

ESTUDIO PRELIMINAR DE LOS EFECTOS DE LAS RADIACIONES GAMMA SOBRE LOS GLÓBULOS ROJOS HUMANOS

PRELIMINAR STUDY OF THE EFFECTS OF GAMMA RADIATIONS ON HUMAN RED BLOOD CELLS

E. Estrada^{1,2,3}, H. Castellini¹, A. Acosta⁴, L. Di Tullio⁴, J. Borraz⁴, A. Chinellato⁴, I. Tack⁴, M. D'Arrigo², B. Riquelme^{2,3} y M. E. Galassi^{*1,3}

¹Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario (UNR),
Av. Pellegrini 250 (S2000), Rosario, Santa Fe, Argentina.

²Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR),
Suipacha 531 (S2002LRK), Rosario, Santa Fe, Argentina.

³Grupo de Física Biomédica, Instituto de Física Rosario IFIR (CONICET-UNR),
Bv. 27 de febrero 210 Bis (S2000EKF), Rosario, Santa Fe, Argentina.

⁴Centro Regional de Hemoterapia, Lavalle 356 (S2002MNB), Rosario, Santa Fe, Argentina.

Recibido: 25/03/2020; Aceptado: 27/05/2020

En este estudio se analizaron los parámetros viscoelásticos y de agregación en glóbulos rojos humanos sometidos a los procedimientos habituales de irradiación gamma con fines transfusionales. Las muestras fueron irradiadas a diferentes dosis a fin de determinar los posibles cambios hemorreológicos que pudieran afectar a la salud de los pacientes y su relación con las modificaciones bioquímicas observadas. Los resultados obtenidos muestran alteraciones en el tiempo de agregación, en la viscosidad superficial de membrana y en el tamaño de los agregados eritrocitarios en las muestras irradiadas, sugiriendo que el daño producido por la radiación ionizante afecta a las propiedades físicas de la membrana del glóbulo rojo en diferentes niveles.

Palabras clave: eritrocito, radiación gamma, viscoelasticidad.

In this study, the alterations in viscoelastic and aggregation parameters of red blood cells were analyzed for usual gamma irradiation procedures for transfusion purposes. In order to determine possible hemorheological changes that may affect the health of patients and their relationship with the biochemical changes observed, the blood samples were irradiated at different doses. The results show alterations in the erythrocyte aggregation time, in the membrane surface viscosity and in the size of the aggregates in the irradiated samples, suggesting that the damage produced by the ionizing radiation affects the physical properties of red blood cell membrane at different levels.

Keywords: erythrocyte, gamma radiation, viscoelasticity.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2020.31.2.51>



ISSN 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

Las transfusiones de sangre son esenciales en muchos tratamientos médicos. Sin embargo, en determinados casos pueden producir la Enfermedad de Injerto Contra el Huésped (EICH). La EICH (de alta letalidad) es una respuesta inadecuada del sistema inmune del receptor ocasionada por la presencia de linfocitos T del donante en los hemocomponentes. Los protocolos internacionales [1] proponen irradiar las unidades de sangre como tratamiento más efectivo para evitar esta patología, ya que produce la muerte o inactivación de estos linfocitos al dañar el ADN contenido en el núcleo de dichas células. Los glóbulos rojos no sufren el mismo daño (GR, eritrocitos) ya que, a diferencia de los linfocitos, estas células sanguíneas no contienen núcleo. Las radiaciones ionizantes, tales como los rayos gamma, tienen diferentes efectos biológicos en diferentes tipos de células. Las dosis de radiación gamma recomendadas por protocolos internacionales (para lograr la inactivación

de los linfocitos T) varían entre 25 y 50 Gy. Estos procedimientos reducen el tiempo de viabilidad de las unidades de sangre, pasando de 42 días (para unidades no irradiadas) a 28 días. En el caso de irradiación de la sangre, los cambios en los parámetros bioquímicos han sido muy bien estudiados y se vinculan a cambios en la permeabilidad de la membrana de los GR. Sin embargo, poco es conocido respecto a alteraciones en los parámetros físicos tales como la agregación eritrocitaria y la viscoelasticidad de la membrana.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio de las alteraciones en los parámetros físicos de glóbulos rojos sometidos a diferentes dosis de radiación gamma bajo los procedimientos habituales utilizados en el Centro Regional de Hemoterapia (CRH), que abastece al departamento Rosario de la provincia de Santa Fe.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los parámetros viscoelásticos de la membrana de GR expuestos a fotones de alta energía se determinaron utilizando

* galassi@fceia.unr.edu.ar

un Reómetro Eritrocitario [2]. Para la evaluación de las posibles alteraciones en los parámetros de agregación eritrocitaria se utilizó un agregómetro de chip óptico [3]. Mediante la toma de imágenes digitales con una cámara digital acoplada a un microscopio invertido [4] se observó la morfología de los GR y de los agregados que forman para evaluar si la radiación gamma aplicada producía algún cambio en las mismas.

