

AGREGACION DE GLOBULOS ROJOS EN PRESENCIA DE LATEX NATURAL

¹M.G.Bertoluzzo, ¹F.E. Quattrin, ^{1,2}S.M.R. Bertoluzzo, ²M.I.Spengler, ^{1,3}R.O. Rigatuso, ³J. Luisetti, ³C.Gatti

¹Taller de Física: Una Alternativa Pedagógica. Area Física. ³Area Físico Química. Dep. de Química-Física, Fac. de Cs. Bioq. y Farm. Universidad Nacional de Rosario.

²Cátedra de Biofísica. Fac. de Cs. Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

mgbysmb@cablenet.com.ar

Es corrientemente aceptado que la formación de rouleaux es un proceso dinámico y representa un balance entre las fuerzas de agregación debidas a macromoléculas del medio y fuerzas de desagregación por repulsión electrostática entre células adjuntas. Este trabajo tiene por objeto examinar el mecanismo de acción del látex sobre la agregación de glóbulos rojos (GR) humanos. Muestras de sangre fueron recogidas con EDTA como anticoagulante. El plasma fue removido por centrifugación y los GR fueron lavados 2 veces con buffer PBS. Luego los glóbulos rojos fueron suspendidos en un medio que contenía látex (40%) y solución de CINA (tamponada a pH 7,4) para lograr una osmolaridad final de 300 m osmoles/l. Las suspensiones de GR en la solución de látex se prepararon de forma tal de lograr un hematocrito del 30%. Las mediciones de agregación eritrocitaria se realizaron por método fotométrico midiendo la luz transmitida a través de una muestra sanguínea y estimando la velocidad con que los GR se agregan y el tamaño de los agregados. A partir de los gráficos obtenidos se puede concluir que este tipo de látex por su forma y carga eléctrica desfavorece la agregación eritrocitaria.

The determination of erythrocyte aggregation is of clinical importance to understand some pathophysiological phenomena or follow up therapeutics. Furthermore, erythrocyte aggregation provides a simple model for studying cell-cell interactions in biological systems. In this work, we use fig tree latex micelles instead of dextran for studying the red blood cells (RBC) aggregation. Samples of blood were recollected by venipuncture from healthy volunteers, anti coagulated with EDTA and used within 4 hours. The plasma was removed by centrifugation and the cells were washed twice with phosphate buffered saline. Red blood cells were then suspended in a latex micelles solution giving a 30% hematocrit. The latex micelles were obtained by incision in the fig tree stem (*Ficus carica*). Measurements were performed by photometric method detecting changes in light transmission of the RBC suspension during the aggregation process. From the graphics obtained it can be concluded that this kind of latex acts as disaggregator rather than as an aggregator because of its shape and charge.

INTRODUCCION

La interacción de células es un tema importante en biología y medicina. El mecanismo de agregación de células, en muchos sistemas biológicos es bastante complejo.

La agregación eritrocitaria depende de las propiedades fisicoquímicas del medio de suspensión y de las propiedades intrínsecas de los glóbulos rojos (propiedades biofísicas, reológicas, etc). La agregación de glóbulos rojos fisiológicamente ocurre en vivo. Cuando los glóbulos rojos se agregan, forman "rouleaux" y luego una "red de rouleaux". En sangre entera normal, los rouleaux son fácilmente destruidos por la acción de una fuerza externa. En contraste, en algunas enfermedades, se pueden formar agregados irreversibles. Por lo tanto, la determinación de la agregación eritrocitaria es muy importante clínicamente para entender algunos fenómenos patológicos o para seguir una terapia. Más aún, la

agregación eritrocitaria provee un modelo simple para estudiar las interacciones celulares en sistemas biológicos. Las células adyacentes se pegan unas con otras para formar ligaduras macromoleculares: las macromoléculas del plasma sanguíneo, primariamente fibrinógeno, son fácilmente adsorbidas sobre las membranas eritrocitarias y ligan las células a los sitios de sus contactos ocasionales. Cuanto mayor es el peso molecular de las macromoléculas, más rápido se forman los agregados.

