

Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica

Characterization of osmotic fragility of human erythrocytes in chronic haemolytic anemia

MSc. Yamirka Alonso-Geli, MSc. Yamisleydi Alonso-Moreno, Lic. José E. Falcón-Diéguez, Est. Liset Lucambio-Miró, Est. Mariana Castro-Piñol

yamirka.alonso@cbiomed.cu, yamisleydi@inor.sld.cu, jfalcond05@yahoo.com

**Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente,
Santiago de Cuba, Cuba**

Recibido: 15 septiembre 2014

Aprobado: 5 diciembre 2014

Resumen

Como la anemia drepanocítica se caracteriza por una anemia hemolítica crónica, fue evaluada la fragilidad osmótica de eritrocitos normales y drepanocíticos. Se trabajó con sangre de individuos sanos y pacientes drepanocíticos. Se realizó la prueba de fragilidad osmótica inmediata. Los resultados muestran que la resistencia globular mínima fue al 0,45 % de NaCl y la resistencia globular máxima al 0,32 % de NaCl. En eritrocitos drepanocíticos la resistencia globular mínima fue al 0,36 % de NaCl y la resistencia globular máxima al 0,1 % de NaCl. Al comparar los resultados para cada tipo de célula se observó disminución de la fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos respecto a los normales, evidenciada por el desplazamiento de la curva hacia valores de NaCl inferiores. Se encontraron diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de hemólisis en las soluciones entre 0,1 % y 0,36 % de NaCl ($p < 0,05$).

Palabras clave: fragilidad osmótica, eritrocitos, drepanocitos, anemia drepanocítica.

Abstract

Since sickle cell diseases are characterized by chronic hemolytic anemia, this work aims to characterize the osmotic fragility of normal and sickled erythrocytes. We worked with blood samples of healthy individuals and sickle cell patients. We carry out the rapid osmotic fragility test. The results show that the minimum globular resistance was at 0,45 % NaCl and the maximum resistance was at 0,32 % NaCl. In sickle cell, resistance was at 0,36 % NaCl and the maximum globular resistance was at 0,1 % NaCl. By comparing the results for each type of cell, we obtain decrease of osmotic fragility of the sickle cells against normal cells, showing a shift of the curve towards lower values of % NaCl. We found statistically significant differences between the means of the percentage of hemolysis in hypotonic solutions between 0,1 % and 0,36 % NaCl ($p < 0,05$).

Keywords: osmotic fragility, erythrocytes, sickle cells, sickle cell anemia.

Introducción

La anemia drepanocítica (AD), es una anemia hemolítica congénita de causa intracorpúscular, caracterizada por la presencia de una hemoglobina mutada denominada hemoglobina S; este se transmite con carácter autosómico recesivo [1]. La hemoglobina mutante presenta un cambio de aminoácidos en su estructura proteica, por lo que tiende a ser muy poco soluble a bajos niveles de oxígeno, lo que conlleva a que polimeriza en el interior del eritrocito desoxigenado para dar lugar a la falciformación del mismo; se observan en la sangre numerosos eritrocitos en forma de hoz o drepanocitos más rígidos y menos flexibles que los de un individuo normal [2]. Se considera un problema de salud pública en nuestro país por su alta incidencia, morbilidad y mortalidad; afecta al 3,1 % de la población cubana distribuida fundamentalmente en Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba y Guantánamo [3]. La enfermedad evoluciona con dolores reumatoides, osteoarticulares, úlceras en las piernas y crisis hemolíticas.

Como se caracteriza por una anemia hemolítica crónica, es importante evaluar la hemólisis en diferentes condiciones, mediante la prueba de fragilidad osmótica [4], que se basa en la medición de la hemólisis de los eritrocitos en condiciones de estrés osmótico [5], y permite evaluar las propiedades de las membranas citoplasmáticas y el efecto en el volumen intracelular [6].

La osmosis es la difusión de agua de un medio con menor concentración de solutos hacia medios con mayor concentración de solutos a través de una membrana semipermeable [7], para lograr un equilibrio de concentraciones a ambos lados de la membrana. La prueba de fragilidad osmótica es muy útil para el diagnóstico diferencial de anemias hemolíticas hereditarias caracterizadas por la destrucción acelerada de los eritrocitos [8].

Se propone evaluar la fragilidad osmótica de eritrocitos normales y drepanocíticos como paso previo que provea las bases necesarias para un estudio posterior y más profundo de la influencia de determinados agentes antidrepanocíticos en la fragilidad osmótica.