Muestras de sangre

Se realizaron tres extracciones no simultáneas de sangre entera de un donante sano. Cada muestra fue dividida en dos alícuotas, una destinada para control y otra para irradiación.

Las extracciones de muestras de sangre fueron realizadas en donantes en ayuno, entre las 8:00 y las 10:00 am en un ambiente tranquilo a temperatura ambiente, después de un período de descanso de 10 minutos y en una posición sentada, de acuerdo con las recomendaciones internacionales [5]. Los anticoagulantes utilizados fueron EDTA (1,5 a 1,8 mg/ml) para las determinaciones hemorreológicas y heparina de litio (14 a 15 U/ml) para la determinación de iones en plasma [6].

Irradiación de las muestras

Las muestras de sangre fueron irradiadas en el irradiador del servicio del Centro Regional de Hemoterapia de Rosario (equipo BioBeam GM 8000 desarrollado por la empresa alemana Gamma-Service Medical GmbH). Esta facilidad posee una fuente de Cs-137 (emisión de pico en 661,7 keV) y es utilizada ampliamente en tratamientos transfusionales y en investigación [7]. La actividad de la fuente radiactiva fue de 66,1 TBq al momento de realización de esta investigación (actividad de referencia: 80,7 TBq inspección técnica 12/12/2010).

Las muestras fueron irradiadas con rayos gamma, en dosis entre 1,5 y 25 Gy. La dosis máxima en cada ensayo se verificó mediante el uso de films radiocrómicos. La distribución de dosis en la facilidad, de acuerdo a reportes técnicos, es similar a la distribución informada por el fabricante [8]. Se utilizó un contenedor cilíndrico (ver Fig. 1) diseñado para rotar en el interior del BioBeam GM 8000 a fin de lograr la mayor uniformidad de la dosis en su interior. De acuerdo a datos del fabricante, el perfil de dosis absorbida medida dentro del contenedor cilíndrico muestra una diferencia de 10% entre el centro y a distancia de un semi-radio y 20% entre el centro y el límite del recipiente.

Para garantizar una diferencia de no más del 5% en la dosis absorbida por las muestras, los tubos conteniendo alícuotas de cada muestra fueron ubicados en un soporte especialmente diseñado, quedando a menos de medio radio del eje central y a mitad de altura del cilindro (para irradiación con fuente oscilante) [7]. El soporte se confeccionó utilizando polimetilmetacrilato (densidad $(1,17 \pm 0,02) \text{ g/cm}^3$, índice de refracción 1,49 para longitud de onda de $589,3 \mu\text{m}$) [9] el cual se observa en la derecha de la Fig. 1. Para lograr la uniformidad interna de la dosis se completó el cilindro metálico con agua destilada a temperatura ambiente (tal como propone el protocolo de irradiación de unidades de sangre utilizando estos equipos).



FIG. 1: Contenedor cilíndrico para irradiaciones de unidades de sangre (izquierda) y portamuestras confeccionado para los ensayos con muestras pequeñas (derecha).

Reómetro Eritrocitario

Los parámetros reológicos de la membrana eritrocitaria se determinaron mediante la técnica de difracción láser utilizando el Reómetro Eritrocitario [2] del Grupo de Física Biomédica del IFIR. Este equipo realiza determinaciones durante el proceso de deformación de los GR sometidos a tensiones de corte dentro del rango fisiológico, en régimen estacionario y en régimen dinámico. Para cada muestra irradiada se determinaron los parámetros viscoelásticos estacionarios y dinámicos, utilizando modelos estadísticos sobre los datos medidos, ya descritos en trabajos previos [10-13]:

- índice de deformabilidad (ID)
- módulo elástico de membrana (μ)
- viscosidad superficial de membrana (η)
- módulo de almacenamiento (G')
- pérdida dinámica (G'')

