



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto de la separación sobre algunos parámetros de función celular

Adriana del Pilar Urbina Bonilla

Universidad Nacional de Colombia
Doctorado en Biotecnología
Bogotá DC., Colombia
2014

Evaluación del efecto de la separación sobre algunos parámetros de función celular

Adriana del Pilar Urbina Bonilla

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología

Directora:
María Marcela Camacho Navarro. MD., PhD.

Grupo de Investigación en Biofísica y Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia
Doctorado en Biotecnología
Bogotá DC., Colombia
2014

Agradecimientos

- A mi directora, la profesora María Marcela Camacho Navarro por su generosidad y apoyo.
- Al Grupo de Biofísica y Biología de Membranas y al Centro Internacional de Física CIF, en los cuales se desarrolló este trabajo.
- Al doctor Michel Andrés García Otorola, gran compañero de trabajo, quien me proporcionó lo más valioso para el trabajo experimental: las muestras.
- Al programa de doctorado en biotecnología, por brindarme valiosos espacios de aprendizaje y por su apoyo para la realización de las pruebas de citometría de flujo.
- A la doctora Diana Granados Falla del Grupo de Inmuno-toxicología por su apoyo y disposición para la adquisición y análisis de los datos de citometría de flujo.
- A mis tutores, la profesora Martha Raquel Fontanilla, Directora del Grupo de Tejidos en el Departamento de Farmacia, y el profesor Ruben Dario Godoy Silva, Director del Laboratorio de Ingeniería Química porque sus sugerencias y comentarios han sido de gran importancia para el desarrollo de este trabajo y para mi proceso de aprendizaje.
- A los ingenieros Eliana Lozano y Juan David Reyes Fernández, del Departamento de Ingeniería Química porque de manera generosa dedicaron su tiempo y experticia para ayudarme a realizar las simulaciones de dinámica de fluidos.
- A la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DIB, programa de apoyo a tesis de investigación en postgrados, proyecto Hermes #14235.
- Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia COLCIENCIAS, por el apoyo recibido a través del programa de biotecnología con los proyectos 222840820479 y 222856933541, y a través del programa ECOS-Nord con los proyectos 22285693354 y 222851928951.
- A la Universidad del Rosario por el apoyo financiero y en tiempo que me han brindado para la realización de mis estudios y la ejecución de mis proyectos.
- Al doctor Luis Fernando Palomino Quintana, mis agradecimientos infinitos por ser mi mentor.

Resumen

Aunque los procedimientos de separación celular son ampliamente utilizados en laboratorios clínicos y de investigación, en medicina transfusional y terapia celular, y en producción biotecnológica, su efecto sobre la función celular no ha sido bien caracterizado. Los glóbulos rojos han sido sugeridos como modelo estándar para estudiar el efecto lesivo de las fuerzas hidrodinámicas, mientras que los macrófagos siendo células adherentes pueden proporcionar información acerca de la respuesta de este tipo de células ante la necesidad de manipularlas en suspensión. En el presente trabajo se estudia el efecto de dos métodos de separación (separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación) sobre algunos parámetros de función celular en glóbulos rojos humanos y en macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2.

Se observó que en glóbulos rojos, la separación celular produce formación de equinocitos, disminución de diámetro y volumen, así como aumento del índice de esfericidad, de manera dependiente de la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas impuestas. Adicionalmente, resulta en hiperpolarización de la membrana mediada por procesos dependientes de calcio y en disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media. En macrófagos, la separación disminuye el volumen celular de manera dependiente de la magnitud del estrés mecánico, así como en hiperpolarización de la membrana, por medio de canales de potasio, sin inducir producción de óxido nítrico.

Se propone considerar la utilización de plasma, suero o albúmina, como aditivos protectores contra el daño celular hidrodinámico, así como la utilización de quelantes de calcio. El análisis de dinámica de fluidos durante la separación hidrodinámica SPLITT permite proponer algunos cambios en el diseño de estos dispositivos, así como de otros sistemas de separación basados en campo y flujo.

Palabras clave: Separación celular, separación SPLITT, centrifugación, estrés mecánico, fuerzas hidrodinámicas, glóbulos rojos, macrófagos.