Materiales y métodos

Muestras biológicas

En el estudio se empleó sangre periférica obtenida por venipunción de individuos supuestamente sanos y pacientes drepanocíticos del servicio de hematología del Hospital “Juan Bruno Sayas” de Santiago de Cuba, previa información a los mismos.

Preparación de las muestras

La sangre total heparinizada se centrifugó a 2 500 rpm durante 10 min; se desechó el plasma, y el concentrado de eritrocitos se lavó tres veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, 1 M. Se preparó una suspensión de eritrocitos al 25 % con el mismo *buffer*.

Se preparan diferentes soluciones *buffer* fosfato salino pH 7,4 a diferentes concentraciones de NaCl (entre 0,1 % y 0,9 %).

Prueba de fragilidad osmótica

A 5 mL de cada solución (a las diferentes concentraciones de NaCl) se le añade 100 µL de la suspensión de eritrocitos al 25 %, se homogeniza la mezcla invirtiendo los tubos suavemente, se deja reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga a 2 500 rpm durante 5 min, y se desecha el precipitado.

Se lee la absorbancia del sobrenadante a 540 nm frente al control negativo. Se toma como control negativo el tubo con solución de *buffer* fosfato salino con una concentración de NaCl de 0,9 %, dado que reproduce las condiciones fisiológicas. Se toma como control positivo un tubo con 0 % de NaCl (agua destilada), que provoca hemólisis máxima. Se calcula el porcentaje de hemólisis según (1):

$$\% \text{Hemólisis} = \frac{Abs_{x\%}}{Abs_{0\%}} * 100 \quad (1)$$

donde

$Abs_{x\%}$: representa el valor de absorbancia a 540 nm de las muestras a diferentes concentraciones de NaCl.

$Abs_{0\%}$: representa el valor de absorbancia a 540 nm de la muestras a 0 % de NaCl.

Luego se procede a graficar los datos correspondientes (figura 1).

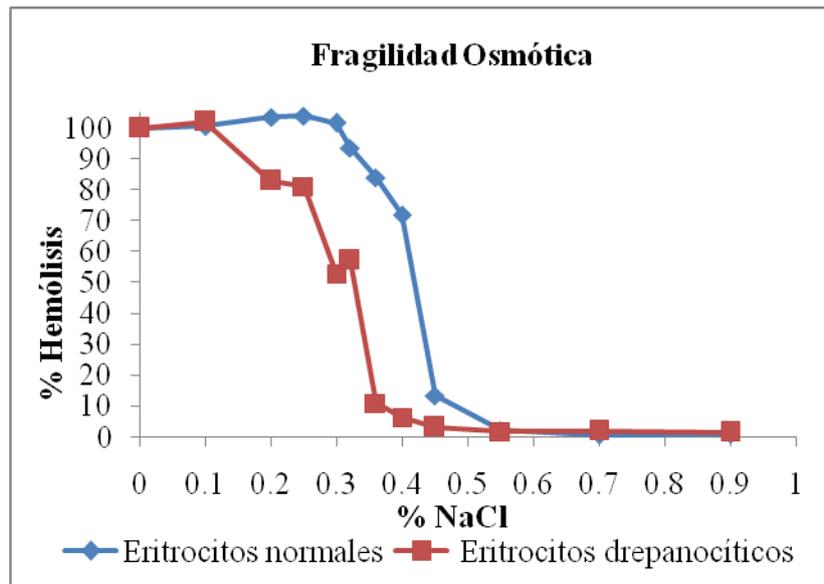


Figura 1. Representación gráfica de la influencia de soluciones hipotónicas a diferentes concentraciones de NaCl (% NaCl) en la hemólisis de eritrocitos normales y drepanocíticos (% Hemólisis)

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se efectuó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer, empleando el paquete SPSS 11. Los valores mostrados representan el valor medio de cinco determinaciones. Se consideraron significativas las diferencias a $p < 0,05$.

Resultados y discusión

La prueba de fragilidad osmótica indica la resistencia de los eritrocitos a la ruptura por acción de la presión osmótica, ejercida sobre la membrana eritrocitaria, al colocarlos en soluciones salinas hipotónicas; es un indicador de la razón volumen/superficie celular, importante para el diagnóstico diferenciado y la evolución de determinados tratamientos.

Estudio de fragilidad osmótica en eritrocitos normales

Para el estudio de la fragilidad osmótica en eritrocitos normales, obtenidos de sangre periférica de individuos supuestamente sanos, se calculó el porcentaje de hemólisis en presencia de soluciones con concentraciones decrecientes de NaCl. Los resultados se observan en la tabla 1. Los valores mostrados corresponden al valor medio de 5 determinaciones.

