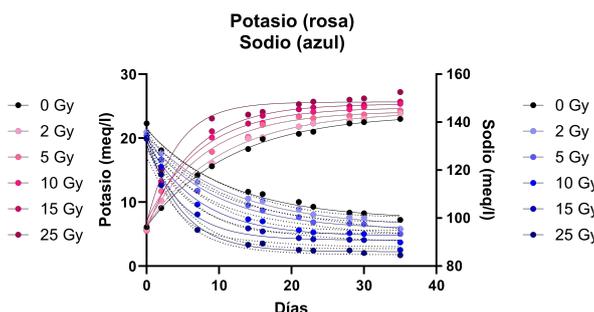


FIG. 2: Concentración de sodio (azul) y potasio (rojo) en el medio de suspensión. El error correspondiente al parámetro medido es del 2%.

Se observa una disminución del contenido de sodio y un aumento de la concentración de potasio en el sobrenadante. Esto se debe a que a medida que se consumía la glucosa disponible en el medio de conservación, la eficiencia de la bomba Na-K-ATPasa disminuía. Se observa que esta disminución en la eficiencia fue mayor para mayores dosis de radiación.

Por lo tanto, los resultados sugieren que existe un aumento de la permeabilidad de la membrana de los glóbulos rojos con dosis de radiación superiores a 2 Gy.

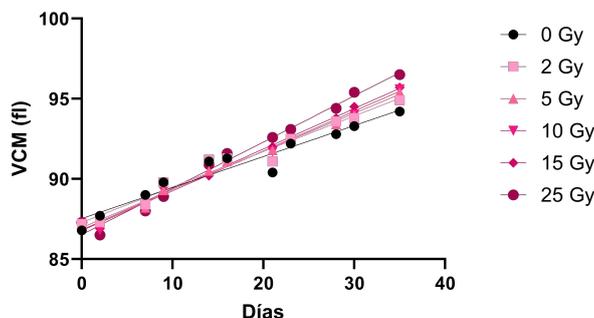


FIG. 3: Volumen corpuscular medio de los glóbulos rojos en función de los días de almacenamiento y las dosis de irradiación. El error correspondiente al parámetro medido es del 2%.

En la Fig. 3 se puede observar que el volumen corpuscular medio (VCM) aumentó significativamente con la dosis de

radiación después de 20 días de almacenamiento, lo que corrobora que la radiación gamma aumenta la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos.

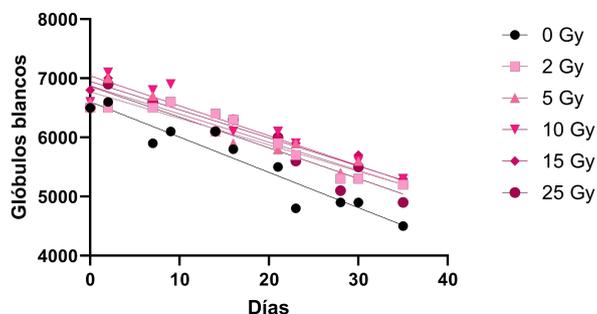


FIG. 4: Recuento de glóbulos blancos en función de los días de almacenamiento y las dosis de irradiación. El error correspondiente al parámetro medido es del 2%.

En la Fig. 4 se representa el número de leucocitos remanentes donde se observa la disminución con los días de almacenamiento, independientemente de la dosis de radiación.

El análisis microscópico de las fotografías de las muestras presentadas en la Fig. 5 y tomadas a los 2 y 14 días post-irradiación (2 dpi y 14 dpi), indican que, si bien la radiación no ha disminuido el número de los leucocitos (elementos nucleados de las fotos), estos han perdido su estructura celular normal.