Abstract

Although cell separation procedures are widely used in clinical and research laboratories, transfusion medicine and cell therapy, and biotech production, its effect on cell function has not been well characterized. Red blood cells have been suggested as a standard model to study the damaging effect of hydrodynamic forces. Macrophages, being adherent cells may provide information about the response of these cells to their manipulation in suspension. This work evaluated the effect of two methods of separation (hydrodynamic separation and centrifugation SPLITT) on some parameters of cell function in human red blood cells and in the mouse macrophage cell line J774.A2.

In red blood cells, cell separation resulted in echinocyte formation; decreased diameter and volume; and increased sphericity index. These effects were dependent on the magnitude of hydrodynamic forces imposed. Moreover, these separation methods induced membrane hyperpolarization through calcium-dependent processes, and decreased mean corpuscular haemoglobin concentration. In macrophages, separation results in decreased cell volume dependent on the magnitude of the mechanical stress, as well as membrane hyperpolarization, through potassium channels, but without inducing nitric oxide production.

We propose to consider the use of plasma, serum or albumin, as shear-protective additives, as well as the use of calcium chelators. Computational fluid dynamic analysis of SPLITT fractionation permit us to recommend some changes in the design of this system, and other field and flow separation devices.

Keywords: Cell separation, SPLITT fractionation, centrifugation, shear stress, hydrodynamic forces, red blood cells, macrophages.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Métodos de separación celular	5
1.1.1 Centrifugación/sedimentación	6
1.1.2 Separación hidrodinámica SPLITT	8
1.2 Las fuerzas hidrodinámicas generan daño celular	9
1.3 Concepto de daño celular	11
1.4 Parámetros para medir daño celular	11
1.5 Aditivos que mitigan el daño celular hidrodinámico.....	12
1.6 La separación genera daño celular hidrodinámico	12
1.7 Las fuerzas hidrodinámicas generan cambios en la membrana celular	14
2. Formulación del problema y objetivos	17
2.1 Objetivos	18
2.1.1 Objetivo general	18
2.1.2 Objetivos específicos.....	18
3. Las técnicas de separación SPLITT y centrifugación no comprometen la viabilidad celular.....	20
3.1 Introducción	20
3.2 Materiales y métodos	21
3.2.1 Obtención y preparación de muestras de sangre periférica.....	21
3.2.2 Cultivo de macrófagos de ratón J774.A2.....	21
3.2.3 Separación hidrodinámica SPLITT	22
3.2.4 Centrifugación.....	23
3.2.5 Viabilidad celular	24
3.2.6 Determinación de viscosidad	25
3.2.7 Análisis estadístico	26
3.2.8 Consideraciones éticas	26
3.3 Resultados y discusión.....	26
3.3.1 Glóbulos rojos.....	26
3.3.2 Macrófagos	28

3.3.3	Efecto protector del plasma autólogo	29
3.4	Conclusiones	31
4.	Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en cambios morfológicos atribuibles a estrés mecánico	33
4.1	Introducción	33
4.2	Materiales y métodos	34
4.2.1	Glóbulos rojos.....	34
	Morfología celular.....	34
	Geometría celular.....	35
4.2.2	Macrófagos de ratón J774.A2.....	37
	Geometría celular.....	37
4.2.3	Fuerzas hidrodinámicas	38
4.2.4	Análisis estadístico	43
4.2.5	Consideraciones éticas	43
4.3	Resultados y discusión.....	43
4.3.1	Glóbulos rojos.....	43
4.3.2	Macrófagos de ratón J774.A2.....	55
	Geometría celular.....	55
	Fuerzas hidrodinámicas.....	57
4.4	Conclusiones	57
5.	Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización de la membrana	60
5.1	Introducción	60
5.2	Materiales y métodos	60
5.2.1	Glóbulos rojos.....	60
	Potencial de membrana	61
5.2.2	Macrófagos de ratón J774.A2.....	63
	Nitritos en el sobrenadante	64
5.2.3	Análisis estadístico	65
5.2.4	Consideraciones éticas	65
5.3	Resultados y discusión.....	66
5.3.1	Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización de glóbulos rojos	66
5.3.2	Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media en glóbulos rojos	68
5.3.3	Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización en macrófagos.....	69
5.3.4	La separación celular no resulta en activación de macrófagos.....	71
5.4	Conclusiones	72
6.	Optimización de dispositivos micro-fluídicos de separación para minimizar el daño celular.....	75
7.	Modelo general de efecto de la separación sobre la función celular	77
7.1	Células en suspensión (glóbulos rojos)	77
7.2	Células adherentes manipuladas en suspensión: macrófagos de ratón J774.A2.....	78

