

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

Laura Rey-Barroso^{1*}, Mónica Roldán², Francisco J. Burgos-Fernández¹, Susanna Gassiot³, Anna Ruiz-Llobet³, Ignacio Isola³, Jaume Pujol¹ y Meritxell Vilaseca¹

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

²*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.*

³*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.*

⁴*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 (GRs) son células bicóncavas con un volumen medio de 90 a 95 μm^3 que contienen hemoglobina, una proteína que se encarga del transporte del oxígeno por el organismo. Dicha proteína tiene una estructura cuaternaria formada mayoritariamente por dos tipos de cadenas polipeptídicas (globinas): 2 alfa y 2 beta. Éstas se unen al oxígeno gracias al grupo hemo presente en cada una de ellas. Cambios en la producción de dichas cadenas ocasionan defectos en los GRs que pueden tener unas manifestaciones muy variables en los individuos: asintomáticas, leves alteraciones analíticas o anemias importantes con elevada morbi-mortalidad y mala calidad de vida. En las formas graves, el trasplante de células madre de la médula ósea es la única opción curativa [1].

La síntesis de la hemoglobina puede alterarse de forma cuantitativa, como en las talasemias, o cualitativa, como en las hemoglobinopatías estructurales [2]. En la talasemia, 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 presentan una disminución del tamaño de los GRs (microcitosis), a formas graves con destrucción prematura de los mismos, que ocasiona una anemia intensa, requiriéndose transfusiones de GRs periódicas de por vida o incluso trasplante de médula ósea [3].

La morfología de sangre bajo microscopía óptica convencional es fundamental en el diagnóstico de la talasemia, así como un hemograma o incluso complejos estudios genéticos. Aun así, a veces esta no se puede diagnosticar de forma directa [4]. Por ello, diversos estudios han analizado la emisión y absorción de los GRs de pacientes con talasemia para intentar establecer diferencias espectrales en los rangos ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarrojo (IR). Se han utilizado espectrómetros [5,6], espectrofluorómetros [7,8] y microscopios confocales [9], iluminando las muestras en el azul cercano o UV y recogiendo la emisión entre 200 nm y 700 nm, mediante el uso de anticoagulantes, soluciones salinas y/o purificando las muestras. La ventaja del microscopio confocal es que excita y recoge la señal de cada punto de la muestra de tal manera que realiza imagen de la emisión y de la reflectancia de la misma. También es posible focalizar el plano de excitación a una profundidad concreta, obteniendo imágenes tridimensionales. Además, se pueden utilizar diferentes fluorocromos para marcar diferentes estructuras, los cuales se pueden visualizar gracias a que presentan espectros de excitación y emisión característicos.

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

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 un paciente con anemia ferropénica, una enfermedad en la que está alterado el transporte de oxígeno por la mala absorción o pérdida de hierro [10] y de un paciente sano para detectar posibles diferencias a nivel 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 fl; un paciente con alfa-talasemia de tipo grave, T1, con Hb 7,8 g/dL y VCM 68 fl; dos pacientes con alfa-talasemias de tipo leve-moderado, T2, con Hb 10,4 g/dL y VCM 74 fl, y T3, con Hb 10,8 g/dL y VCM 63 fl; y un paciente con anemia de tipo ferropénica, TA, con Hb 9,9 g/dL y VCM 81 fl. Se depositaron aproximadamente 500 μ L de la muestra TC en una placa estándar para microscopía (Ibidi, Munich, Germany) y la misma cantidad de las muestras T1, T2, T3 y TA en placas adherentes (Nirco S.L., Barcelona, España). Dichos experimentos se llevaron a cabo en el Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, España). Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado antes de cualquier prueba y previamente se obtuvo la aprobación del estudio por parte del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) de la Fundació Sant Joan de Déu.

Las muestras se analizaron mediante un microscopio confocal con superresolución Leica TCS SP8 STED 3x (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado con una unidad de detección espectral. Las placas se visualizaron dentro la cabina implementada en el microscopio con control de temperatura y CO₂ preestablecidos para células vivas. Se utilizó un objetivo de aceite Plan Apo 63x/1.4 y se captaron imágenes de 82 μ m x 82 μ m 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. Para el estudio espectral se ha utilizado el láser de diodo de 405 nm y se ha recogido la emisión de 425 nm a 780 nm (paso espectral = 7nm), utilizando detectores híbridos de gran sensibilidad. Para obtener los espectros de emisión se realizaron series de imágenes xy λ que mostraron la intensidad de fluorescencia para cada intervalo de emisión predeterminado, obteniendo espectros reales de emisión de las muestras. La captación se realizó a una velocidad de 1000 Hz en bidireccional para evitar artefactos de movimiento celular.

3. Resultados

La Fig. 1 muestra la autofluorescencia de las muestras analizadas mediante su espectro de emisión, considerando en todos los casos varios GRs como regiones de interés (ROIs).

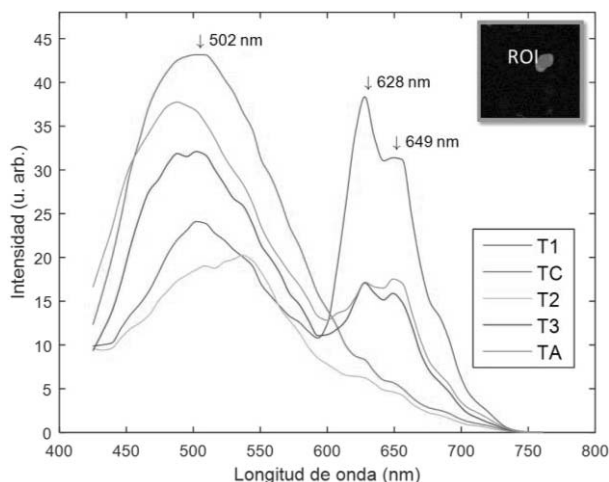


Figura 1: Curvas emisión media de autofluorescencia sobre las ROIs de GRs. TC: paciente control; T1: paciente con alfa-talasemia de tipo grave; T2 y T3: pacientes con alfa-talasemias de tipo moderado; TA: paciente con anemia de tipo ferropénica.

