

FRAGILIDAD OSMOTICA DE LOS ERITROCITOS DE CARNERO EN RELACION CON SU USO EN EL LABORATORIO CLINICO

Jorge Granados Zúñiga.*

Palabras clave: Hematología, animales de laboratorio, carnero.

RESUMEN

Al notar que los eritrocitos de carnero del Bioterio del Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica, hemolizaban espontáneamente, fueron comparados, por medio de una serie de ensayos de fragilidad osmótica, con los de la Universidad Nacional de Costa Rica, que no mostraban tal característica. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), las cuales se pueden relacionar con condiciones de higiene y nutrición en el mantenimiento de los carneros de laboratorio. (Rev. Cost. Cienc. Med. 1993; 14 (1, 2): 55-59).

INTRODUCCION

La membrana celular de los eritrocitos es flexible, pero prácticamente carece de elasticidad, lo que significa que la célula se rompe si le entra agua hasta exceder un volumen crítico (13). La susceptibilidad de los eritrocitos a hemólisis en solución hipotónica guarda una relación inversa con su tamaño (13), por lo que es interesante notar que los glóbulos rojos de carnero están entre los más pequeños encontrados entre los mamíferos (4). Por otra parte, como la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis puede aumentar o disminuir en estados de enfer-

medad (13), se debe considerar la importancia que tiene controlar las condiciones de mantenimiento de los animales de laboratorio y el manejo de los reactivos biológicos que se producen a partir de ellos, para mantener su calidad, tomando en cuenta que cada especie animal tiene sus propias características fisiológicas. Por ejemplo, se ha indicado que, respecto a la sangre, entre distintas especies varía el tiempo de coagulación, la fragilidad celular, la composición del suero, el pH y otras características (6). Al notar que los eritrocitos de carneros del Hospital San Juan de Dios de Costa Rica (HSJD) hemolizaban espontáneamente (Dra. Judith Muñoz, comunicación personal, 1989) se obtuvo eritrocitos de carnero de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), que resultaron ser más resistentes. Se decidió hacer una comparación mediante pruebas de fragilidad osmótica y discutir las posibles causas de esa diferencia, si existiera, y su importancia para su uso en laboratorio clínico.

Los objetivos del estudio fueron:

1. Comparar la fragilidad osmótica de eritrocitos de carneros criados en diferentes condiciones (UNA vs. HSJD);
2. Comparar la fragilidad osmótica de los eritrocitos de sangre recién obtenida con los de sangre almacenada por 75 horas a temperatura ambiente y con los de sangre almacenada durante el mismo tiempo pero a 4°C;
3. Relacionar las características hematólogicas de los carneros de la UNA y del HSJD con las condiciones de crianza de cada población.

* Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Se compararon dos poblaciones de carneros criados en diferentes condiciones: tres carneros de la Universidad Nacional (UNA), que se mantuvieron en la Escuela de Medicina Veterinaria en el Barreal de Heredia, en potreros a campo abierto y alimentándose con pastos. La otra población fue de dos carneros del Hospital San Juan de Dios (HSJD) mantenidos en cubículos bajo techo alimentándose con concentrado para conejos marca Harrigan Mix y agua a saciedad. No existen registros genealógicos de ninguna de las poblaciones estudiadas, pero aparentemente son el resultado de hibridaciones de diferentes razas que dieron un producto, en ambos casos, de piel clara, de lana y de peso y tamaño similares. Pese a no haber uniformidad genética entre ambas poblaciones no se conoce información sobre variabilidad significativa en la fragilidad osmótica entre carneros de diferentes razas.

Se obtuvo muestras de sangre de cada animal por punción de la vena yugular utilizando jeringas desechables de 20 ml y agujas calibre 20 x 3,9 cm de longitud. Los animales fueron sangrados en el transcurso de 1990 en las siguientes fechas: los de la UNA en marzo 22, junio 5, y agosto 6, y los del HSJD en marzo 27 y junio 6.

Con las muestras de cada individuo se efectuó la primera prueba de fragilidad osmótica unas tres a cuatro horas después del sangrado, la segunda y tercera prueba se realizaron aproximadamente setenta y cinco horas después del sangrado, habiendo almacenado las muestras en refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

Las pruebas de fragilidad osmótica se llevaron a cabo utilizando soluciones de cloruro de sodio con una amplitud de concentraciones de 0,35 a 0,80%, pues se ha reportado que para ovinos la hemólisis se inicia a 0,76% y se completa a 0,40% (13). Estas pruebas y las lecturas de tramitancia se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, siguiendo el

procedimiento que indica Sáenz (12). Se obtuvo información adicional, utilizando los métodos estandarizados para seres humanos, con respecto a la hemoglobina, el hematocrito y el hierro sérico para cada población (12).

