Ultraestructura del hematíe sicklémico y su comportamiento en un campo magnético estudiado comparativamente por los métodos de freeze-etching y de fijación e inclusión

W. Torres y J. Kouri

Departamento de Estructuras Ultrafinas, C.N.I.C., Habana.

Recibido en: Dic. 1969

ABSTRACT. A morphological study of sickled erythrocytes was carried out under the electron microscope by Freeze-etching and embbeding and sectioning methods. Differences in diameter of the filaments were discussed. Evidence of the effect of this pathology in the cellular membrane was presented. Band-like formations appeared in the cytoplasm when the cellular membrane splintered out during the fracture. Changes on the sickled erythrocytes and on their filaments were described after the effect of a magnetic field.

RESUMEN. Se realizó un estudio de los cambios morfológicos al microscopio electrónico en los glóbulos rojos en la anemia a hematíes falciformes resaltándose las características propias observadas por los métodos de Freeze-etching y de fijación e inclusión. Las diferencias observadas en las dimensiones de los filamentos en réplicas y cortes fueron discutidas. Se mostraron evidencias de la repercusión sobre la membrana de estas alteraciones así como imágenes en banda que parecen corresponder a fracturas inmediatamente por debajo de la membrana. Se presentaron los cambios producidos en el hematíe sicklémico y sus filamentos por la acción del campo magnético.

INTRODUCCION

La presencia de una alteración en la hemoglobina del hematíe sicklémico fue descrita por Pauling (1949), demostrándose posteriormente que el cambio de un ácido glutámico por la valina en la posición 6 de las cadenas beta, constituía la alteración molecular existente.

Numerosos investigadores han estudiado los cambios morfológicos que esta alteración produce en la estructura interna del hematíe (*Bessis y cols., 1958, 1953; Stetson, 1966; Murayama, 1966; Döbler y Bertles, 1968; White, 1968 y Lawrence y cols., 1968*), demostrándose la presencia de filamentos intracitoplasmáticos tanto por el método de fijación e inclusión, como por el de Freeze-etching, presentándose argumentos de que corresponden a moléculas de hemoglobinas patológicas polimerizadas.

Por otro lado Haggis (*1961*) y Weinstein (*1967 a, b, c*) han presentado evidencias de que las partículas intracitoplasmáticas observadas en las fracturas de los hematíes,

corresponden a moléculas o grupos de moléculas de hemoglobina, aunque no se han podido descartar totalmente otras posibilidades.

En trabajos anteriores (*Kourí y cols., 1970*) se demostró que las partículas observadas en las superficies de fracturas eran modificadas por el campo magnético y que esta modificación era distinta cuando el campo incidía horizontalmente a la superficie de fractura a cuando lo hacía perpendicularmente.

En este trabajo se realiza el estudio comparativo de los filamentos con ambos métodos y el efecto que ejerce el campo magnético tanto sobre los mismos como sobre la membrana plasmática. Se muestra una secuencia en la formación de los filamentos típicos del hematíe falciforme, así como modificaciones en la estructura de los mismos por el campo magnético.

MATERIAL Y METODO

Muestras de sangre heparinizada de enfermos con anemia a hematíes falciformes se lavaron de 2 a 3 veces en suero glucofisiológico. Para provocar el "sickling" se utilizó metabisulfito al 1% a la temperatura ambiente dejándose actuar durante 30 minutos.

A otras muestras se les añadió glutaraldehido al 3% y glutaraldehido más metabisulfito, con el objeto de observar su efecto en relación al "sickling".

El control del "sickling" se realizó colocando gotas de sangre de las diferentes combinaciones entre cubre y porta observándose a los 15 minutos, 30 minutos y 1 hora, buscando la presencia de hematíes con los cambios falciformes.

Posteriormente se procesaron por el método de Freeze-etching y de fijación e inclusión de la siguiente manera:

Método de Freeze-etching

Las muestras fueron congeladas según el método de Moor (*1964*) y procesadas en el equipo Balzers BA 510M, guardando los requerimientos propios de este tejido (*Kourí y Torres, 1970*).

