

TÉCNICAS

Facultad "Julio Trigo". Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

ADAPTACIÓN DEL *MICROTEST* DE DENSIDAD ERITROCITARIA Y SU ESTUDIO EVOLUTIVO EN RATAS JÓVENES

Dra. María Amelia Presmanes Cabo, Dra. Celia María Upmann Ponce de León, Dr. Raúl Fernández Regalado y Dra. Lourdes López Yañez

RESUMEN

El *microtest* de densidad eritrocitaria es una técnica que se está valorando para el diagnóstico de hipoxia perinatal, patología que es de gran incidencia en los servicios de neonatología. Con esta técnica se mide el porcentaje de células nucleadas jóvenes de la serie roja. Como la sangre de rata coagula rápidamente se modificó la técnica original. Se utilizó esta técnica para hacer un estudio seriado en ratas jóvenes (de 1 a 14 d) y poseer así un grupo control para comparar sus valores con los de ratas hipóxicas. En los resultados se observó un descenso de los valores con la edad, lo cual debe ocurrir también en los niños posterior al nacimiento, por lo que se recomienda hacer un estudio similar en niños normales a término, para que sirva de patrón de comparación con los casos de hipoxia.

DeCS: RECuento DE ERITROCITOS/métodos; ASFIXIA FETAL/diagnóstico; ANIMALES DE LABORATORIO; RATAS SPRAGUE-DAWLEY.

Son importantes en la actualidad, tanto en Cuba como en el extranjero, los estudios sobre hipoxia perinatal, por causa de la incidencia que tienen estos eventos en los servicios de neonatología porque son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en esta etapa.^{1,2}

La hipoxia perinatal es causa de encefalopatía en niños recién nacidos a término.³ También produce cambios metabólicos cerebrales: aumentos en la concentración de lactato cerebral y disminución en la concentración de N- acetilaspártato,⁴ cambios en

el contenido y la liberación de dopamina en cultivos de tejido mesencefálico.⁵ Sin embargo, no se reportan alteraciones sobre la generación del óxido nítrico,⁶ compuesto envuelto en la neurotransmisión.⁷

La asfixia fetal puede ser reconocida por el conteo del Apgar, por el pH y la presión parcial de CO₂ en la sangre arterial del cordón umbilical.⁸ Sin embargo, por estos métodos solo se detectan eventos hipóxicos muy recientes y severos. El *test* de densidad eritrocitaria (TDE) puede diagnosticar hipoxias ocurridas mucho antes del

nacimiento.^{2,9} Esta técnica tiene como fundamento la separación de las células de la sangre en 2 grupos, en dependencia de su densidad: células ligeras (incluye células inmaduras de la serie roja y células de la serie blanca) y células pesadas (incluye eritrocitos maduros).^{2,9} Como se sabe, la hipoxia crónica produce un aumento en la secreción de eritropoyetina, que al estimular la eritropoyesis, produce un aumento en sangre periférica de células jóvenes de la serie roja (nucleadas).^{2,10}

Este grupo de trabajo decidió utilizar esta técnica y hacer un estudio seriado en ratas jóvenes, para poseer un grupo control con calidad y comparar estos valores con los valores de las ratas hipóxicas. Por causa de la poca sangre que se puede obtener de estas ratas se utilizó el micro TDE, técnica entregada personalmente por el doctor Gross y adaptada por los autores de este trabajo para su uso en ratas.

MÉTODOS

Se utilizaron ratas albinas *Sprague Dawley* del Bioterio del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", alimentadas con ratonina. Las crías de todas las madres se unieron y a cada madre se le colocaron 10 raticas de forma aleatoria. Madres y crías se mantuvieron a una temperatura y ciclo de luz y oscuridad natural, con libre acceso al agua y la comida. Las crías se dividieron en 4 grupos de diferentes edades, 1, 2, 7 y 14 d; a cada una de ellas se le realizó el micro TDE.

