



Centre for Sensors, Instruments and
Systems Development

UNIVERSITAT POLITECNICA DE CATALUNYA

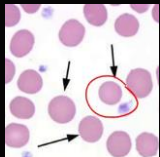
Shaping light to your needs

Evaluación de la Microscopía Confocal como Herramienta de Diagnóstico en Enfermedades de los Glóbulos Rojos

Laura Rey-Barroso*, Mónica Roldán, Francisco J. Burgos-Fernández, Susanna Gassiot, Anna Ruiz Llobet, Ignacio Isola and Meritxell Vilaseca.

*laura.rey.barroso@upc.edu

METODOLOGÍA ACTUAL

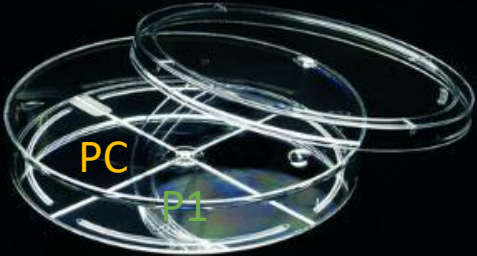


MICROSCOPIA CONFOCAL



CÉLULA VIVA

Tintes fluorescentes



Placas Petri con Adherencia

• Leica TCS SP8

CÉLULA FIJADA

Ac +Fluorocromo



PC: Control

P1: Paciente 1

EMA-FICT
1mg/ml
+ CellMask

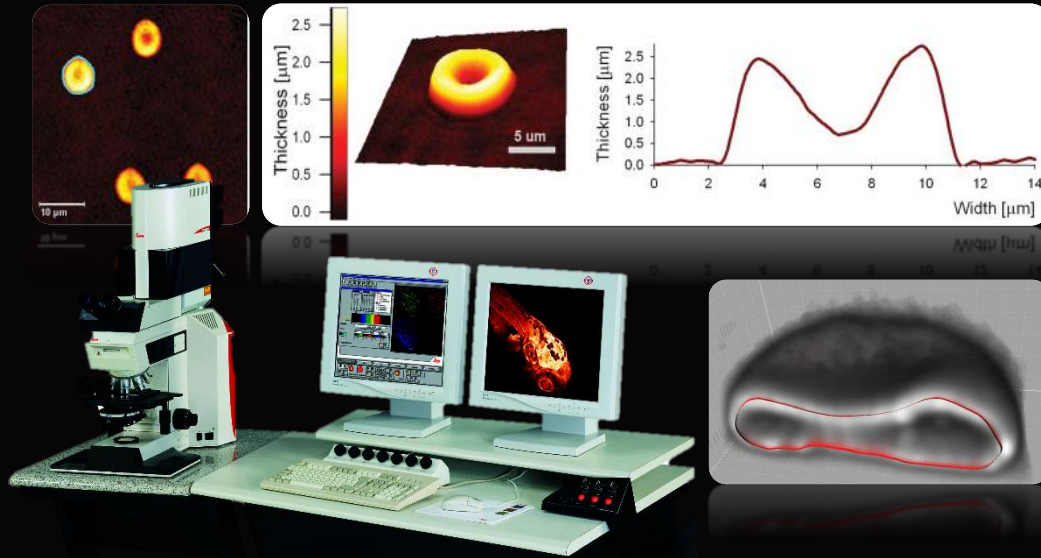
EMA-FICT
1mg/ml
+ CellMask

EMA
+CM

EMA
+CM

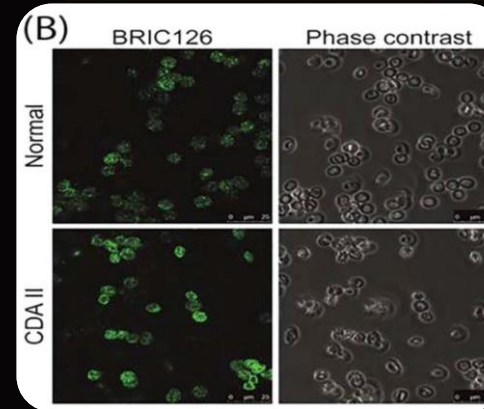
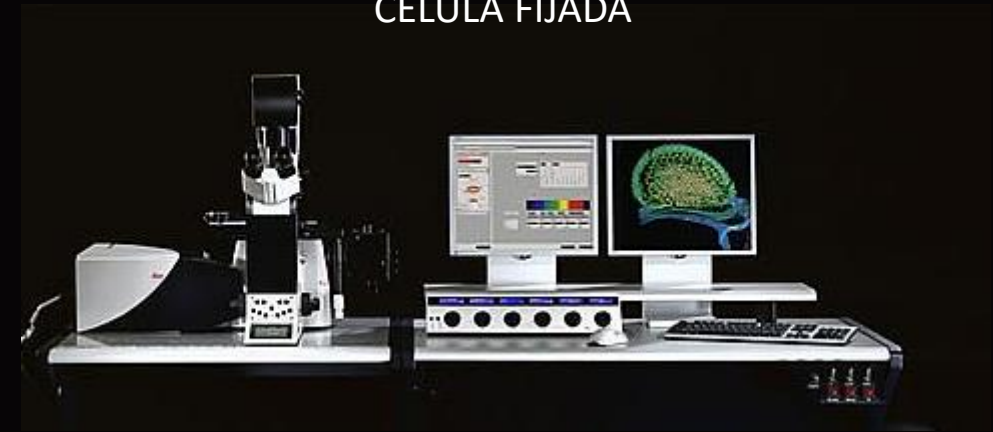
CÉLULA VIVA

Rappaz *et al.* (2018)

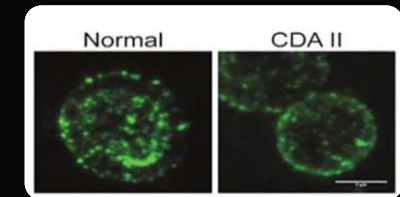


- Leica TCS SP2
- GRs de paciente control + heparina
- + **Vybrant Dil**, emisión rojo.
- Imágenes volumétricas 3D.