TABLA 1. PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DE ERITROCITOS NORMALES EN PRESENCIA DE SOLUCIONES HIPOTÓNICAS DE NaCl A DIFERENTES CONCENTRACIONES

% NaCl	% Hemólisis	Desviación estándar
0	100	0
0,1	101	8
0,2	104	10
0,25	104	10
0,3	102	7
0,32	94	9
0,36	84	24
0,4	72	19
0,45	14	11
0,55	2	3
0,7	1	1
0,9	1	1

Los resultados muestran que la resistencia globular mínima (comienzo de la hemólisis) fue en soluciones de 0,45 % de NaCl y la resistencia globular máxima (hemólisis completa de los eritrocitos) se produce a 0,32 % de NaCl; estos resultados son consistentes con los descritos por otros autores [5]. En individuos supuestamente sanos y sin alteraciones en la membrana de los eritrocitos, la hemólisis se produce entre 0,45 % y 0,35 % de NaCl [9].

Para la resistencia globular mínima se toma como valor de referencia el 10 % de hemólisis, que representa el valor máximo permisible para considerar la hemólisis dentro de los límites normales. Se toma como valor de referencia para la resistencia globular máxima el 90 % de hemólisis.

Cuando los eritrocitos se colocan en una solución hipotónica, se incrementa el flujo de agua hacia el interior para lograr el equilibrio de concentraciones de solutos entre el interior y el exterior celular, los eritrocitos se hinchan hasta alcanzar el punto crítico, donde la membrana pierde su integridad y ocurre la hemólisis [10].

La habilidad de los eritrocitos normales para resistir la hipotonicidad proviene de su forma bicóncava y las propiedades elásticas de las membranas, las que permiten que la célula aumente su volumen hasta un 70 % antes de que la membrana se estire; una vez superado este límite ocurre la hemólisis [11].

Se observa gran dispersión en los valores obtenidos, debido fundamentalmente a la variabilidad biológica entre muestras, que se evidencia en diferencias en la concentración de hemoglobina, el hematocrito y la presencia de estados patológicos, etcétera.

Estudio de fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos

Los resultados del estudio de la fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos, obtenidos de sangre periférica de pacientes con anemia drepanocítica, se muestran en la tabla 2.

TABLA 2. PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DE ERITROCITOS DREPANOCÍTICOS EN PRESENCIA DE SOLUCIONES HIPOTÓNICAS DE NaCl A DIFERENTES CONCENTRACIONES

% NaCl	% Hemólisis	Desviación estándar
0	100	0
0,1	102	14
0,2	83	15
0,25	81	13
0,3	53	14
0,32	57	18
0,36	11	7
0,4	6	5
0,45	3	4
0,55	2	2
0,7	2	3
0,9	2	2

Como se observa, la resistencia globular mínima fue en soluciones de 0,36 % de NaCl y la resistencia globular máxima es a 0,1 % de NaCl; estos resultados son similares a los

obtenidos por otros autores [5, 12]. Debe tenerse en cuenta que la hemólisis en los pacientes drepanocíticos puede alcanzar valores de hasta el 40 %, por las características propias de la enfermedad [13].

Al comparar los resultados obtenidos en cada tipo de célula (eritrocitos normales y drepanocíticos) se observa una disminución de la fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos respecto a los normales, que se evidencia en un desplazamiento de la curva hacia valores de porcentaje de NaCl inferiores, lo que representa mayor resistencia de los mismos a la hemólisis en presencia de soluciones hipotónicas (figura 1). Los valores mostrados en la figura representan el valor medio de cinco determinaciones.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los porcentajes de hemólisis en las soluciones hipotónicas entre 0,1 % y 0,36 % de NaCl para un nivel de significación del 95 %.

La fragilidad osmótica de los eritrocitos drepanocíticos se ve disminuida y la fragilidad mecánica *in vitro*, aumentada. Singer y Fisher comprobaron que los eritrocitos que contienen hemoglobina S son los de menor término de vida cuando se transfunden a sujetos normales y son también los que tienen mayor fragilidad mecánica *in vitro* [6].

A pesar de que todos los autores concuerdan con el comportamiento fenomenológico de la fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos, los mecanismos moleculares que lo originan no han sido completamente dilucidados; una hipótesis que permite un acercamiento a las causas del fenómeno está relacionada con factores facilitadores de la drepanocitosis como el aumento de la concentración corpuscular media de hemoglobina S (CCMH) y la disminución del volumen corpuscular medio (VCM).