Método de fijación e inclusión

La sangre fue fijada en glutaraldehido al 3% en buffer de fosfato a 4°C (*Millonig, 1961*) y post-fijadas con tetróxido de osmio al 2% en el mismo buffer. La deshidratación fue llevada a cabo con alcohol etílico a concentraciones crecientes; se infiltró en proporciones de acetona-Epon y se incluyó en cápsulas de gelatina 00 con Espon 812 según Luft (*1961*). Las cápsulas se polimerizaron a 60°C durante 48 horas y los bloques se cortaron en el ultramicrótomo LKB Ultratome III. Se obtu-

vieron cortes entre plateados y amarillos claros, que fueron montados en rejillas electrolíticas de 400 mesh sin membrana de soporte. Como post contraste fue utilizado el uranil acetato saturado en alcohol etílico y citrato de plomo según Reynolds (*1963*).

Las muestras sometidas al campo magnético se procesaron según ha sido descrito (*Kourí y cols., 1970*). Con el método de freeze-etching se hizo incidir el campo, horizontal y perpendicularmente a la superficie de fractura de la muestra, congelándose posteriormente.

En el caso de fijación e inclusión, la sangre dentro de una pipeta de Pasteur se introdujo en el campo magnético, a intervalos cortos, se fijó posteriormente en glutaraldehido frío bajo la acción del campo y se continuó con los pasos explicados en la preparación de las muestras para este método.

Sangre normal y sicklémica se procesaron sin metabisulfito ni campo magnético, así como con campo y sin el agente reductor.

Todas las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico HITACHI modelo HU11-A.



FIG. 1. Glóbulo rojo de un caso de anemia a hematíes falciformes, mostrando filamentos de diferente grosor y anárquicamente distribuidos (sin metabisulfito ni campo magnético) 100 000 X



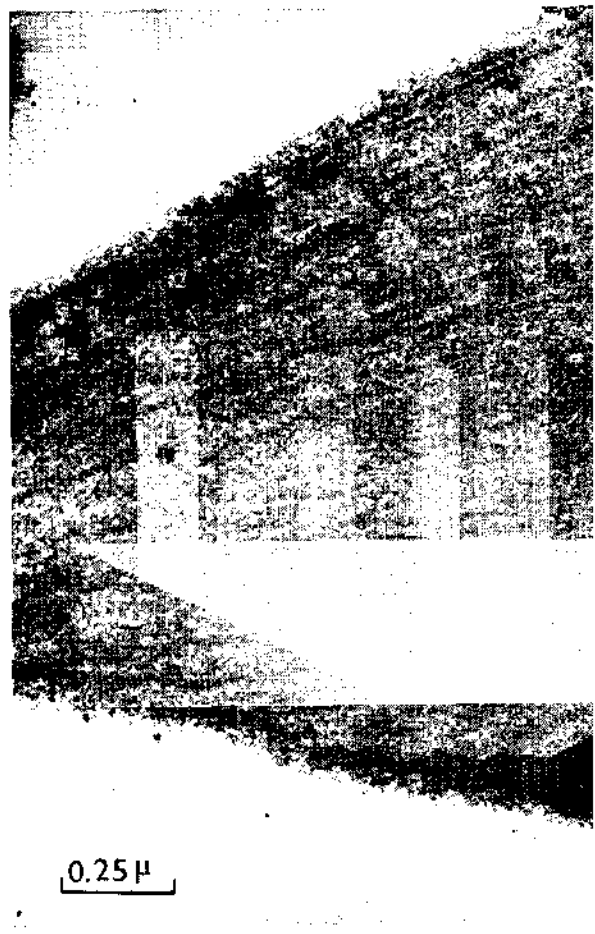


Fig. 2. Filamentos vistos en corte transversal (con metabisulfito). 125 000 X

Fig. 3. Hematíes con abundantes filamentos paralelos en una muestra de sangre con metabisulfito. 60 000 X

RESULTADOS

En todas las condiciones experimentales se pudieron observar filamentos con las características siguientes:

Método de fijación e inclusión

En cortes longitudinales se observaron filamentos finos de 80-100 Å de espesor y gruesos de 120-200 Å (Fig. 1) y en los cortes transversales el diámetro de éstos



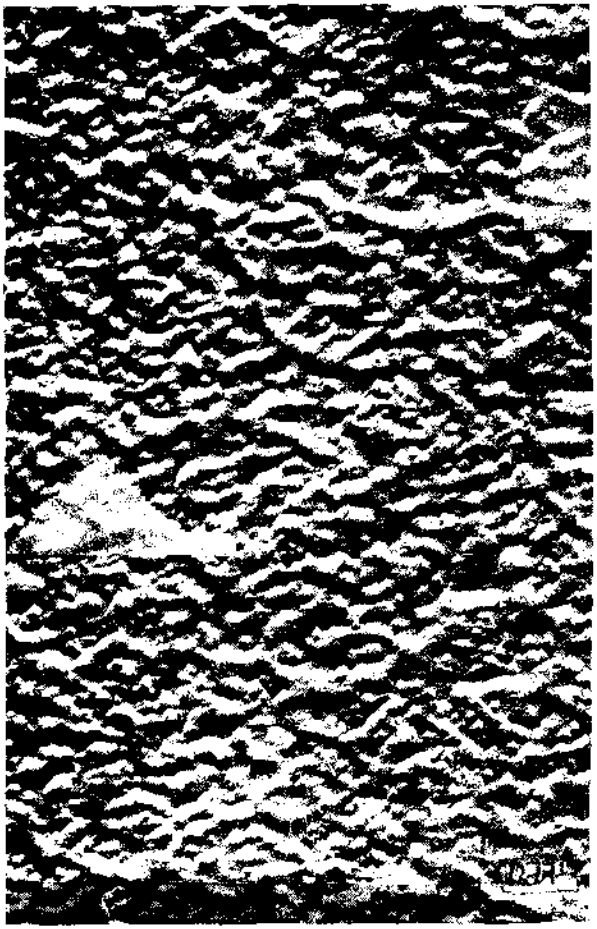


FIG. 4. Hematíe sicklémico fracturado (Freeze-etching) donde se observan los filamentos (f) en muestra con metabisulfito. En la porción inferior se observa la membrana plasmática (M.P.) 18 000 X

FIG. 5. Fractura de un hematíes de muestras con metabisulfito y glutaraldehído donde se observan diferentes fases de la formación de filamentos. 100 000 X

varió entre 120 y 170 Å. Al principio de la transformación falciforme se observaron menos filamentos (Fig. 1) con una distribución anárquica. Su número aumentó, organizándose cada vez más paralelamente a lo largo del eje longitudinal, a medida que era más evidente la falciformidad (Figs. 2 y 3). La continuación de los filamentos a través de las prolongaciones de los hematíes fue característica.





FIG. 6. Fractura que ha levantado la membrana exponiendo el matrix citoplasmático, se observan imágenes en bandas paralelas. Sobre esta superficie escasas partículas 30 000 X

FIG. 7. Hematíe fracturado de una muestra de sangre con metabisulfito y glutaraldehído ocupado totalmente por filamentos paralelos. 18 000 X

Los filamentos (Fig. 4) con un espesor de 200-260 Å fueron los más abundantes. Se encontraron menos frecuentemente filamentos finos de 70-80 Å y gruesos hasta de 300 Å o más. Las variaciones características en relación al grado de falciformidad descritas en los resultados del método de fijación e inclusión también fueron observadas en las réplicas.