CÉLULA FIJADA

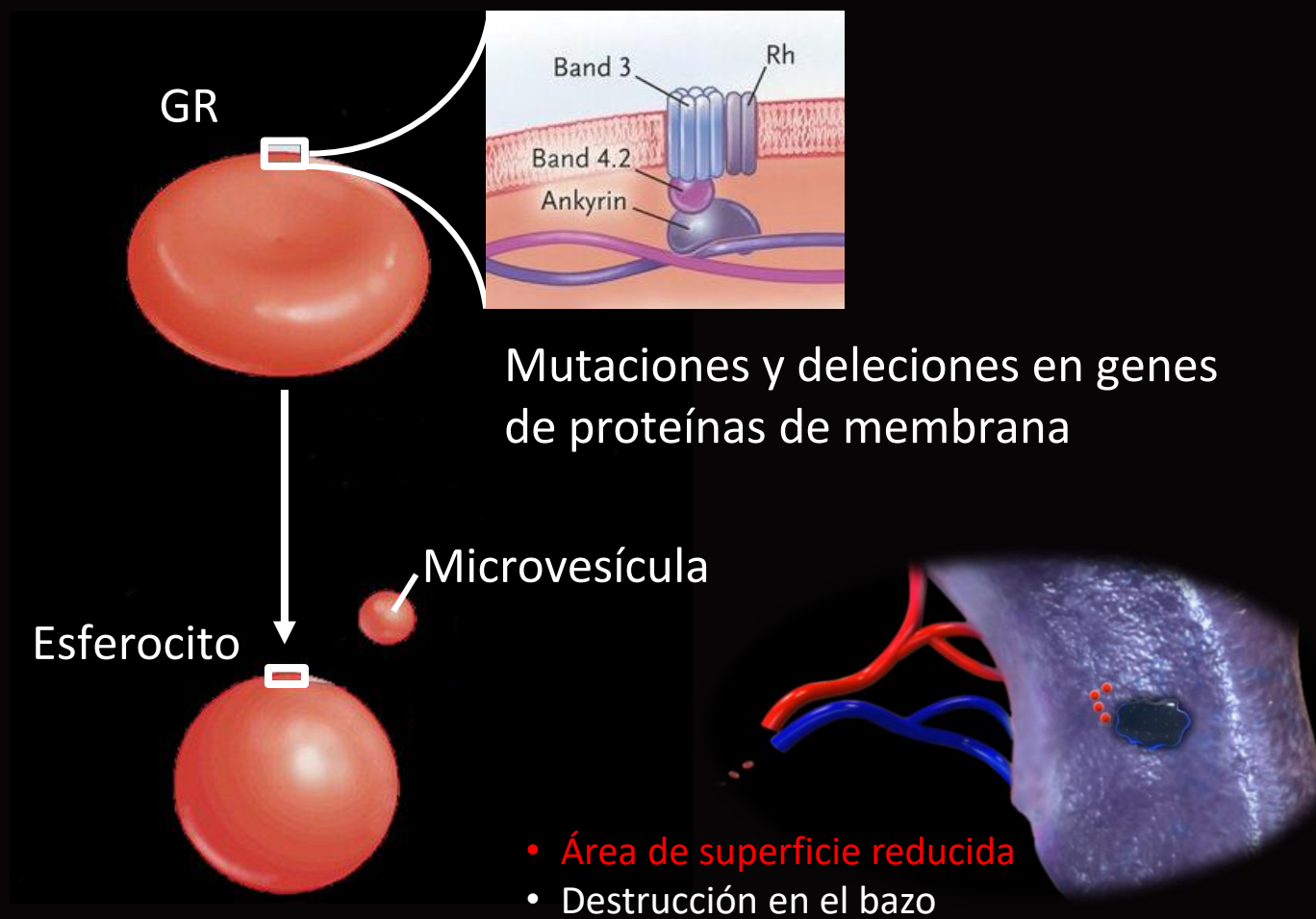


Singleton *et al.* (2018)



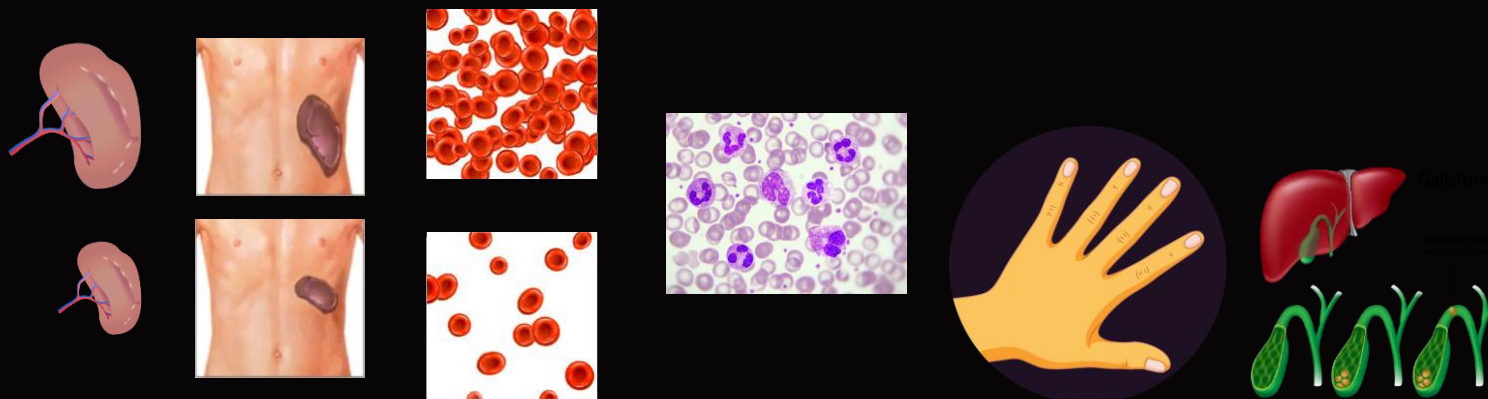
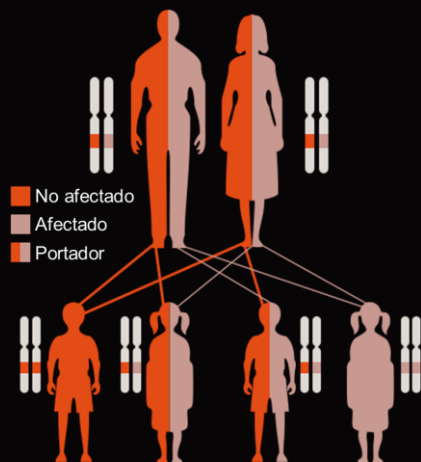
- **Ac Monoclonal BRIC126** contra CD47, emisión verde.
- Diferencias en la distribución de fluorescencia del Ac.
- Leica TCS SP5
- GRs de control vs. CDAII