Se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

1. Si los carneros se mantienen en diferentes condiciones (UNA versus HSJD) la fragilidad osmótica de sus eritrocitos no va a variar; y
2. La fragilidad osmótica de los eritrocitos no varía si se almacenan por tres días a temperatura ambiente o en refrigeración. Para las pruebas de hipótesis se empleó el análisis estadístico de comparaciones en parejas (2).

RESULTADOS Y DISCUSION

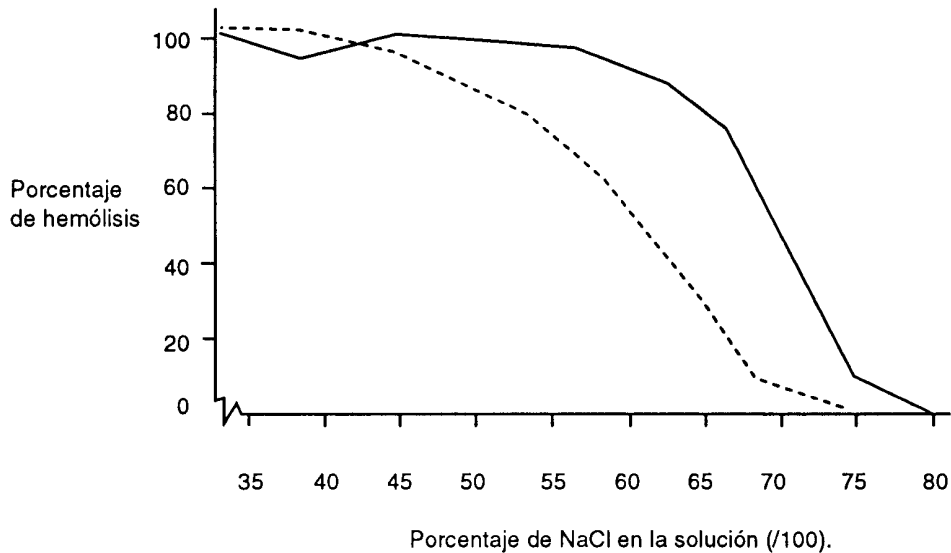
Para las dos poblaciones de carneros, el almacenaje de la sangre durante tres días, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, aumentó significativamente la fragilidad osmótica de los eritrocitos con respecto a la sangre recién obtenida ($P < 0,05$). No existen diferencias significativas en la fragilidad osmótica de los eritrocitos entre la sangre almacenada a temperatura ambiente y la almacenada en refrigeración.

La fragilidad osmótica de los glóbulos rojos de los carneros del HSJD es significativamente mayor que los de la UNA ($P < 0,05$) con cualquiera de los tres tratamientos efectuados (como ejemplo, véase la figura 1).

De acuerdo con estos resultados, se rechazan las dos hipótesis planteadas inicialmente.

La importancia de las condiciones de albergue y mantenimiento de los animales que se utilizan para producir reactivos biológicos de uso en el laboratorio clínico radica tanto en razones éticas (1, 5, 10, 11, 15, 16) como técnicas. Los eritrocitos de carnero son un material biológico de uso común en el laboratorio clínico. Es importante que resistan la manipulación normal sin hemolizarse para

Fig. 1. Porcentaje promedio de hemólisis de los eritrocitos de carnero de la UNA (---) y del HSJD (-----) después de aproximadamente tres horas de sangrados.



la buena marcha de algunos procedimientos como la preparación del reactivo para la prueba de gonadotrofina coriónica enorina (7), la preparación del reactivo de hemolisina anticarnero (8) y su uso posterior en la preparación de reactivo para la prueba del factor reumático (9).

El aumento de la fragilidad de los eritrocitos de los carneros del HSJD respecto a los de la UNA puede deberse a una nutrición o higiene deficientes en los primeros.

Se observó que la población de animales de la UNA se alimentó de pastos, lo cual es adecuado siempre y cuando se controlen las condiciones sanitarias (4). La población del HSJD se mantuvo en corrales bajo techo alimentándose con concentrado para conejos. No obstante ciertas ventajas de manejo e higiene de este tipo de alimentación (4), se ha reportado que utilizar peletas que se preparan para otras especies puede causar envenenamiento por cobre, pues el carnero

es uno de los animales domésticos más sensibles a los efectos del exceso de este elemento (4).

Los eritrocitos de los carneros son sensibles a la hemólisis en condiciones de estrés (por ejemplo inanición, exposición al frío y un ejercicio súbito no habitual) cuando el hígado tiene alto contenido de cobre (13). La población del HSJD podría estar afectada por la primera de estas condiciones, en particular por alguna deficiencia vitamínica o mineral, lo que se ha relacionado con anemias en carneros y con hemólisis aumentada (3, 13).

