

# Estudio espectroscópico de glóbulos rojos mediante microscopía confocal en pacientes con talasemia

Laura Rey-Barroso<sup>1\*</sup>, Mónica Roldán<sup>2</sup>, Francisco J. Burgos-Fernández<sup>1</sup>, Susanna Gassiot<sup>3</sup>, Anna Ruiz-Llobet<sup>3</sup>, Ignacio Isola<sup>3</sup>, Jaume Pujol<sup>1</sup> y Meritxell Vilaseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Desarrollo de Sensores, Instrumentación y Sistemas. Rambla de Sant Nebridi 10, Terrassa*

<sup>2</sup>*Unitat de Microscòpia Confocal. Servei d'Anatomia Patològica. Institut Pediàtric de Malalties Rares. Hospital Sant Joan de Déu. Paseo de San Juan de Dios 2, Esplugues de Llobregat.*

<sup>3</sup>*Laboratori d'hematologia. Servei de diagnòstic de laboratori, Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu. Paseo de San Juan de Dios 2, Esplugues de Llobregat.*

<sup>4</sup>*Servei d'hematologia pediàtrica. Hospital Sant Joan de Déu. Paseo de San Juan de Dios 2, Esplugues de Llobregat.*

<https://www.cd6.upc.edu>

## 1. Introducción

Las alteraciones de los glóbulos rojos pueden provocar enfermedades sanguíneas muy severas si no se diagnostican a tiempo, siendo especialmente sensible y crítico el diagnóstico en población infantil. Los glóbulos rojos, también llamados hematíes o eritrocitos, son células bicóncavas con un volumen medio de 90 a 95 micrómetros cúbicos, con gran capacidad para deformarse de manera reversible al atravesar los vasos sanguíneos durante el transporte del oxígeno a través del organismo. La proteína hemoglobina en los eritrocitos es la encargada de unirse al oxígeno en la sangre, gracias al grupo hemo en cada una de las cadenas polipeptídicas (globinas) de su estructura cuaternaria que está formada por dos tipos de cadenas de globina: 2 alfa y 2 beta. Cambios en la producción de dichas cadenas ocasionan defectos en los glóbulos rojos que pueden tener unas manifestaciones muy variables en los individuos: desde ser asintomáticas o presentar leves alteraciones analíticas, hasta presentar anemias importantes con elevada morbi-mortalidad y mala calidad de vida. En las formas graves de estas enfermedades, el trasplante de progenitores hematopoyéticos es la única opción curativa; esto es, de células madre de la médula ósea capaces de diferenciarse en los diferentes tipos de células sanguíneas [1].

La síntesis de la hemoglobina puede estar alterada de forma cuantitativa como en las talasemias o cualitativa, como en las hemoglobinopatías estructurales (drepanocitosis o anemia de células falciformes) [2]. En la talasemia, la síntesis de la hemoglobina está alterada cuantitativamente. La producción de uno de los tipos de cadena de globina se ve modificada, ocasionando el déficit o la ausencia total de una de ellas. Por ejemplo, en la alfa-talasemia existe un déficit cuantitativo de las cadenas de alfa-globina con un desequilibrio que da lugar a un exceso de cadenas beta, que termina con la agregación de éstas y la alteración del glóbulo rojo. El espectro de presentación de las talasemias va desde formas leves que sólo se presentan con disminución del tamaño de los glóbulos rojos (microcitosis), a formas graves con destrucción prematura de los glóbulos rojos, y anemia intensa que requiere transfusiones de glóbulos rojos periódicas de por vida o incluso trasplante de médula ósea.

En los laboratorios de hematología, la morfología de sangre en microscopio óptico convencional es fundamental en el diagnóstico de esta enfermedad, así como las características de un hemograma o incluso complejos estudios genéticos del individuo. Incluso disponiendo de estos recursos, a veces estas enfermedades no se pueden diagnosticar de forma directa [3]. Por ello, diversos estudios han tratado de analizar las características de emisión y absorción de los glóbulos rojos de pacientes con talasemia para intentar establecer diferencias en la absorción y/o fluorescencia en rangos ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarrojo (IR). Los autores han utilizado espectrómetros [4, 5], espectrofluorómetros [6,7] y microscopios confocales [8], iluminando las muestras generalmente en el azul cercano o ultravioleta, y recogiendo la