ESFEROCITOSIS HEREDITARIA



ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

- Autosómica Dominante (75%)
- Anemia Hemolítica más común
- Poblaciones de Norte de Europa
- Incidencia de 200-300/millón



Leve

Moderada

Severa

20-30% de casos
 Sin anemia
 Reticulocitosis moderada
 Edad Adulta

60-75% de casos
 Anemia
 Reticulocitosis alta
 Aumento bilirrubina sérica
 Infancia
 Trasfusiones ocasionales

5% de casos
 Marcada hemolisis, Anemia
 Reticulocitosis alta
 Aumento de la bilirrubina sérica
 Esplenomegalia
 Transfusiones regulares

DIAGNÓSTICO ESFEROCITOSIS HEREDITARIA



- Historia Parental Medica
- Diferencias de Forma y Color
- Por medio de microscopía tradicional
- Signos de Hemólisis
- Aumento de LDH, Bilirrubina
- Aumento de MCHC
- MCHC >35 g/dL
- Estudios de Proteinas de Membrana
- Eosin-5-maleimide (EMA)
- Estudios Genéticos



Muestras de pacientes con Esferocitosis H. • 3♂ 3♀, edades 1-18 años;
1 progenitor

Fijadas / Inmunomarcadas:

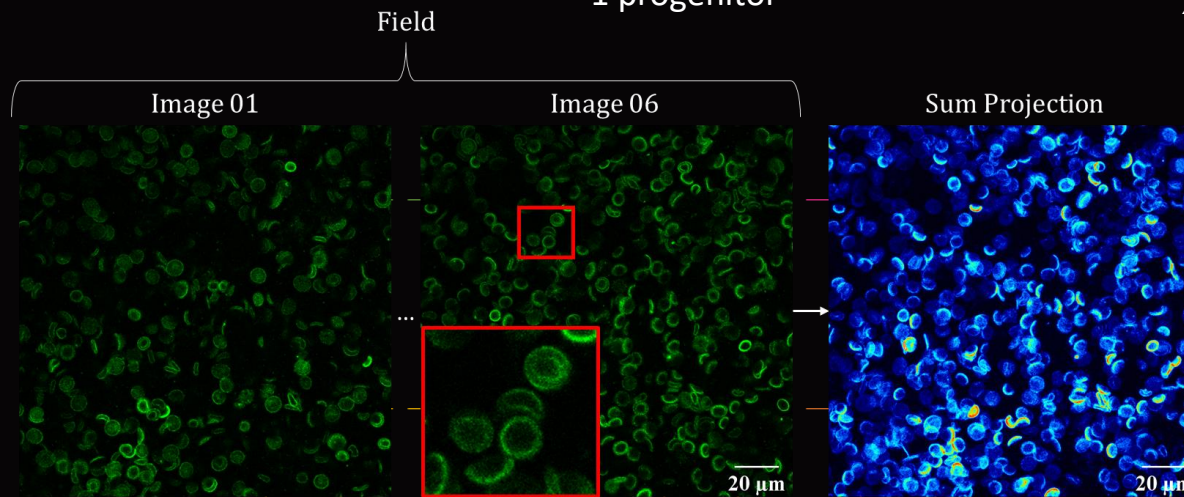
HS₁-HS₃, HS_{p1}: Mild

HS₅: Moderate

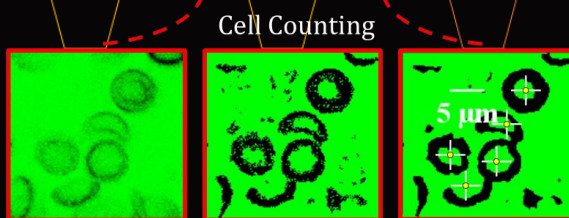
HS₄: Mild (Spl.)