La formación de agregados en presencia de un polímero neutro como el dextrán, ofrece un sistema relativamente simple para estudiar el mecanismo básico de agregación de células in vitro. Los glóbulos rojos humanos están compuestos básicamente por una membrana celular que envuelve una solución rica en hemoglobina. Las propiedades

fisicoquímicas de los glóbulos rojos están bien caracterizadas. Por otro lado, el Dextrán es un polímero de glucosa disponible en un amplio rango de tamaño molecular y las propiedades fisicoquímicas de este polímero son bastante simples y están bien definidas. Por lo tanto, la agregación de glóbulos rojos con dextrán ha sido usada como sistema modelo para estudiar las interacciones entre células. El concepto general es que la agregación de glóbulos rojos representa un balance energético o un balance de fuerzas en superficie celular. La agregación se produce cuando las fuerzas de cohesión debido a la adsorción de macromoléculas sobre las superficies celulares adyacentes exceden las fuerzas desagregantes debido a la repulsión electrostática.

En este trabajo se analiza la posibilidad de usar micelas de látex de higuera en lugar de dextrán. El látex es un líquido blanco, opaco, parecido a la leche. Se extrae, en este caso de la higuera (*Ficus carica*), cultivada en Argentina debido a que genera un gran volumen de látex, es de crecimiento rápido y tiene una larga expectativa de vida. El látex natural está compuesto por polímeros cis 1,4 poliisopreno, una fracción de proteínas solubles y una fracción de proteínas asociadas a las micelas, las cuales catalizan la biosíntesis de la goma. Las micelas son partículas de poliisopreno con una capa exterior de proteínas adsorbidas que le confieren una carga negativa.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de las muestras

Se obtuvieron muestras de sangre por venipuntura de voluntarios sanos, se anticoagularon con EDTA (SIGMA Chem. Co) y se usaron dentro de las 4 horas de extracción.

El plasma fue removido por centrifugación y luego se lavaron las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS: 0.030 M KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , 0.122 M NaCl; pH 7.4; 295±5 mOm). Los glóbulos rojos se suspendieron en una solución de micelas de látex natural para dar una solución con un hematocrito de 30%.

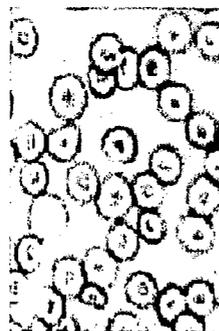
Las micelas de látex se obtuvieron por incisión en el tallo de higuera.

Las mediciones se realizaron con un agregómetro construido según un modelo diseñado por Tomita et al. El mismo consiste en un densitómetro que detecta los cambios de transmisión de luz de la suspensión de glóbulos rojos durante el proceso de agregación. La muestra se coloca en un tubo transparente ubicado en la cabeza densitométrica y conectado a un agitador mecánico. La agitación origina una rápida disminución de la luz transmitida debido a la dispersión celular, luego cuando la agitación se interrumpe, se observa un gradual incremento en la luz transmitida asociado con la formación de rouleux. Los resultados experimentales se ajustan con la siguiente ecuación:

Donde τ es la turbidez en función del tiempo (t). El parámetro s_0/n_0 estima la intensidad del proceso de agregación y tamaño promedio de los rouleux cuando el proceso ha concluido. $2k_2n_0$ estima la velocidad del proceso de agregación.

$$\frac{\tau}{\tau_0} = \frac{1}{1 + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\frac{n_0}{s_0} + 2k_2n_0t} \right)}$$

En las fotografías se muestran vistas microscópicas de a) glóbulos rojos lavados, b) rouleux en sangre entera y c) micelas de látex.



Vista microscópica de glóbulos rojos lavados



Vista microscópica de rouleaux en sangre entera



Vista microscópica de micelas de látex

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La figura muestra un agregograma obtenido para sangre entera normal. Los glóbulos rojos forman agregados evidenciándose por el aumento de la transmitancia en función del tiempo hasta alcanzar un valor constante.