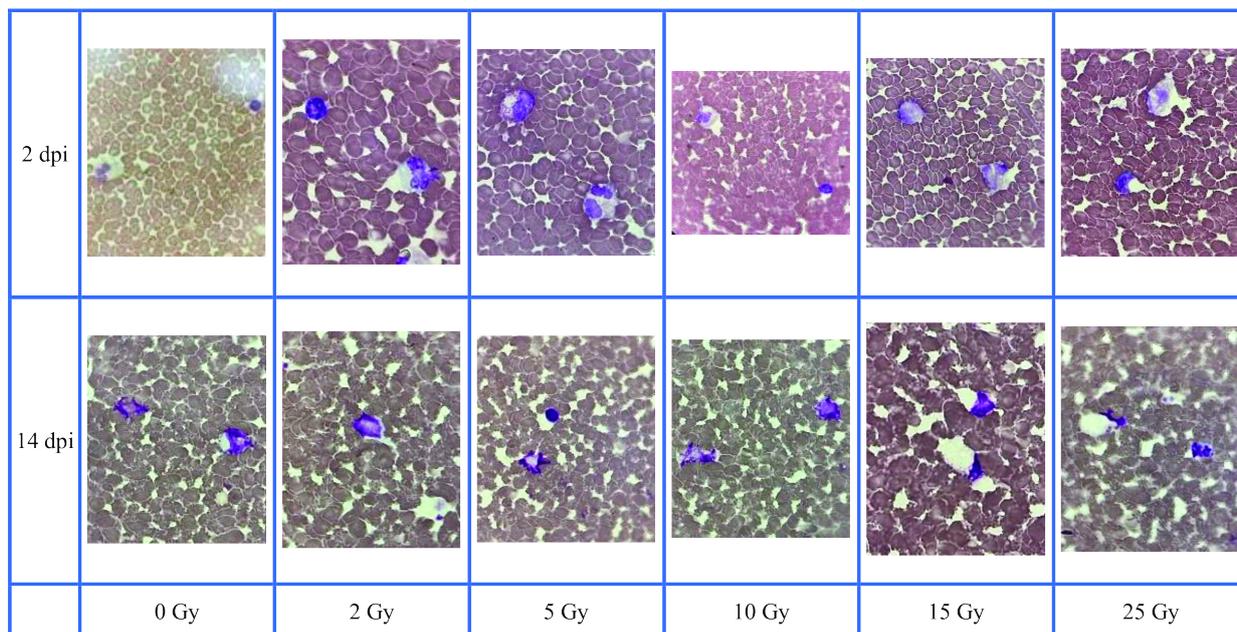


FIG. 5: Imágenes microscópicas de las muestras almacenadas registradas a los 2 y 14 días post-irradiación (2 dpi y 14 dpi) donde se observan las alteraciones morfológicas de los glóbulos blancos (células nucleadas) debido a las distintas dosis de radiación ensayadas.

IV. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados de este trabajo permite concluir que la dosis de radiación no afecta el consumo de glucosa. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos aumenta con la radiación, indicando que este tipo de alteraciones podrían ser dosis dependiente. Los resultados de este trabajo contribuirían a la optimización y diseño de nuevos protocolos y a la evaluación de nuevos aditivos para los medios de conservación a fin de reducir el daño en la membrana eritrocitaria inducido por la radiación, tal como se ha sugerido en otras publicaciones [10-12].

REFERENCIAS

- [1] M. Pelszynski, G. Moroff, N. Luban, B. Taylor y R. Quinones. Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* **83**, 1683-1689 (1994).
- [2] A. Alet, S. Porini, G. Detarsio, M. Galassi, A. Aresi, L. Di Tullio, A. Acosta y B. Riquelme. New insights in the biochemical analysis of stored irradiated blood. *International Journal of Laboratory Hematology* **45**, 3 (2022).
- [3] A. Anand, W. Dzik, A. Imam y S. H. Sadrzadeh. Radiation-induced red cell damage: role of reactive oxygen species. *Transfusion* **37**, 160-165 (1997).
- [4] E. Estrada, H. Castellini, A. Acosta, L. Di Tullio, J. Borraz, A. Chinellato, I. Tack, M. D'Arrigo, B. Riquelme y M. E. Galassi. Preliminary study of the effects of gamma radiations on human red blood cells. *Anales AFA* **31**, 51-54 (2020).
- [5] K. AlZahrani y H. A. Al-Sewaidan. Nanostructural Changes in the Cell Membrane of Gamma-Irradiated Red Blood Cells. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* **33**, 109-115 (2016).
- [6] S. Porini, F. Gomez-Fava, H. Castellini, M. Galassi, N. Manselli, L. Di Tullio, A. Acosta, A. Alet y B. Riquelme. Preliminary results of hemorheological alterations by gamma radiation on stored red blood cells. *International Journal of Laboratory Hematology* **45**, 139 (2022).
- [7] B. D. Riquelme, M. Toderi, M. Batista, M. E. Galassi, H. Castellini, E. Estrada y A. I. Alet. New insights into the mechanics of erythrocytes: effects of radiation and several drugs of biomedical interest. *Series on Biomechanics* **36**, 61-69 (2022).
- [8] R. Yousuf, M. H. Mobin, T. Subramaniam y C. F. Leong. Effects of gamma irradiation on red blood cells at different storage period: A comparative study. *Bangladesh Journal of Medical Science* **17**, 30-35 (2018).
- [9] B. Riquelme, E. Estrada, H. Castellini, A. Acosta, A. Chinellato, I. Tac, J. Borraz, L. D. Tullio y M. E. Galassi. Preliminary study of alterations in human red blood cells by irradiation with high energy photons. *Blucher Biophysics Proceedings. Encontro Anual da biofisica 2019* **2**, 107-108 (2019).
- [10] A. Antosik, K. Czubak, A. Gajek, A. Marczak, R. Glowacki, K. Borowczyk y H. M. Zbikowska. Influence of Pre-Storage Irradiation on the Oxidative Stress Markers, Membrane Integrity, Size and Shape of the Cold Stored Red Blood Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **42**, 140-148 (2015).
- [11] K. Czubak, A. Antosik, N. Cichon y H. M. Zbikowska. Vitamin C and Trolox decrease oxidative stress and hemolysis in cold-stored human red blood cells. *Redox Report* **22**, 445-450 (2017).
- [12] H. M. Zbikowska, A. Antosik, M. Szejka, M. Bijak y P. Nowak. A moderate protective effect of quercetin against γ -irradiation- and storage-induced oxidative damage in red blood cells for transfusion. *International Journal of Radiation Biology* **90**, 1201-1210 (2014).