Antes era severo

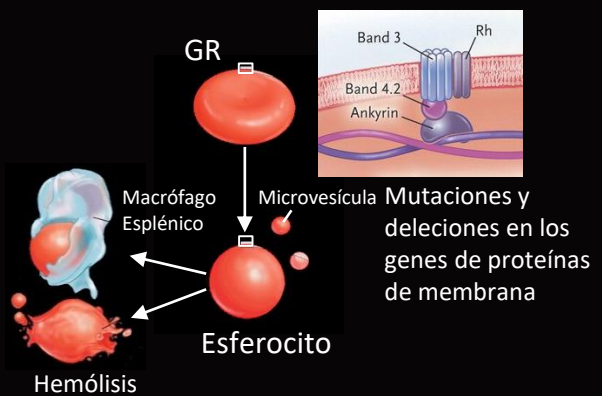
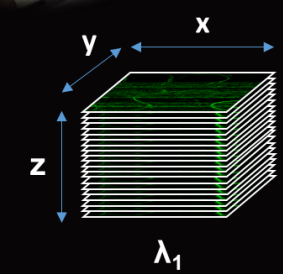
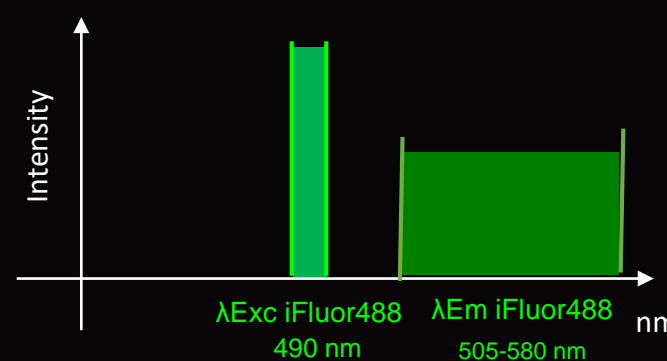
HS_{C1}: Control



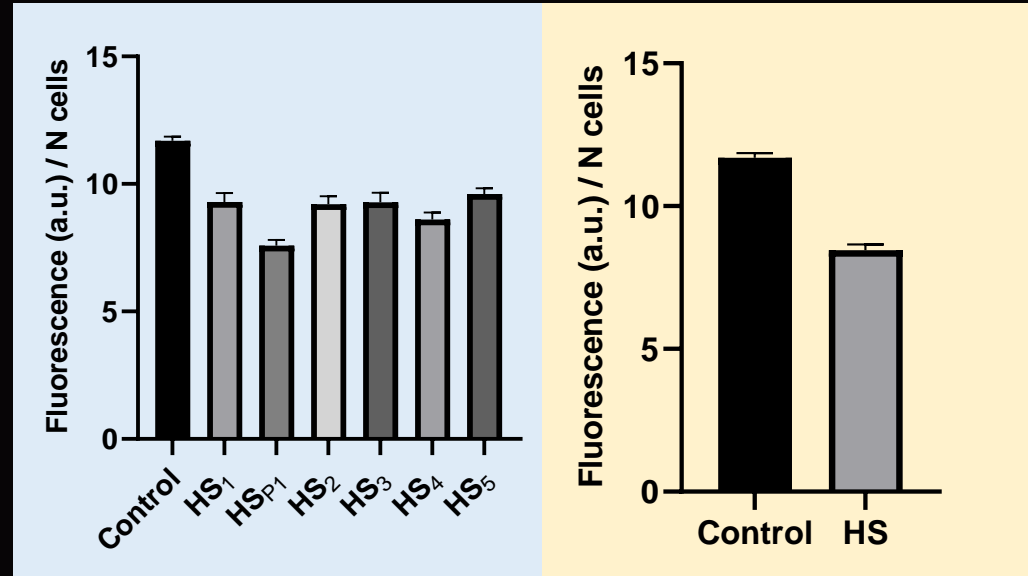
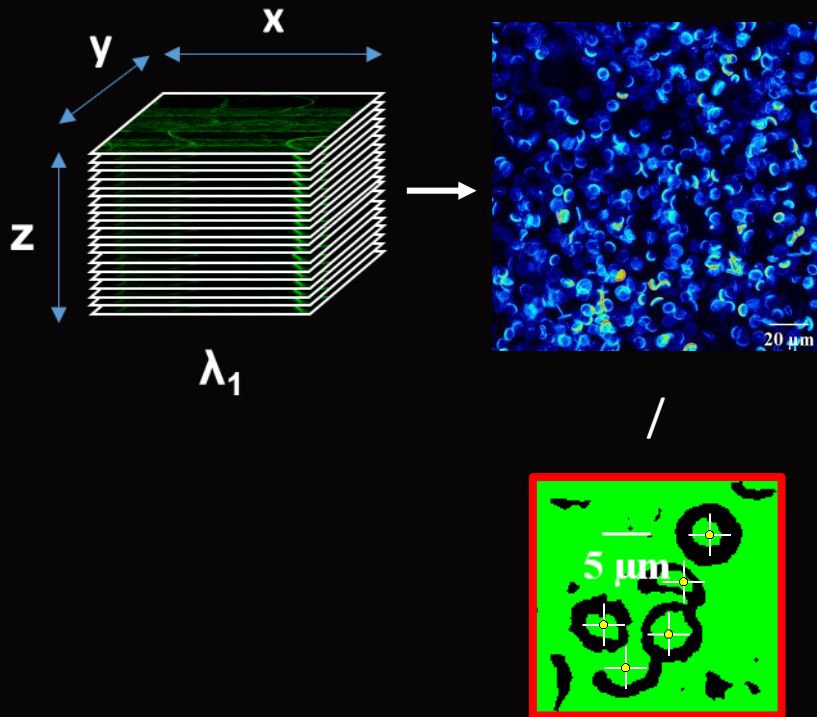
xyz adquisición