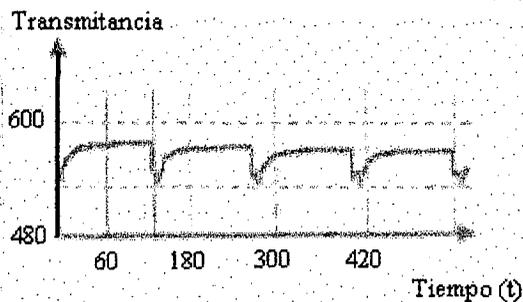


Figura 1 a)

En la figura 1 b) se muestra un agregograma de glóbulos rojos incubados con dextrán. En este caso, la transmitancia aumenta en función del tiempo hasta alcanzar un valor constante mayor que en el caso de sangre entera normal. Los agregados son más grandes que en ausencia de dextrán.

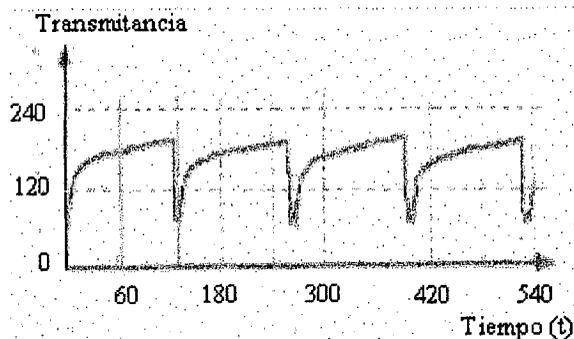


Figura 1 b)

En la figura 1 c) se muestra un agregograma de glóbulos rojos en solución de látex. La transmitancia permanece casi constante, por lo que se deduce que no se forman agregados o que se forman agregados muy lentamente, ya que la velocidad de agregación, en este caso es muy pequeña.

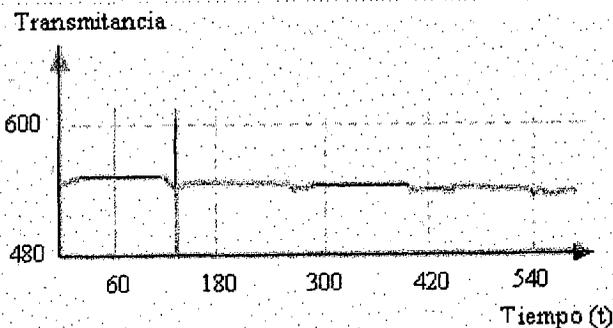


Figura 1 c)

En la tabla se muestran los valores obtenidos de los parámetros que estiman el tamaño de los agregados y la velocidad de agregación.

	S_0/n_0	$2k_2n_0$
Sangre entera	1.6 ± 0.3	0.8 ± 0.1
GR + dextrán	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.5
GR + látex	0.8 ± 0.4	0.2 ± 0.1

Muchos de los agentes que promueven la formación de rouleaux tienen propiedades comunes tales como alto peso molecular, una forma molecular elongada y la tendencia a formar cadenas débiles. El factor geométrico también parece influir en dicha agregación, por ejemplo, se observó (CANHAM, et al) que el PVP (Polyvinilrolidone) es un agente más efectivo en la formación de rouleaux que el dextrán debido a las diferencias en su estructura; el PVP es un polímero sintético lineal y el dextrán es ramificado.

Por ello, de los resultados obtenidos se puede inferir que las micelas de látex, debido a su forma esférica y su carga superficial negativa, la que aumentaría la fuerza de repulsión entre las células, actuarían desfavorablemente en la agregación de los glóbulos rojos.

Referencias

- 1- Shu Chien, et al. Journal of Colloid and Interface Science, vo. 62, N° 3 (1977).
- 2- Peter Canham, et al. J. Physiol. Pharmacol. Vol. 57 (1979).
- 3- S.M.Bertoluzzo, et al. Blood Cells, Molecules, and Diseases, p. 339-349. (1999).
- 4- Hunseung Kang, et al. Plant Physiology, vol. 123, pp.1133-1142. (2000)

A la memoria del Dr. Jorge A. Luisetti,
investigador, compañero y amigo, cuya
desaparición física aún hoy nos conmueve.