En la Fig. 5 pueden observarse diferentes momentos de la formación de los fila-

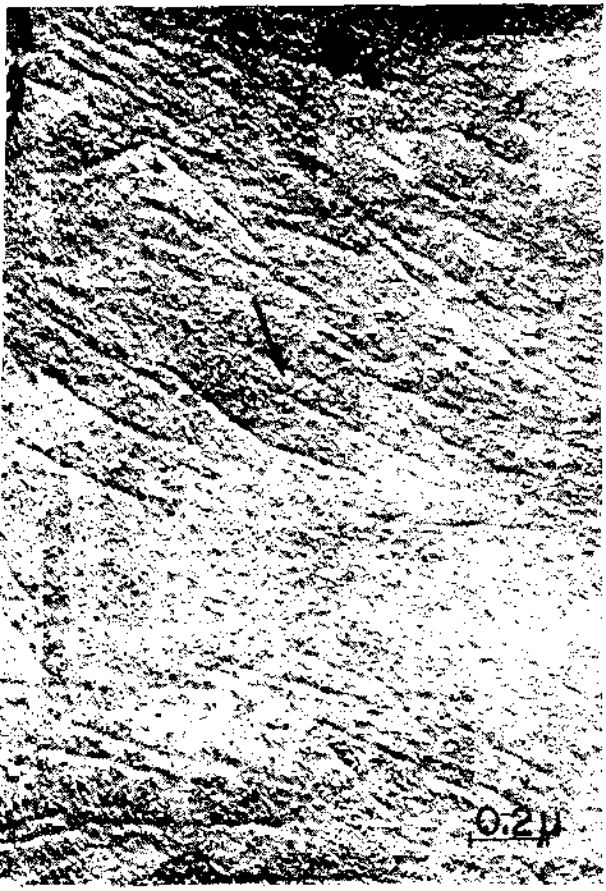




FIG. 8. Repercusión de los filamentos sobre la membrana plasmática, se nota un desplazamiento (flechas) de las partículas hacia los bordes de los mismos. Sangre con metabisulfito. 50 000 X

FIG. 9. Ondulaciones de la membrana plasmática por el efecto de los filamentos en una muestra con metabisulfito. 54 000 X

mentos en un hematíe de un enfermo homocigótico a hemoglobina S, desde unas pocas partículas hasta cordones largos.

Una forma especial de presentación (Fig. 6) muestra al hematíe sickleado con una imagen en forma de bandas anchas paralelas, observadas en casi todas las preparaciones.



FIG. 10. Corte de hematíe sicklémico con metabisulfito sometido a un campo magnético. Nótese la abundancia de filamentos cortos y su distribución anárquica. 40 000 X

Las muestras con metabisulfito así como con glutaraldehido, posibilitaron la observación de los filamentos sin que en su morfología presentaran o evidenciaran diferencias con las muestras sin agentes provocadores del "sickling".

En muestras con metabisulfito y glutaraldehido simultaneamente, preparadas por el método de freeze-etching fue posible la observación de hematíes falciformes totalmente llenos de filamentos (Fig. 5).

Las Figs. 8 y 9 muestran las alteraciones encontradas en la membrana del hematíe falciforme y su evidente relación con los filamentos intracitoplasmáticos. No se constató una relación característica de las partículas sobre la membrana con estas alteraciones.

La influencia del campo magnético se demuestra en las Figs. 10, 11 y 12, donde se presentan diferentes formas en que el mismo afectó a la célula y sus filamentos: observándose hematíes con los filamentos distorsionados en tal grado que recordaba una malla o red (Fig. 10 y 12), destrucción celular y diferentes grados de hemolisis. (Fig. 11).





Stetson, 1966; Döbler y Bertler, 1968; Lawrence y cols., 1968) como área de mayor densidad, son las características morfológicas más importantes descritas en los hematíes en la anemia falciforme. Estas alteraciones pueden explicarse por la presencia de Hb-S lo que determina la polimerización de estas moléculas, debido posiblemente a uniones hidrofóbicas valil-valil (siclización) (*Murayama, 1966*), que permite una complementación de una cadena beta con una alfa de la molécula de hemoglobina que le sigue, cuando ésta se encuentra en estado reducido. La combinación de los métodos de fijación e inclusión y de Freeze-etching, de diferente fundamentación, enfocados al estudio de este fenómeno, facilita la observación de nuevos aspectos morfológicos del sickling, a la vez que permite estudiar cómo influye el campo magnético en los filamentos ya formados. Esto ofrece nuevas posibilidades de interpretación de las partículas intracitoplasmáticas observadas en los hematíes fracturados. El hecho mismo de que los filamentos aparezcan sin el efecto de un fijador que altera su composición química, permite estudiarlos por una nueva vía.