BRIC 200, iFluor488
Mouse IgG1
CD233 / Band 3
(Dominio Extracelular)



- HS₅ (moderada) no presentaba una fluorescencia más baja.



- Todas las muestras de EH tienen una fluorescencia más baja que el control.

Muestras de pacientes con Esferocitosis H. • 3♂ 3♀, edades 1-18 años;

1 progenitor

En fresco / + heparina / Con tinciones:

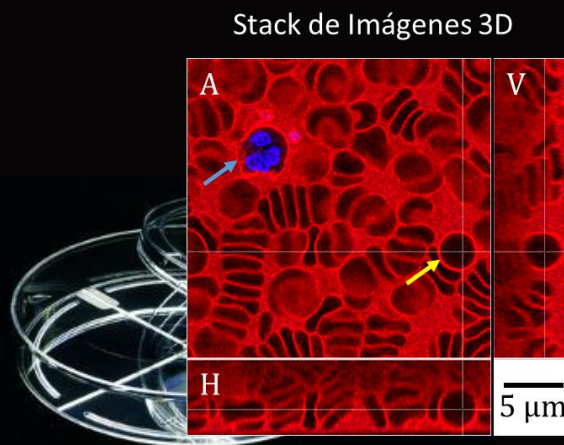
HS₁-HS₃, HS_{p1}: Mild

HS₅: Moderate

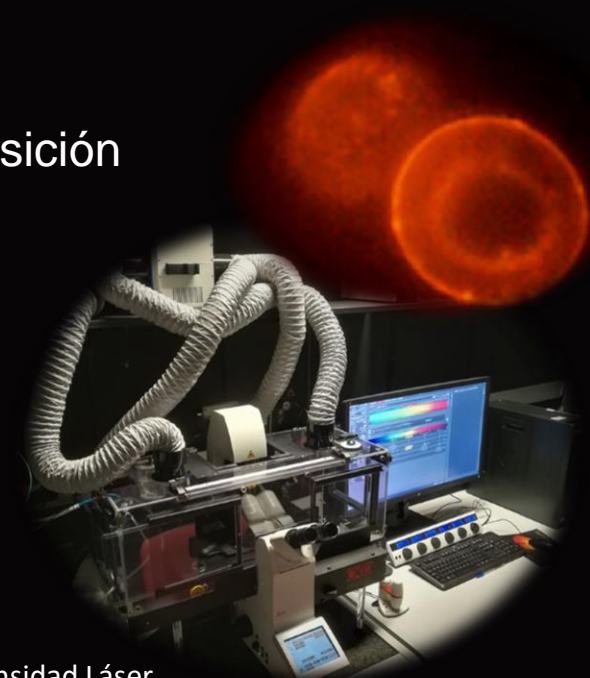
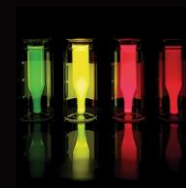
HS₄: Mild (Spl.)