Por otra parte, cuando las condiciones de higiene no son adecuadas, pueden aparecer enfermedades que causarían un aumento en la fragilidad osmótica de los eritrocitos (13). Tales enfermedades podrían estar relacionadas con la presencia de nematodos y trematodos o con infecciones por *Clostridium hemolyticum* o *Dictyocaulus filaria* (4, 13, 14).

Finalmente, se ha señalado que los eritrocitos pueden indicar la presencia de alguna enfermedad en casos de anemia (13). La anemia no sería una enfermedad primaria sino la consecuencia de una causa subyacente que puede implicar deficiencias nutri-

cionales o de higiene. Otros valores hematológicos de las poblaciones estudiadas parecen indicar la existencia de anemia por deficiencia de hierro en los animales del HSJD (Cuadro 1).

CUADRO 1
VALORES HEMATOLOGICOS DE LAS POBLACIONES DE CARNEROS ESTUDIADAS, COMPARADOS CON VALORES DE REFERENCIA

Característica	Valores observados		Valores de referencia	
	UNA	HSJD	Ref. # 4	Ref. # 13
Hemoglobina (g%)	13,7	8,9	9-15	8-16
Hematocrito (%)	40	25	27-45	28-46
Hierro sérico (ug/100 ml)	145	65	—	—

ABSTRACT

We noticed that sheep erythrocytes at the Animal Care Unit at the San Juan de Dios Hospital hemolyzed spontaneously. They were compared with sheep erythrocytes of the Universidad Nacional Animal Care Unit, which didn't react in that way, through a series of osmotic fragility assays. There were significant differences that could be related to nutrition and hygienic conditions.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Porras por la determinación de los valores que se presentan en el cuadro 1 y al Dr. Luis Cordero por sus comentarios y apoyo.

BIBLIOGRAFIA

1. Central Drug Research Institute. *Symposium on Ethical Use of Laboratory Animals in Biomedical Research*, Lucknow, India: Central Drug Research Institute, 1987: 1-28.
2. Daniel W. W.: *Bioestadística*, 3 ed., México: Editorial Limusa, 1988: 221 -283.
3. Hariharan S.: Nutrition of laboratory animals. *LAIIS Centre News*1984; 12: 2- 35.
4. Hecker J. F.: *The Sheep as an Experimental Animal*, Londres: Academic Press,1983: 1-216.
5. Howard-Jones N.: A CIOMS ethical code for animal experimentation. *WHO Chronicle* 1985; 39(2): 51-56.
6. Jakowska S.: Algunos Problemas de Hematología Comparada. *Revista de Biología Tropical* 1959; 7(2):143-155.
7. Mora J.G., Trejos A., Quesada F.: Preparación de reactivos para la prueba de

- gonadotrofina coriónica en orina (embarazo). En: Confederación Universitaria Centroamericana. *Reactivos para uso en laboratorio clínico*. San José: CSUCA; 1986; 2: 49-55.
8. Muñoz G.: Preparación del reactivo hemosilina anticarnero. En: Confederación Universitaria Centroamericana. *Reactivos para uso en laboratorio clínico*. San José: CSUCA; 1986; 2: 23-25.
 9. Muñoz G., Muñoz J.: Preparación de reactivos para la prueba de factor reumático. En: Confederación Universitaria Centroamericana. *Reactivos para uso en laboratorio clínico*. San José: CSUCA; 1986; 2: 26-29.
 10. National Health and Medical Research Council, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australian Agricultural Council. *Code of practice for the care and use of animals for experimental purposes*, Canberra: Australian Governmet Publishing Service, 1985; 1-12.
 11. Rousell H. C.: The Animal in Research. Ethical Perspectives: An International Overview. En: Rothschild, Hanna A., Adela Rosenkranz y F. A. Duarte (eds.): *Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge*. Preceedings. Regional International Scientific Meeting, Aguas de Lindoia, S. P., Brasil, nov. 18-21. 1986. *Revista Brasileira de Genetica* 1987; 103-113.
 12. Sáenz Renauld G.: *Hematología Teórico-Práctica*, 7 ed., San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica, 1981; 1-491.
 13. Sckalm O. W.: *Hematología Veterinaria*, México: UTEHA, 1964; 1-404.
 14. Sharma R. L., Bhat T.K., Dhar D.N.: Effect of *Dictyocaulus filaria* infection on the osmotic fragility of sheep erythrocytes. *Veterinarian Parasitology* 1989; 30(3): 253-258.
 15. Schoenbaum M., Benhar E. (eds.): Panel discussion on Ethical Aspects of the use of Animals in Research held during the ICLAS Regional Scientific Meeting 1985, Shores, Israel. *Quarterly of the Israel Zoot-technical Association* 1985; 14(1-2): 1-54.
 16. Smith J.B.: Welfare Issues in Animal Experimentation. The Animal Perspective. *ICLAS Bulletin* 1985; 61: 22-24.