Al sacrificarlas por decapitación se recogieron 100 µL de sangre de cada una en viales que contenían 20 µL de heparina que estaba disuelta en suero fisiológico y se agitaron de inmediato. Esta es una modificación de la técnica de Gross, pues la

sangre de las ratas coagula rápidamente (en la técnica original la sangre se recoge en un capilar de microhematócrito que ha sido enjuagado con el *buffer* con heparina).

En un capilar de microhematócrito se coloca una alícuota de ftalato. Este tiene una densidad igual a 1,088 kg/L y se prepara con N-butilftalato, densidad = 1,0462 kg/L y dimetilftalato, densidad = 1,1905 kg/L. En el mismo capilar se introduce otra alícuota de *buffer* (115 mmol de NaCl, 27 mmol de Na₂HPO₄ · 2H₂O; 6,05 mmol de KH₂PO₄, 11,1 mmol de glucosa y H₂O hasta 1L), posteriormente se le introdujo de 10-15 µL de la sangre de los viales agitados con heparina. Luego de sellar el capilar con macilla por la parte del ftalato, se colocó en una centrífuga de capilares a 22 °C y 300 rpm durante 15 min. Al finalizar la centrifugación, en el capilar se observaron 2 porciones de células rojas separadas por el ftalato (células ligeras y pesadas). La longitud de las 2 porciones se midieron en un microscopio y se calculó el porcentaje de las células ligeras según la fórmula siguiente:

$$\text{Micro TDE} = \frac{\text{Longitud de células ligeras}}{\text{Longitud de células ligeras} + \text{Longitud de células pesadas}} \times 100 \%$$

Las muestras se prepararon por duplicados y el valor para cada rata fue el promedio de los 2 capilares.

Los valores de temperatura de centrifugación diferentes a 22 °C implican grandes cambios en los valores del micro TDE, por lo que si la centrifugación no se produce a esta temperatura debe introducirse un valor de corrección en la fórmula.²

Los resultados se analizaron sacando la media y la desviación estándar, previa eliminación de los errores groseros por el criterio de la T,¹¹ y se compararon

estadísticamente con la aplicación del *test* no paramétrico de Kruskal Wallis,¹² previo análisis de la desviación estándar por el *test* de Fisher.^{11,13}

RESULTADOS

Al recoger la sangre en viales que contenían heparina fue posible realizar esta técnica sin que se coagulara la sangre.

Como puede observarse en la tabla, los valores del micro TDE decrecen con la edad de las ratas.

TABLA. Resultados del estudio seriado del microtest de densidad eritrocitaria (los valores se expresan en %)

Grupos	No. de muestras	Media aritmética	DE
Ratas (1 d de nacidas)	10	73,40	8,89
Ratas (2 d de nacidas)	10	51,95	14,33
Ratas (7 d de nacidas)	10	28,14	10,20
Ratas (14 d de nacidas)	8	10,06	4,59

SUMMARY

The erythrocyte density microtest is a technique that is being assessed for the diagnosis of perinatal hypoxia, a pathology with a high incidence in the neonatology services. This technique is used to measure the percentage of young nucleated red blood cells. As the rat blood coagulates rapidly, the original technique was modified. This technique was applied to conduct a serial study in young rats (from 1 to 14 days) and to have a control group to compare its values with those of hypoxic rats. In the results it was observed a decrease of the values with age, which should also occur in children after birth. Therefore, it is suggested to carry out a similar study in normal infants at term that will serve as a pattern of comparison with the cases of hypoxia.

Subject headings: ERYTHROCYTE COUNT/methods; ASPHYXIA NEONATORUM/diagnosis; ANIMALS, LABORATORY; RATS, SPRAGUE-DAWLEY.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos coinciden con datos reportados en la literatura como los de Griffith y Farris,¹⁴ que realizaron un conteo de reticulocitos en ratas jóvenes, y reportaron una disminución del porcentaje de estas células al aumentar la edad.