Antes era severo

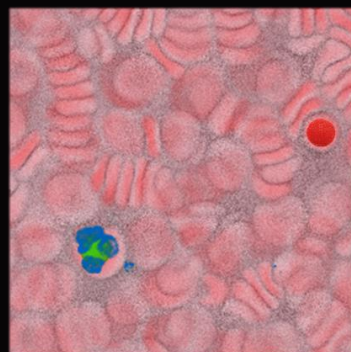
HS_{C1}: Control



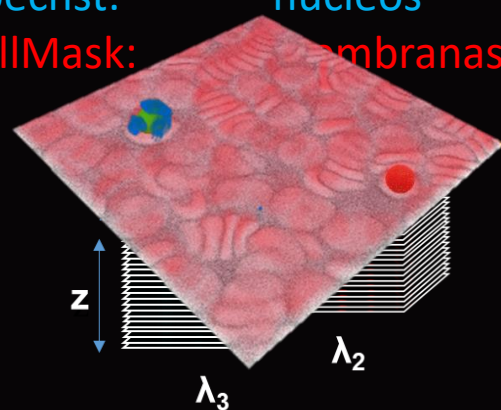
xyz adquisición
13.1 μm



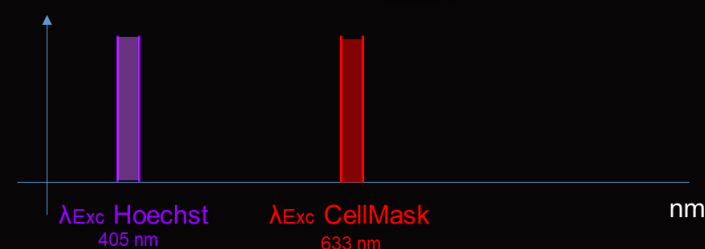
Detección de Esferocitos



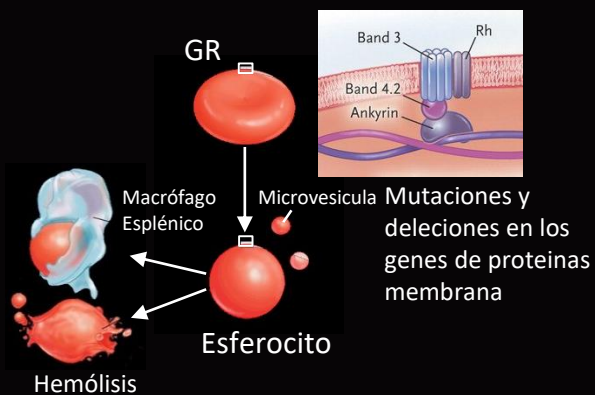
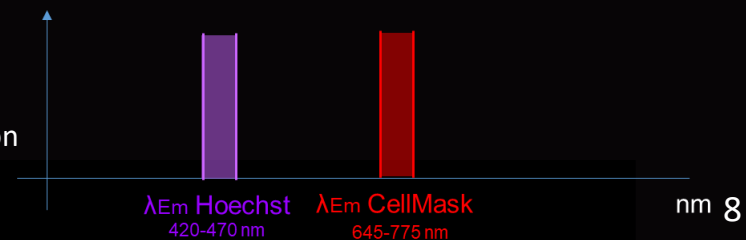
T. Esférica de Hough
Hoechst: núcleos
CellMask: membranas