Las dimensiones de los filamentos encontrados por nosotros con el método de fijación e inclusión concuerdan con los reportados por otros autores (*Stetson, 1966; Murayama, 1966; Döbler y Bertles, 1968 y White, 1968*). Sin embargo, con el método de Freeze-etching observamos un aumento de éstos, cuestión que no concuerda con los resultados obtenidos por Lawrence (*1968*) en su estudio sobre los hematíes falciformes.

Se sabe que en el método de Freeze-etching las estructuras presentan un incremento de los diámetros, debido a la capa de platino añadida propia de este método (*Weinstein y Bullivant, 1967 y Weinstein y Merk, 1967*).

Este incremento de los diámetros puede ser variable según la cantidad de platino empleado en la evaporación, pero sin duda alguna debe haber una diferencia en las dimensiones de los filamentos cuando se comparan ambos métodos, cuestión que concuerda con nuestros resultados.

Moor (*1964*) plantea la posibilidad de que el glutaraldehido prevenga en algún grado la destrucción por congelación, y White (*1968*) demuestra su virtud como agente provocador del "sickling". Como en definitiva el glutaraldehido es un coagulante de las proteínas, es de esperar, que los filamentos sean más fácilmente observables con una combinación de metabisulfito y glutaraldehído, lo que pudimos encontrar en muestras preparadas por el método de Freeze-etching.

La virtud de este método de revelar superficies de membranas, permitió la visualización de los filamentos en las superficies de los mismos. En nuestro estudio resaltó la frecuencia con que encontramos ondulaciones e imágenes típicas de cordones en las membranas, que reflejan sin duda el efecto de los filamentos o sus agrupa-

ciones sobre la misma, lo que debe predisponerla lógicamente a la hemolisis. A pesar de estos cambios morfológicos no evidenciamos repercusión sobre las partículas que se adosan a la membrana, salvo algún desplazamiento, lo que unido a su indiferencia en el campo magnético (*Kourí y cols., 1970*), demuestra su diferencia en composición con las partículas intracitoplasmáticas, argumento en contra de la posibilidad de que sean partículas de hemoglobina adosadas a la membrana.

La presencia de fracturas con imágenes en bandas en hematíes totalmente sickleados, fue evidente en un número apreciable de preparaciones, lo que refleja probablemente que sea debido a una fractura inmediatamente por debajo de la membrana. Este criterio puede plantearse si consideramos: el esbozo de membrana observada a los lados de la células (Fig. 7) ; la diferencia de esta imagen con la de fracturas observadas en otros hematíes y las partículas que se observan dispersas sobre las bandas, (posiblemente evidencia de las que se observan adosadas a la cara interna de la membrana) (*Weinstein, 1967 y Koehler, 1967*). La acción del campo magnético ha sido estudiada (*Murayama, 1966*) sobre una suspensión de hematíes falciformes aprovechando su forma alargada, haciendo actuar sobre ella un campo magnético con una intensidad del 3.5 kilogauss, planteándose que la orientación paramagnética de las moléculas de hemoglobina reducida, hace al hematíe falciforme situarse perpendicularmente a las líneas de fuerza.

Por otro lado el efecto del campo sobre las partículas en la superficie de fractura de hematíes normales (*Kourí y cols., 1970*) fue evidente, tanto cuando las líneas de fuerza incidieron verticalmente, como cuando lo hicieron paralelamente a la superficie de fractura. Es lógico pensar que los cordones del hematíe sicklémico constituidos por cadenas de moléculas de hemoglobina fueran afectadas por un campo con una intensidad de 7 a 8 kilogauss, como se demuestra en este trabajo.

Los hallazgos más importantes encontrados en cortes de muestras incluidas de Epon fueron: filamentos distorsionados, glóbulos rojos con filamentos anarquícamente distribuidos en desproporción a la deformación global de la célula, que dan la impresión de una malla o de red de filamentos medianos y pequeños, y diferentes grados de hemolisis en un número apreciable de glóbulos rojos con Hemoglobina S. En las muestras preparadas con el método de "Freeze'etching", además pudimos observar diferencias morfológicas en función del ángulo de incidencia del campo. Esto último rememora las alteraciones reportadas por nosotros anteriormente. (*Kourí y cols., 1970*).