---

\* e-mail: laura.rey.barroso@upc.edu

emisión generalmente entre 200 nm y 700 nm, previamente habiendo añadido anticoagulantes y/o soluciones salinas a las muestras y, en algunos casos, purificando las muestras de glóbulos rojos. La ventaja del uso del microscopio confocal frente a las otras técnicas más convencionales (espectrofluorómetros, espectrómetros, microscopio convencional, etc.) es que se puede recoger la señal de cada punto de la muestra, excitándola punto a punto de tal manera que se puede realizar imagen de la emisión y de la reflectancia de la misma, con distintos formatos. También es posible focalizar el plano de excitación a una profundidad concreta de la muestra pudiendo obtener imágenes tridimensionales de los glóbulos rojos. Además, se puede excitar los diferentes fluorocromos disponibles en el mercado si se han marcado estructuras mediante el uso de anticuerpos, gracias a la luz de excitación laser a diferentes bandas de que dispone.

Ante la necesidad actual de un diagnóstico rápido y eficaz de las enfermedades descritas, el objetivo de este trabajo consiste en estudiar las posibilidades del microscopio confocal como herramienta de diagnóstico. Para ello, se han evaluado muestras de sangre de pacientes con alfa-talasemias de diferentes grados; de pacientes con anemia ferropénica, una enfermedad en la que está alterado el transporte de oxígeno por la mala absorción o pérdida de hierro; [9] y de pacientes sanos mediante un microscopio confocal con resolución espectral para detectar posibles diferencias a nivel tanto morfológico como espectral.

## 2. Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron con muestras de sangre en fresco recién extraídas de cinco pacientes pediátricos de 1 a 17 años de edad: un paciente control, TC, con hemoglobina (Hb) 14,1 g/dL y volumen corpuscular medio (VCM) 87; un paciente con alfa-talasemia de tipo grave, T1, con Hb 7,8 g/dL y VCM 68; dos pacientes con alfa-talasemias de tipo moderado, T2, con Hb 3,7 g/dL y VCM 74, y T3, con Hb 10,8 g/dL y VCM 63; y un paciente con anemia de tipo ferropénica, TA, con Hb 9,9 g/dL y VCM 81. Se depositaron aproximadamente 500  $\mu$ L de la muestra TC en una placa normal tipo Ibidi, y la misma cantidad de las muestras T1, T2, T3 y TA en placas especiales Nirco, las cuales incorporan pequeños filamentos para mejorar la adherencia de los cuerpos celulares y evitar el movimiento durante la medición.

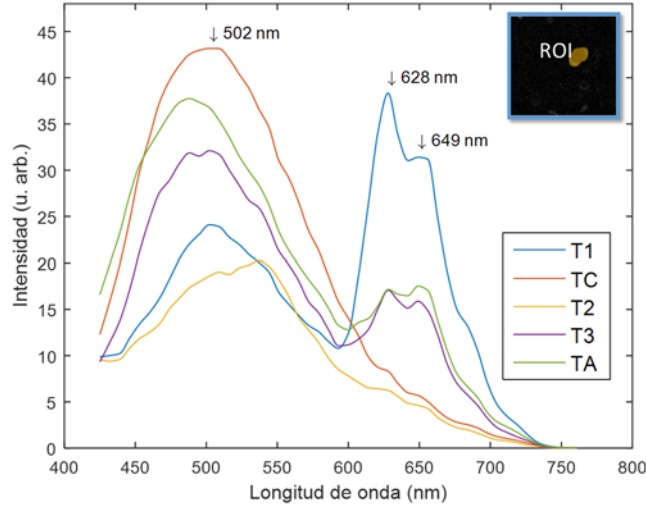
Las muestras se analizaron con un microscopio confocal con superresolución modelo Leica TCS SP8 STED 3x (Leica Microsystems) que incorpora dos láseres, uno de 405 nm y otro blanco sintonizable que emite de 470 nm a 670 nm para la excitación de la muestra en fresco o marcada con diferentes fluorocromos. También cuenta con tres láseres de depleción a 592 nm, 660 nm y 775 nm para de-excitar la parte exterior de las moléculas y poder visualizar de forma detallada estructuras a nivel nanométrico. Además, incluye detectores tipo tubos fotomultiplicadores y detectores híbridos, que incrementan más o menos los fotones dependiendo de la energía que transporten. Estos detectores son capaces de detectar señal proveniente de la muestra de 400 nm a 800 nm.

