

Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular

INFLUENCIA DE LA CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACIÓN DE LA ENDOTELEMIA

Ana María Quintela Pena

RESUMEN

Se estudiaron 60 muestras de sangre de donantes voluntarios a las cuales se les realizó el conteo de células endoteliales en plasma el mismo día de la extracción sanguínea y se repitió el procedimiento después de conservado el plasma 24 h a 40 EC. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el número de células contadas en plasma fresco y el conservado en frío. Una vez leída la muestra original al microscopio, la suspensión celular es conservada en iguales condiciones y se repite sólo el conteo a las 24 h, encontrándose de igual forma valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) en la muestra conservada, por lo que no se puede realizar esta determinación si no es el mismo día de la extracción de sangre.

Descriptor DeCS: CONSERVACION DE LA SANGRE; DONADORES DE SANGRE; ENDOTELIO VASCULAR.

El endotelio vascular tiene un papel importante en la regulación de la permeabilidad selectiva vascular, en el control de la hemostasia y en la interacción con los diferentes componentes de la sangre,¹ ya que ocupa una posición crucial en la interfase sangre-tejido y está involucrado en numerosos mecanismos hemostáticos como lo es el mantenimiento de una superficie no trombogénica. La alteración de las propiedades endoteliales o el daño de la pared vascular provoca cambios protrombóticos y procoagulantes que se manifiestan en patologías agudas o crónicas como es el caso del infarto del miocardio, trombosis o aterosclerosis entre otras.^{2,3}

Desde la década de los años 70, *Bouvier*⁴ y *Hladovec*⁵ demostraron la presencia en sangre circulante de células no hematológicas que se identificaron como endoteliales a través de métodos de leucoconcentración; éstas se modificaron con posterioridad con el objetivo de facilitar su identificación y conteo. En la actualidad se cuenta con métodos que permiten medir estas células en sangre total, pero son de un elevado costo.⁶

Se ha observado que cuando ocurre una lesión endotelial ocurre una decamación celular al torrente circulatorio, lo que representa un índice⁷ o un marcador de dicha lesión, utilizándose para su

identificación la morfología típica de dichas células y/o algunos marcadores específicos.⁶

Por todo lo anterior, se puede considerar al endotelio vascular como un órgano sistemáticamente diseminado, por su compleja estructura y por la variabilidad de las funciones que realizan las células endoteliales (CE) como su componente fundamental.⁸

El propósito de nuestro trabajo es conocer la influencia que puede tener la conservación de la muestra en la determinación de la endotelemia.

MÉTODOS

Se estudiaron 60 muestras de sangre de donantes voluntarios del Banco de Sangre del Hospital "Salvador Allende". Tomamos 10 mL de sangre colectada en un tubo de centrífuga plástico con 1 mL de citrato trisódico al 3,8 % como anticoagulante, en proporción 1:9, procediéndose según Hladovec y otros⁶ para el conteo de CE circulantes.

Del plasma rico en plaquetas (PRP) sobrante se guardó 1 mL en frío durante 24 h en que se repitió el proceder. Una vez concluida la lectura de la muestra original, el pellet de células se conservó en iguales condiciones y se repitió la lectura a las 24 h, comparándose los resultados en ambos casos con los obtenidos en la muestra sin conservación previa. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba t de Student.

RESULTADOS

El conteo de CE circulantes es un valor individual que se eleva en plasma tras una lesión del endotelio. Es bueno señalar que en todos los casos se realizó la lectura por duplicado y por la misma persona, con

vistas a eliminar el posible error entre observadores.

Como se muestra en la tabla 1, se encontró una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el número de CE circulantes en plasma al realizar la determinación el mismo día de la extracción y el número de CE contados cuando el plasma se conserva 24 h en frío y se monta la técnica al día siguiente de la toma de la muestra, con valores de 203 ± 7 y 125 ± 4 cel/mL PRP respectivamente, valor este último que resulta inferior.

TABLA 1. Número de CE el día de la toma de la muestra y en el plasma conservado 24 h en frío. Valores de la media y desviación estándar

N	CE / mL PRP	
	X \pm DS	
	Día	24 h
60	203 ± 7	$125 \pm 4^*$

N: Número de muestras.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

* $p < 0,001$.