Estos hallazgos indican que hay que tener en cuenta la edad del animal en el momento de la extracción de la muestra, porque como se observa en la tabla, con un día de diferencia pueden producirse cambios en los valores de aproximadamente 30 %.

Este estudio permitió determinar un rango de valores del micro TDE en ratas durante sus 2 primeras semanas de vida, y esto demuestra que decrece con la edad.

Dado el uso del TDE para el diagnóstico y posible pronóstico de la hipoxia perinatal en los servicios de Neonatología, se recomienda hacer un estudio similar a este en niños normales a término, con el fin de conocer los valores normales de este en diferentes edades, y que a su vez sirva de patrón de comparación con los casos de hipoxia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés-Dapena MA. El feto y el niño recién nacido. En: Nelson WE. Tratado de Pediatría. Barcelona: Salvat, 1976;371.
2. Cápiro P, Fernández-Regalado R, Presmanes MA, Muñoz S, Gross J, Rodríguez C. El test de densidad eritrocitaria y la creatina eritrocitaria: 2 posibles técnicas para evaluar asfisia perinatal. Rev Cubana Pediatr 1988;60(1):29-35.
3. Westgate JA, Gunn AJ, Gunn TR. Antecedents of neonatal encephalopathy with fetal acidemia at term. Br J Obstet Gynaecol 1999;106(8):774-82.
4. Van Cappellen AM, Heerschap A, Nijhuis JG, Oeseburg B, Jonsma HW. Hypoxia, the subsequent systemic metabolic acidosis, and their relationship with cerebral metabolite concentrations: an in vivo study in fetal lambs with proton magnetic resonance spectroscopy. Am J Obstet Gynecol 1999;181(6):1537-45.
5. Gross J, Ungethüm U, Andreeva N, Heldt J, Cao J, Marschhausen C, *et al.* Hypoxia during early developmental period induces long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. Neuroscience. 1999;92(2):699-704.
6. Cardellá L, Hernández R, Upmann C, Vicedo A, Pérez A, Sierra S *y otros.* Comunicación entre las células del organismo. En: Cardellá-Hernández L. Bioquímica Médica. Metabolismo intermediario y su regulación. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1999;t3:1026.
7. Lubec B, Kozlov AV, Krapfenbauer K, Berguer A, Hoeger H, Herrera-marschitz M, *et al.* Nitric oxide and nitric oxide synthase in the early phase of perinatal asphyxia of the rat. Neuroscience 1999;93(3):1017-23.
8. Engle WD, Lupton AR, Periman JM. Acute changes in arterial carbon dioxide tension and acid base status and early neurologic characteristics in term infants following perinatal asphyxia. Resuscitation 1999;42(1):11-7.
9. Lun A, Krüger I, Krüger R, Neumann V, Olze W, Goldner B, *et al.* Dichtebestimmung roter blutzellen als möglicher Sletest zur Erfassung einer pränatalen Hypoxie. Z Klin Med 1985;40(6):429-33.
10. Hanlon-Lundberg KM, Kirby RS. Nucleated red blood cells as a marker of acidemia in term neonates. Am J Obstet Gynecol 1999;181(1):196-201.
11. Thielmann K. Principios de metodología en bioquímica clínica. La Habana: Organismos, 1973;80-4.
12. Sydney S. Diseño experimental no paramétrico. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1970;215. (Edición Revolucionaria).
13. Pascual C, Torres W. Control de calidad en bioquímica clínica. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1989;96.
14. Griffith JQ, Farris EJ. The rat in laboratory investigation. Philadelphia: JB Lippincott, 1942:351-5.

Recibido: 20 de septiembre de 2000. Aprobado: 10 de abril de 2001.

Dra. *María Amelia Presmanes Cabo*. Pepe Antonio No. 461, municipio Guanabacoa, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: 97-6539.