Las placas se montaron dentro la cabina implementada en el microscopio con control de temperatura y CO<sub>2</sub> preestablecidos para células vivas. Se utilizó un objetivo de aceite 63x para obtener suficiente señal de autofluorescencia de las células y al mismo tiempo conseguir un campo de visión lo suficientemente grande para analizar el mayor número ellas; este se fijó y se fue desplazando por toda la muestra para evaluar la uniformidad de la emisión. El formato de imagen elegido fue de 400 píxeles x 400 píxeles mediante un agujero estenopecoico de 4 AU. A continuación, se excitó cada muestra con el láser de 405 nm al 65% de su potencia total y se captaron imágenes de la emisión de la muestra desde 425 nm a 861 nm en pasos de 7 nm para evaluar su autofluorescencia. La excitación y la detección de la emisión se realizó a una velocidad galvanométrica de 1000 Hz bidireccional para evitar captar el movimiento de las células vivas y al mismo tiempo obtener la mayor cantidad de señal posible.

## 3. Resultados

La Fig. 1 muestra la autofluorescencia de las muestras analizadas mediante su espectro de emisión, considerando en todos los casos varios globulos rojos como regiones de interés (ROIs). En el espectro medio de los glóbulos rojos se observó un pico de emisión común alrededor de 502 nm, aunque para la muestra T2 se desplazó hacia 550 nm, aproximadamente. Además, las muestras T1, T3 y TA mostraron una elevada emisión entorno a los 628 nm y a 649 nm. La intensidad de estos tres picos fue diferente para las cinco muestras. Por otro lado, se observó que las muestras montadas en las placas Nirco presentaban

menos movimiento durante la captación que las montadas en las placas Ibidi, lo que hace a las primeras más adecuadas para la medida de muestras en fresco.

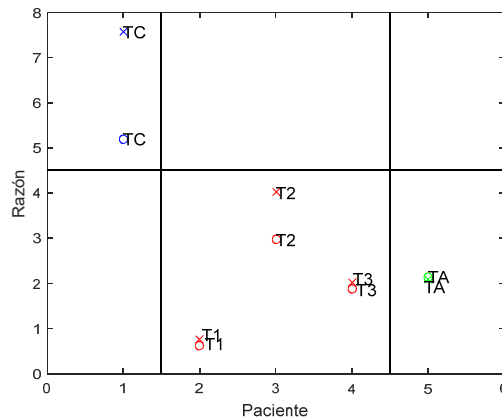


**Figura 1:** Curvas de la emisión media por autofluorescencia sobre las regiones de interés (ROI) seleccionadas correspondientes a glóbulos rojos. TC: paciente control; T1: paciente con alfa-talasemia de tipo grave; T2 y T3: pacientes con alfa-talasemias de tipo moderado; TA: paciente con anemia de tipo ferropénica.

Según el estudio de AlSalhi et al. [6], la emisión a 628 nm se debe a la molécula de porfirina en el grupo hemo la cual es responsable del color rojo de los glóbulos rojos. Estos resultados preliminares parecen indicar que esta molécula podría encontrarse en mayor cantidad en los pacientes afectados por alfa-talasemia y anemia ferropénica. Con el propósito de cuantificar este fenómeno, se calculó la razón entre la intensidad de la emisión a 502 nm y la encontrada a 628 nm y 649 nm; esta aproximación ha dado buenos resultados en estudios similares, permitiendo clasificar ciertas alteraciones sanguíneas [7]. En la Tabla 1 se puede observar que cuanto mayor es la gravedad de la alfa-talasemia, menores son los índices calculados, obteniendo el mayor valor para el paciente control (TC) y el menor para el paciente con alfa-talasemia de tipo grave (T1). Las alfa-talasemias moderadas (T2 y T3) presentan valores intermedios y similares a los del paciente con anemia ferropénica (TA). La Fig. 2 muestra de forma gráfica los resultados de la Tabla 1; se puede apreciar como las diferentes afectaciones quedan diferenciadas para las dos razones calculadas.