Agregómetro de chip óptico

El Agregómetro Eritrocitario de Chip Óptico [3] es un equipo que permite, mediante la técnica de transmisión láser, una evaluación rápida y eficaz del fenómeno de agregación eritrocitaria utilizando sólo 15 μL de sangre entera. La evolución temporal del estado de agregación de los GR es función de la intensidad lumínica transmitida. De la curva de intensidad vs. tiempo se obtiene el tiempo mitad ($t_{1/2}$) que corresponde al tiempo que la muestra tarda en alcanzar el 50% de la agregación máxima. También se obtiene el índice de agregación (AI) como el cociente entre el área debajo de la curva de intensidad vs. tiempo y el área total.

Análisis digital de imágenes

La morfología de los agregados de eritrocitos irradiados y de control fueron analizadas a fin de determinar el coeficiente de células aisladas [5, 14]. Las imágenes digitales fueron obtenidas por microscopía óptica convencional

con un Microscopio Óptico Invertido acoplado a una cámara digital mediante un adaptador de 52 mm. El porcentaje de células aisladas (o no agregadas) fue determinado con una suspensión de GR en plasma autólogo al 0,3% en un portaobjeto luego de 5 minutos, para las diferentes dosis de las tres muestras de sangre analizadas.

Concentración iones en plasma

La determinación de la concentración de iones se realizó mediante el método de electrodos selectivos de iones cloruro o sodio. En este método se utiliza un sensor que convierte la actividad de un ion específico disuelto en una solución en un potencial eléctrico, el cual se puede medir con un voltímetro o PHmetro. En esta investigación fue utilizado este método de ion selectivo ya que, a diferencia de la fotometría de llama, no es un ensayo destructivo.

III. RESULTADOS

Parámetros viscoelásticos

Mediante los ensayos viscoelásticos se obtuvieron los parámetros ID, μ , η , G' y G'' a las frecuencias de oscilación 0,5; 1,0 y 1,5 Hz (correspondientes a los ciclos fisiológicos). Sólo se observaron diferencias significativas en los valores medios de la viscosidad superficial de membrana en función de la dosis absorbida.

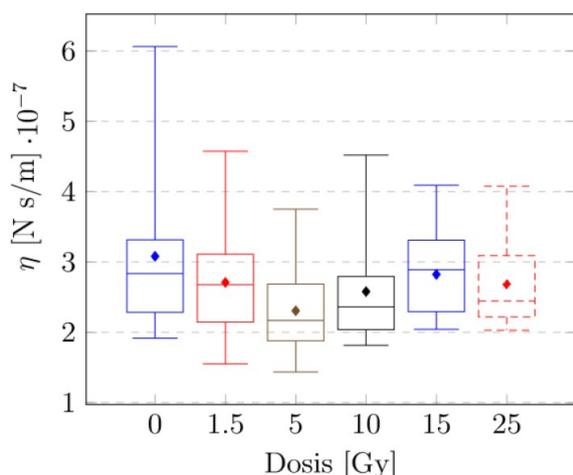


FIG. 2: Viscosidad superficial de membrana de GR versus dosis de irradiación.

Tal como se observa en la Fig. 2, el valor de η es menor en las muestras irradiadas respecto al control, con diferencias más significativas para dosis de 5 y 10 Gy. Los módulos G' y G'' (resultados no presentados) no variaron significativamente con respecto al control en el intervalo de dosis de 0 a 25 Gy. Los coeficientes ID y μ tampoco presentaron alteraciones significativas entre las muestras irradiadas y los respectivos controles (resultados no presentados).

Parámetros de agregación

En la Fig. 3 se presentan los resultados correspondientes al tiempo-mitad de agregación ($t_{1/2}$), el cual varía con la dosis de radiación gamma suministrada.

Se observa además una reducción del valor de $t_{1/2}$ en el intervalo entre 1,5 y 10 Gy y un incremento en las dosis de 15 y 25 Gy, pero sin llegar a superar el valor de referencia del control (0 Gy).

El índice de agregación (AI) no fue alterado significativamente por las dosis de radiación gamma entregadas y tampoco se observaron diferencias significativas en los ensayos justo después de irradiar o un día después de irradiar (resultados no presentados).