El incremento de la CCMH pone de manifiesto un grado extremo de deshidratación celular, que se explica por las alteraciones de polimerización irreversible de la deoxi-Hb S y el efecto que ejerce sobre la membrana eritrocitaria, particularmente en las alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas. Al colocar la célula deshidratada en un medio acuoso comienza a entrar agua al interior celular hasta alcanzar el equilibrio de concentraciones; una vez llegado este punto crítico, la célula comienza a hincharse hasta que rebasa la capacidad de elasticidad de la membrana y ocurre la hemólisis por la presión osmótica ejercida sobre la misma.

La membrana eritrocitaria tiene varias vías que mantienen la hidratación celular, las dos más importantes son el sistema de cotransporte K-Cl y el canal de Gardo. Cuando se activa el cotransportador de K-Cl permite la salida de K y Cl a favor del gradiente de

concentración, seguido por agua, lo que provoca deshidratación; en la drepanocitosis esta vía se encuentra anormalmente activada, lo que conduce a un incremento de la concentración celular de Hb S y su polimerización [14].

Conclusiones

La fragilidad osmótica de eritrocitos normales es de 0,45 %-0,32 % de NaCl; para eritrocitos drepanocíticos presenta valores de 0,36 %-0,1 % de NaCl.

La fragilidad osmótica en eritrocitos drepanocíticos es menor que en los normales; se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los porcentajes de hemólisis en las soluciones hipotónicas entre 0,1 % y 0,36 %.

Referencias bibliográficas

1. SERJEANT, G. R., *Sickle Cell Disease*, 3.^a ed., New York, Oxford University Press, 2001, 792 p., ISBN 0192630369.
2. EATON, W. A.; HOFRICHTER, J., "Sickle cell hemoglobin polymerization", en ANFINSEN, C. B.; EDSALL, J. T.; RICHARDS, F. M.; EISENBERG, D. S., eds., *Advances in Protein Chemistry*, vol. 40, San Diego, Academic Press, 1990, p. 63-279, ISBN 0120342405.
3. COLOMBO, B.; GUERCHICOFF, E.; MARTÍNEZ, G., *Genética Clínica de las Hemoglobinas Humanas*, La Habana, Editorial Pueblo y Educación, 1993, 267 p., ISBN 9591300441.
4. GALLAGHER, P. G.; JAROLIM, P., "Red blood cell membrane disorders", en HOFFMAN, R.; BENZ, E. J.; SILBERSTEIN, L. E.; HESLOP, H.; WEITZ, J.; ANASTASI, J., *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6.^a ed., Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012, cap. 43.
5. ELEKWA, I.; MONANU, M. O.; ANOSIKE, E. O., "Effecs of aqueous extracts of Garcinia kolaseeds on membrane stability of HbAA, HbAS and HbSS human erythrocytes", *Global J. of Medical Sciences*, 2003, **2**(2), 97-101.
6. MEDAL, M., "Anemia de Células Falciformes «sickle cell anemia»", *Revista Honduras Pediátrica*, 1965, **2**(1), 119-142.
7. HASSAN, F. M.; ALRASHEEDY, Y. K., "Validation of osmotic fragility test using a modified new Garden Angelica Reagent in healthy individuals blood, Saudia

- Arabia”, *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2012, **2**(14), 37-40.
8. STOJANOVIĆ, I.; SOKOLOVIĆ, D.; KOSTIĆ, G.; JEVTIĆ, T.; BJELAKOVIĆ, G., “The importance of the erythrocytes osmotic fragility test performed in children with indirect hyperbilirubinemia”, *Acta Medica Medianae*, 2005, **44**(3), 47-51.
9. KORONES, D.; PEARSON, H. A., “Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis”. *J. Pediatr.*, 1989, **114**(2), 264-266.
10. ROPER, D.; LAYTON, M., “Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities”, en LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I., *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 10.^a ed., Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 2006, p. 205-237.
11. LAZARTE, S. S.; LERI DE NOFAL, M.; JIMÉNEZ, C.; HARO, A. C.; BURGOS, M.; ISSÉ, B., “Resistencia osmótica eritrocitaria en el diagnóstico de anemias hereditarias en Tucumán, Argentina”, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2012, **46**(4), 645-53.
12. MPIANA, P. T., *et al.*, “In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes”, *Blood Transfus*, 2010, **8**(4), 248-254, doi 10.2450/2009.0120-09.
13. LEWIS, S.; BAIN, B.; BATES, I., *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 8.^a ed., Churchill Livingstone, 2006.
14. PALACIOS RUIZ, H., *Papel de los factores endoteliales en la drepanocitosis*, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, 2013.