Razón	TC	T1	T2	T3	TA
$I_{502}/I_{628}$	5,19	0,63	2,97	1,88	2,14
$I_{502}/I_{649}$	7,57	0,77	4,01	2,02	2,10

**Tabla 1:** Razones de los picos principales de la emisión ( $I_i$ : intensidad a diferentes longitudes de onda).



**Figura 2:** Representación gráfica de las razones de los picos principales de la emisión. Los puntos sólidos representan los valores de  $I_{502}/I_{628}$ , mientras que los puntos en forma de cruz corresponden a  $I_{502}/I_{649}$ .

#### 4. Conclusiones

En este trabajo se ha utilizado un microscopio confocal de barrido espectral para la evaluación de muestras sanguíneas afectadas por alfa-talasemias y anemia ferropénica, las cuales son difíciles de diagnosticar mediante las técnicas actuales. Se han detectado dos picos de emisión de fluorescencia a 628 nm y 649 nm que no aparecieron en el paciente control cuando se excita a 405 nm. A partir de la intensidad a esas longitudes de onda y la encontrada en todas las muestras a 502 nm se han calculado dos índices que, de forma preliminar, permiten discriminar entre las distintas patologías y grado de severidad, especialmente las alfa-talasemias. El trabajo futuro consistirá en ampliar el conjunto de muestras tanto de alfa-talasemias como de anemias ferropénicas para corroborar la efectividad de las razones descritas. Esto podría permitir la racionalización del uso de las técnicas de laboratorio, pudiendo establecer un primer cribado que dirigiera a la hora de solicitar posteriores estudios genéticos de confirmación, los cuales son costosos y técnicamente complejos. Una potencial utilidad sería poder predecir complicaciones que requirieran aplicar estrategias terapéuticas agresivas de manera precoz, así como cuantificar mejor la respuesta al tratamiento.

**Agradecimientos:** Al Ministerio de Economía y Empresa por la financiación del proyecto DPI2017-89414-R.

#### Bibliografía

- [1] D. Provan, T. Baglin, I. Dokal, J. de Vos, *Manual de Hematología Clínica* (Oxford University Press, Oxford, 2015).
- [2] L. B. Jorde, *Genética Médica* (Elsevier España, Madrid, 2005).
- [3] de Oliveira, S., Saldanha, C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010, 44, 63-74.
- [4] Akuwudike, A.R.; Chikezie, P.C.; Chilaka, F. Absorption Spectra of Normal Adult and Sickle Cell Hemoglobin Treated with Hydrogen Peroxide at Two pH Values. *Iranian J. Blood & Cancer* 2011, 5, 129-135
- [5] Gunasekaran, S.; Natarajan, R.K.; Renganayaki, V. UV Visible Spectrophotometric Approach and Absorption Model for the Discrimination of Diseased Blood. *Asian J. Chem.* 2008, 20, 48-54.
- [6] AlSalhi, M.S. AlGahtani, F.H., Devanesan, S., Trinkka, V.M., Jeyaprakash, K.; AlSaeed, A.H.; Masilamani, V. Spectral detection of thalassemia: a preliminary study. *J. Biom. Sci.* 2014, 21, 129-135.
- [7] Sandhanasamy, D.; AlSalhi, M.S.; Mani, R.; Kantharaj, P.; Saradh, P.; H. Al-Saeed, A.; Siddanna R.P.; Karuppaiah J.; Vadivel, M. Fluorescence spectral classification of iron deficiency anemia and thalassemia. *J. Biomed. Optics* 2014, 19, 129-135.
- [8] Khungwanmaythawee, K.; Sornjai, W.; Paemanee, A.; Jaratsittisin, J.; Fucharoen, S.; Svasti, S.; Lithanatudom, P.; Roytrakul, S.; Smith, D.R. Mitochondrial Changes in  $\beta$ 0-Thalassemia/Hb E Disease. *PLoS One*, 2016, 11.
- [9] J. F. San Miguel, *Cuestiones en Hematología* (Elsevier España, Madrid, 2002).