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la participación colectiva de todos los compañeros del Laboratorio de Estructuras Ultrafinas. Queremos agradecer en especial a los

Ingenieros Carlos Lariot y Gyula Stark por su participación en el transcurso del trabajo, y a los compañeros técnicos y empleados de Laboratorio, principalmente Jorge Agüero, Alfredo Alfonso, Antonio Pazos, María Elena Ramos y Emilia Wong por su trabajo técnico.

Agradecemos a los compañeros del Instituto de Hematología del MINSAP el envío de muestras de sangre sicklémica y la ayuda en la confección del manuscrito a las compañeras Matilde Delgado y Olga Marcos.

REFERENCIAS

Bessis M., Bricka M. y Breton-Gorius J. Differents aspects de la surface des erythrocytes falciformes observes au microscope electronique. *Rev. Hematol.*, **8**, 222, 1953.

Bessis M., Normarski G., Thiery J. P. y Mme Breton-Gorius J. Etudes sur la falciformation des globules rouges au microscope polarisant et au microscope electronique. *Hematol.*, **13**, 249, 1958.

Chaterjee S. N. Badhukhan P. y Chaterjea J. B. Electron microscope studies on the Haemoglobin molecules. *J. Biophys and Biochem. Cytol.*, **10**, 113, 1961.

Döbler J. y Bertles J. F. The physical state of hemoglobin in sickle cell anemia erythrocytes in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, **127**, 711, 1968.

Haggis G. J. Electron microscope replics from the surface of a fracture through frozen cells. *J. Byophys. and Biochem. Cytol.*, **9**, 841, 1961.

Koehler J. K. A cell membrane associated specialization of nucleated erythrocytes as revealed by freeze-etching. *J. Cell Biol.*, **35**, 71A, 1967.

Kourí J. y Torres W. Aplicación del método de freeze-etching al estudio de la sangre. *Revista Cenic*, **2**, 59, 1970.

Kourí J., Torres W., Stark G. y Lariot C. Orientación de partículas intracitoplasmáticas en el hematíe por un campo magnético. *Revista Cenic*, **2**, 69, 1970.

Lawrence M., Lesin S. y Policard M. A. Polimérisation hélicoidale des molécules d'hémoglobine dans les érythrocytes falciformes. Etude par cryodécapage. C. R. Acad. Sc. Paris, t 266-1806, 1968.

Luft J. A. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, **10**, 113, 1961.

Millonig G. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solution in fixation. *J. Appl. Phys.*, **32**, 1637, 1961.

Moor H. y Mühlethaler. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *Zeitschrift für Zellforschung*, **62**, 546, 1964.

Murayama M. Molecular mechanism of red cell "Sickling". *Science*, **153**, 145, 1966.

Pauling L., Itano H. A., Singer S. J. y Wells I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, **110**, 543, 1949.

Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH, as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208, 1963.

STETSON CH. A. The state of hemoglobin in sickled erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine,* **123**, 341, 1966.

WEINSTEIN R. S. Ultrastructure of freeze-cleaved and etched red cells membranes and isolated red cell ghost prepared by gradual osmotic lysis. *J. Cell Biol.,* **32**, 71A, 1967.

WEINSTEIN R. S. Y BULLIVANT S. The application of Freeze-cleaving technics to studies on red blood cell fine structure. *Blood,* **29**, 780, 1967.

WEINSTEIN R. S. Y MERK F. B. Periodicity in the cytoplasm of freeze-cleaved sheep erythrocytes. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine,* 125, 38, 1967.

WEINSTEIN R. S. Y WILLIAMS R. A. Freeze-cleaving of red cell membrane in paroxymal hemoglobinuria *Blood,* **30**, 785, 1967.

WHITE J. G. The fine structure of sickled hemoglobin in Situ. *Blood,* **31**, 561, 1968.