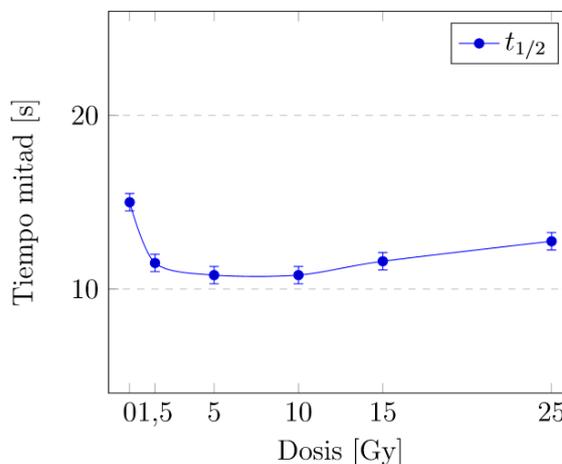


FIG. 3: Tiempo mitad o tiempo de semi-agregación de GR versus dosis de irradiación.

Porcentaje de células aisladas

En la Fig. 4 se muestran los valores medios del porcentaje de células aisladas en función de la dosis absorbida para las tres muestras analizadas, observando variaciones significativas a distintas horas transcurridas entre la irradiación y la toma de imágenes.

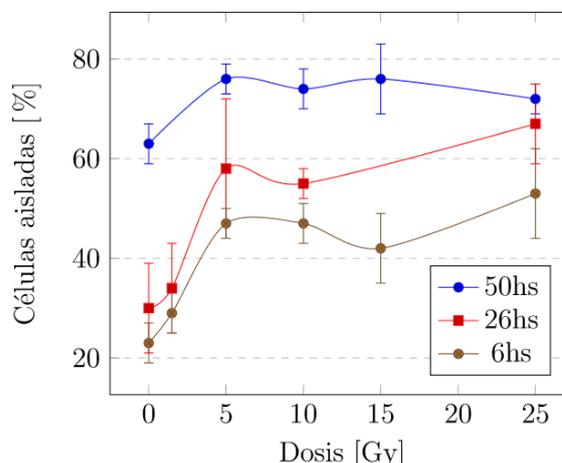


FIG. 4: Valores medios del porcentaje de células aisladas para tres muestras en función de las dosis de irradiación determinados a diferentes tiempos post-irradiación.

Iones en solución

En la Fig. 5 se observa la concentración de iones de potasio, sodio y glucosa, 22 horas luego de la irradiación. A mayor dosis es mayor la concentración de potasio; mientras que la concentración de sodio se redujo al incrementarse la dosis. Estos resultados coinciden con lo indicado en bibliografía sobre almacenamiento de muestras de sangre irradiadas [15], relacionados a daños de la membrana que alteran la bomba sodio-potasio de la célula.

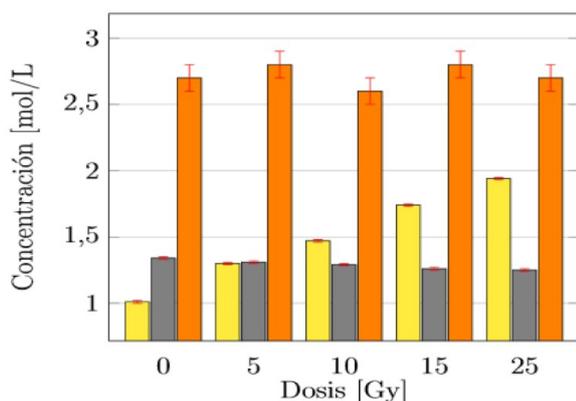


FIG. 5: Concentración de iones en plasma sanguíneo 22 hs después de la irradiación para diferentes dosis. Amarillo: potasio (centimoles por litro). Gris: sodio (decimoles por litro). Naranja: glucosa (milimoles por litro).

IV. CONCLUSIONES

Las determinaciones con el Reómetro Eritrocitario no han mostrado alteraciones significativas en las propiedades viscoelásticas de los eritrocitos, con excepción de la viscosidad superficial de membrana (η) que presenta alteraciones significativas ($p < 0,05$). Estos resultados indicarían que el daño se produce en la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la misma.