Al realizar el conteo nuevamente con el pellet celular que se conservó 24 h en frío, encontramos, como se presenta en la tabla 2, niveles inferiores de endotelemia en la muestra que ha sido conservada en relación con los niveles reales, con valores respectivos de 140 ± 6 cel y 218 ± 8 con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

TABLA 2. Número de CE el día de la toma de la muestra y en el pellet conservado en frío por 24 h. Valores de la media y desviación estándar

N	CE / mL PRP	
	X \pm DS	
	Día	24 h
60	218 ± 8	$140 \pm 6^*$

N: Número de muestras.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

* $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

La disfunción de las células endoteliales como componente fundamental del endotelio puede provocar cambios en la capacidad de estas células de participar adecuadamente en los mecanismos de coagulación y fibrinólisis, predisponiéndose a la trombosis, por lo que la predicción de estas alteraciones endoteliales tiene un gran valor clínico.⁹

Existen diferentes métodos para medir las células endoteliales en sangre circulante, ya que su valor diagnóstico es muy importante, pues ha sido comprobado que el número de estas células circulantes se encuentra aumentado en pacientes con enfermedades malignas, tromboticas y en estadios posoperatorios.¹⁰ Algunos de estos métodos requieren de marcadores específicos y equipos de alta resolución, como el microscopio electrónico, con el que no siempre se dispone.

El método de cuantificación celular utilizado por nosotros, a pesar de haber sido diseñado desde hace algún tiempo, permite dar un resultado confiable en poco tiempo por su sencilla ejecución, dependiendo fundamentalmente de la experiencia del observador al identificar las células. No obstante, en ocasiones, algunos

técnicos dejan el método sin concluir completamente por determinados motivos sin conocer que no siempre es posible hacerlo.

Como podemos ver en nuestros resultados, el hecho de conservar la muestra sin procesar o de detener el procedimiento al final para realizar la lectura al día siguiente de la toma de la muestra, conduce a errores en los valores de conteo, por lo tanto, el valor pronóstico y/o diagnóstico de este método se pierde si procedemos de esta manera.

Por tal motivo, si en alguna ocasión no resulta posible la ejecución completa del procedimiento se deberá desechar la muestra, pues los resultados no serían utilizables por el facultativo teniendo el técnico la responsabilidad en este sentido para obtener un dato confiable.

Por todo lo anterior concluimos que es indispensable realizar el conteo de CE el mismo día en que se realiza la extracción sanguínea para garantizar el valor diagnóstico de la prueba.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración prestada para la realización del presente trabajo a la Téc. Esperanza Reyes Pineda.

SUMMARY

Sixty blood samples from voluntary donors were studied. Plasma endothelial cells were measured in these samples the same day of blood extraction and this count was repeated after the preservation of plasma at 40 EC for 24 h. Significant differences were found ($p < 0,001$) between the number of counted cells in fresh plasma and that of the cold preserved plasma. Once the original sample is observed on the microscope, the cell suspension is preserved under similar conditions and only the count is repeated after 24 h. Similarly, significant low values are found in the preserved samples ($p < 0,05$) therefore, this count must be made on the same day of blood extraction.

Subject headings: BLOOD PRESERVATION; BLOOD DONORS; ENDOTHELIUM, VASCULAR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rau L. Hypertension, endothelium and cardiovascular risk factors. *Am J Med* 1991;90(Suppl 2A):13S.
2. Pearson JD. Vessel wall interaction regulating thrombosis. *Br Bull* 1994;50(4):776.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801.
4. Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Speat TH. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Diathes Haemorr* 1970;Suppl 40:163.
5. Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb Res* 1973;3:665.
6. Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V, Fabian J. Circulating endothelial cells in acute infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr* 1978;56:1033.
7. Takahashi H, Harker LA. Measurement of human endothelial cells in whole blood. *Thromb Res* 1983;31:1.
8. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 1994;16(12):901.
9. Blann AD. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: does it exist. *British J Hematol* 1995;90:244-8.
10. Takahashi H, Harker LA. Measurement of human endothelial cells in whole blood. *Thromb Res* 1983;31:1-12.

Recibido: 25 de noviembre de 1996. Aprobado: 19 de julio de 1999.

Lic. *Ana María Quintela Pena*. Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascul ar, Calzada del Cerro No. 1551. Ciudad de La Habana, Cuba.