En el espectro medio de los GRs 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 en las placas con recubrimiento (Nirco) presentaban menos movimiento de las células durante la captación que las muestras en las placas sin recubrimiento, lo que hace a las primeras más adecuadas para la medida de muestras en fresco.

Según AlSalhi et al. [7], 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 GRs. La porfirina, es un tipo de pigmento biológico nitrogenado soluble en agua, entre cuyos derivados se incluyen las hemoproteínas (porfirinas combinadas con metales y proteínas). Esto parece indicar que esta molécula podría encontrarse en mayor cantidad en los pacientes afectados por alfa-talasemia y anemia ferropénica [11]. Algunos autores describen como la cantidad de porfirina eritrocítica libre es mayor en los pacientes con anemia ferropénica [12]. 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 permitido clasificar ciertas alteraciones sanguíneas en estudios similares [7]. La Tabla 1 muestra que a mayor gravedad de la alfa-talasemia, menores son los índices calculados, siendo mayor para el paciente control (TC) y 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 aprecia 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_{λ} : intensidad a diferentes longitudes de onda).

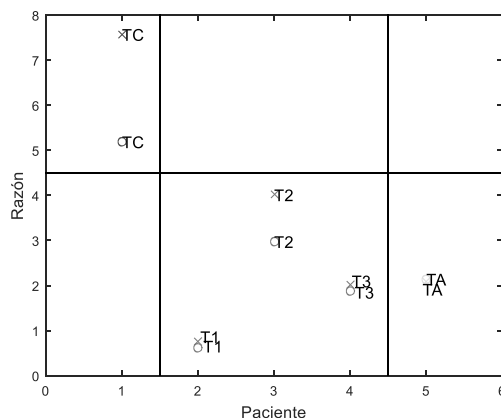


Figura 2: Representación gráfica de las razones de los picos principales de la emisión. Los puntos sólidos representan los valores de I_{502}/I_{628} , mientras que los puntos en forma de cruz corresponden a I_{502}/I_{649} .

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 en 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. En el futuro, la importancia del diagnóstico mediante el uso de tecnologías de

vanguardia y el análisis de imágenes podrá ofrecer al hematólogo un nuevo horizonte cuando se trata de mejorar la estrategia de diagnóstico y orientar al genetista en la búsqueda de genes implicados.

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] L. Carbero, D. Saldívar, E. Cabrillo, *Obstetricia y Medicina Materno-Fetal* (Médica Panamericana, Madrid, 2007).
- [4] S. de Oliveira, C. Saldanha, "An overview about erythrocyte membrane," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **44**, p. 63-74 (2010).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20134094>
- [5] A.R. Akuwudike, P.C. Chikezie, F. Chilaka, "Absorption Spectra of Normal Adult and Sickle Cell Hemoglobin Treated with Hydrogen Peroxide at Two pH Values," *Iranian J. Blood & Cancer*, **5**, p. 129-135 (2011).
<https://www.researchgate.net/publication/236006932>
- [6] S. Gunasekaran, R.K. Natarajan, V. Renganayaki, "UV Visible Spectrophotometric Approach and Absorption Model for the Discrimination of Diseased Blood," *Asian J. Chem.*, **20**, p. 48-54 (2008).
<https://www.researchgate.net/publication/287775760>
- [7] M.S. AlSalhi, F.H. AlGahtani, S. Devanesan, V.M. Trinkka, K. Jeyaprakash, A.H. AlSaeed, V. Masilamani, "Spectral detection of thalassemia: a preliminary study," *J. Biom. Sci.*, **21**, p. 129-135 (2014).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679334>
- [8] D. Sandhanasamy, M.S. AlSalhi, R. Mani, P. Kantharaj, P. Saradh, A. Al-Saeed, R.P. Siddanna J. Karuppaiah, M. Vadivel, "Fluorescence spectral classification of iron deficiency anemia and thalassemia," *J. Biomed. Optics*, **19**, p. 129-135 (2014).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549488>
- [9] K. Khungwanmaythawee, W. Sornjai, A. Paemane, J. Jaratsittisin, S. Fucharoen, S. Svasti, P.Lithanatum, S. Roytrakul, D.R. Smith, "Mitochondrial Changes in β 0-Thalassemia/Hb E Disease," *PLoS One*, **11**, e0153831 (2016).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4836671/>
- [10] J. F. San Miguel, *Cuestiones en Hematología* (Elsevier España, Madrid, 2002).
- [11] T. Meloni, D. Gallisai, M. Demontis, S. Erre, "Free erythrocyte porphyrin (FEP) in the diagnosis of beta-thalassaemia trait and iron deficiency anaemia," *Haematologica*, **67**, p. 341-348 (1982).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6814991>
- [12] J.A. Stockman, L.S. Weiner, G.E. Simon, M.J. Stuart, F.A. Oski, "The measurement of free erythrocyte porphyrin (FEP) as a simple means of distinguishing iron deficiency from beta-thalassemia trait in subjects with microcytosis," *J. Lab Clin. Med.*, **85**, p. 113-119 (1975).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1141725>