Los resultados obtenidos con el agregómetro de chip óptico indican que, si bien el índice de Agregación (AI) no mostró alteraciones significativas, el tiempo-mitad ($t_{1/2}$) fue alterado significativamente por el efecto de la irradiación. Este resultado indica que la velocidad de agregación es afectada por la radiación en forma dosis-dependiente. Analizando las imágenes digitales se observó una longitud de los agregados (también conocidos como *rouleaux*) mucho menor en las muestras irradiadas, lo que sumado al fenómeno de reducción del tiempo de agregación daría indicios de que el daño indirecto por la radiación ionizante redujo la capacidad de formar los agregados extensos. Esta alteración en la agregación eritrocitaria sugiere un deterioro del glicocáliz de la membrana eritrocitaria.

El análisis de la concentración de iones en el plasma verificó un aumento en la concentración de potasio y disminución en la concentración de sodio, más significativas para mayores dosis. La alteración de este parámetro bioquímico confirma que el daño por irradiación de las muestras ensayadas concuerda con la bibliografía, disminuyendo la duración de las unidades de sangre a transfundir.

Estos resultados confirman que los daños a los GR por la irradiación protocolar en los bancos de sangre producen alteraciones en las membranas que no se revierten en el tiempo. La continuación de estas investigaciones podría permitir mejorar los protocolos a fin de prolongar la vida útil de las unidades de sangre para transfusión.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos fueron realizados gracias a subsidio otorgado por la UNR a través del Proyecto PIP ING 515. Los autores agradecen al Centro Regional de Hemoterapia de Rosario (CRH) por la cooperación técnica y la disponibilidad

de la facilidad para la irradiación de las muestras de sangre. E.E. agradece a la FCEIA por la beca de iniciación a la investigación otorgada en 2019.

REFERENCIAS

- [1] J. Castelino, P. Holland, O. Jacobs, M. Lapidot y M. Markovic. Effects of ionizing radiation on blood and blood components: A Survey. International Atomic Energy Agency - TECDOC Series **934** (1997).
- [2] 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).
- [3] 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).
- [4] A. B. Fontana, N. Lerda, M. M. Delannoy, A. C. Alessi y B. D. Riquelme. Técnica de cuantificación de la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **46**, 47-52 (2012).
- [5] O. Baskurt, M. Boynard, G. Coket, P. Connes, B. M. Cokke, S. Forconi, F. Liao, M. Hardeman, F. Jung, H. Meiselman y col. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **42**, 75-97 (2009).
- [6] L. Moggi. Hemorreología y microcirculación. *Rev. Argent. Anestesiol.* **69**, 61-84 (2011).
- [7] S. Shamsudin, A. Abu Hassan, Z. Ahmad, A. R. Harun y A. Dzomir. Development of Irradiation Procedure for Gamma Irradiation Chamber Bio beam GM 8000. Nuclear Technical Convention 2015, Malaysia (2015).
- [8] T. Ahbrizal, A. Nur Hafizati, A. Halim Wan y S. Wan Abdullah. Evaluation of Dose Distribution on Gamma Cell Bio beam GM8000 Using TLD 100 Chip. International Nuclear Information System (IAEA) (2016).
- [9] J. Hubbell y S. Seltzer. Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients from 1 keV to 20 MeV for Elements Z = 1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest. *Radiation Physics Division, NIST* (2004).
- [10] B. Riquelme y R. J. Rasia. Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano. *Anales AFA* **9**, 255-259 (1997).
- [11] H. Castellini, B. Riquelme, P. Foresto y J. Valverde. Estudio del Comportamiento Viscoelástico No Lineal de la Membrana del Glóbulo Rojo. *Anales AFA* **20**, 219-223 (2008).
- [12] B. D. Riquelme, J. Valverde y R. J. Rasia. Complex viscoelasticity of normal and lectin treated erythrocytes using laser diffractometry. *Biorheology* **35**, 325-334 (1998).
- [13] B. Riquelme, J. Valverde y R. J. Rasia. Optical method to determine the complex viscoelasticity parameters of human red blood cells. Medical diagnostic techniques and procedures. New Delhi: Narosa Publishing House, 249-255 (1999).
- [14] P. Ponce De León, G. Del Balzo y B. Riquelme. Biorheological action of *Ascaris lumbricoides* larvae on human erythrocytes. *Cell Biochem. Biophys.* **65**, 237-242 (2013).
- [15] F. Adams, G. Bellairs, A. R. Bird y O. O. Oguntibeju. Biochemical storage lesions occurring in nonirradiated and irradiated red blood cells: a brief review. *BioMed. Res. Int.* **2015** (2015).