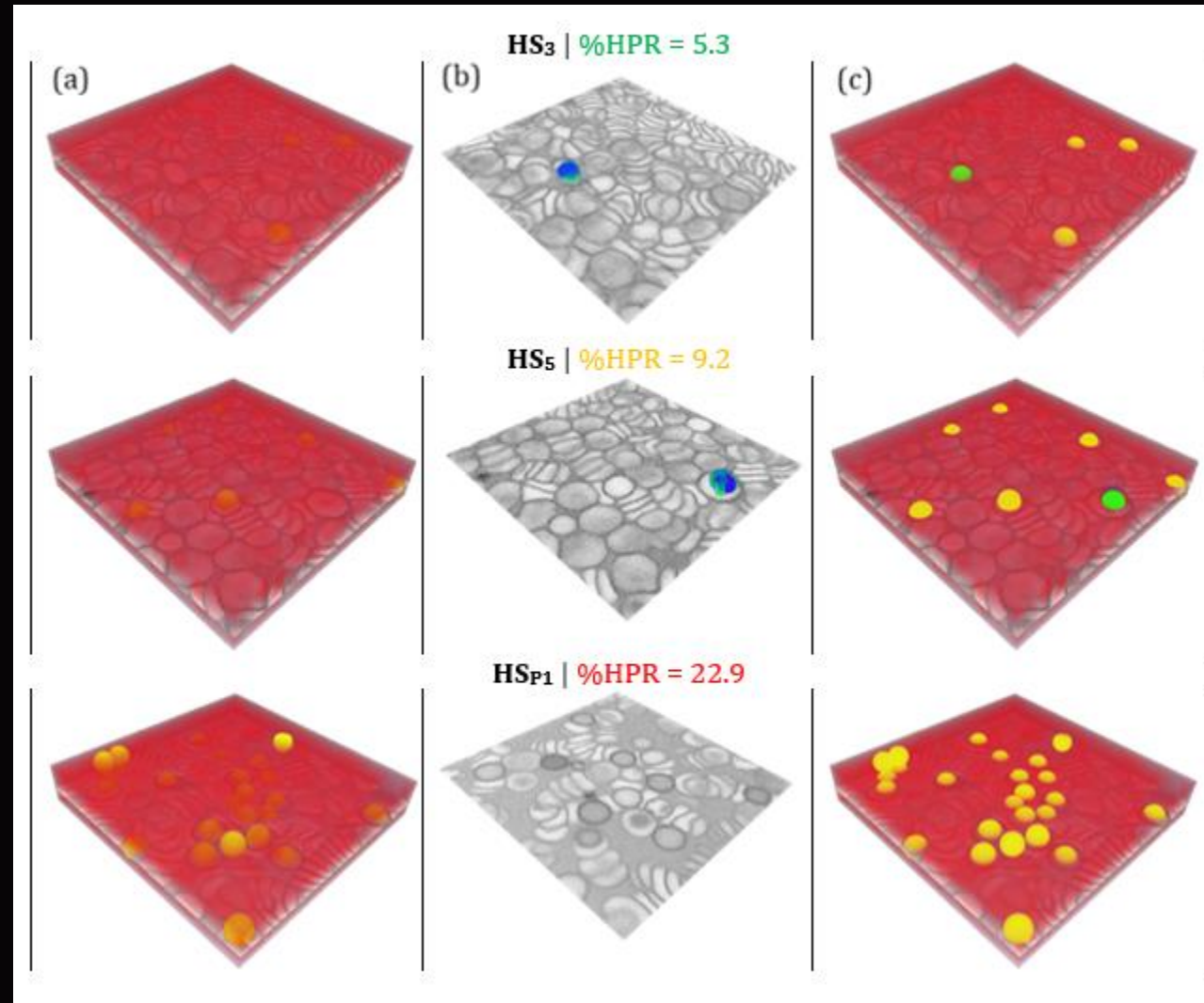


Intensidad Láser



Intensidad Emisión





- % HPR está directamente relacionado con el número de esferocitos.

- El algoritmo de Spherical Hough transform detecta el 100% de esferocitos, pero detecta otras formas esféricas.
- Detecta el 100% de neutrófilos.
- HS₅ (moderada) se detectan más esferocitos en proporción a su %HPR

- El microscopio confocal es una herramienta que permite corroborar la clínica de estos pacientes.
- En el futuro, podría servir para simplificar el diagnóstico de estos pacientes.
- Ambos estudios son preliminares y la prueba diagnóstica final siempre es el estudio genético.
- TRABAJO FUTURO: Estudios en Anemia Falciforme.

¡GRACIAS!