8. Conclusiones y recomendaciones	81
8.1 Conclusiones.....	81
8.2 Recomendaciones	82
Referencias.....	83

Tabla de ilustraciones

Ilustración 1. Representación esquemática de un sistema de separación SPLITT.	9
Ilustración 2. Viabilidad celular en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a diferentes tasas de flujo a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.	27
Ilustración 3. Viabilidad celular en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a centrifugación bajo diferentes aceleraciones.	28
Ilustración 4. Viabilidad celular en macrófagos de ratón J774.A2 antes y después de ser expuestos a dos técnicas de separación.	29
Ilustración 5. Efecto de la suplementación con plasma autólogo sobre la viabilidad de glóbulos rojos sometidos a flujo a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.	30
Ilustración 6. Clasificación de la morfología de glóbulos rojos.	35
Ilustración 7. Macrófagos de ratón J774.A2 cultivados en suspensión.	38
Ilustración 8. Configuración geométrica del tubo de centrifuga.	42
Ilustración 9. Índice morfológico en glóbulos rojos después de haber sido manipulados a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.	44
Ilustración 10. Índice morfológico en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a centrifugación bajo diferentes aceleraciones.	45
Ilustración 11. Diámetro de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación celular.	46
Ilustración 12. Volumen de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación celular.	47
Ilustración 13. Índice de esfericidad de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación.	48
Ilustración 14. Fuerzas hidrodinámicas desarrolladas durante la separación hidrodinámica SPLITT (tasas de flujo 1,5-10,0 ml/min) y la centrifugación (100-1500 g).	49
Ilustración 15. Esfuerzo cortante en el canal SPLITT.	49
Ilustración 16. Esfuerzo cortante en el tubo de centrifuga operado a 1500 g.	51
Ilustración 17. Relación entre máxima tasa de disipación de energía (EDR) y esfuerzo cortante durante separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación*.	52
Ilustración 18. Relación entre presión y máxima tasa de disipación de energía (EDR _{Max}) durante separación SPLITT y centrifugación.	53
Ilustración 19. Efecto protector del plasma contra el daño sub-letal producido por separación hidrodinámica SPLITT.	54
Ilustración 20. Geometría de macrófagos J774.A2 control y sometidos a dos técnicas de separación celular.	56
Ilustración 21. Determinación del potencial de membrana de glóbulos rojos mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente aniónica DiSBAC ₂ (3).	62
Ilustración 22. Determinación del potencial de membrana de macrófagos de ratón J774.A2 mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente aniónica DiSBAC ₂ (3).	64

Ilustración 23. Potencial de membrana en glóbulos rojos antes y después de ser sometidos a dos técnicas de separación celular.	67
Ilustración 24. Índices eritrocitarios medidos antes y después de utilizar dos técnicas de separación celular.	68
Ilustración 25. Potencial de membrana de macrófagos de ratón J774.A2 antes y después de ser expuestos a dos técnicas de separación celular.	70
Ilustración 26. Nitritos en sobrenadante de macrófagos de ratón J774.A2 sometidos a separación hidrodinámica SPLITT (A) y centrifugación (B).	72
Ilustración 27. Modelo teórico propuesto sobre el efecto del estrés mecánico de la separación (SPLITT y centrifugación) sobre glóbulos rojos humanos.	78
Ilustración 28. Modelo teórico propuesto sobre el efecto del estrés mecánico de la separación (SPLITT y centrifugación) sobre macrófagos de ratón J774.A2 (células normalmente adherentes, que han sido cultivadas en suspensión durante 12 horas).	79

Introducción

El propósito de la separación celular es seleccionar positivamente (enriquecer) un tipo celular específico, o bien remover (empobrecer) células no deseadas (selección negativa) (Tomlinson et al., 2012). En investigación biomédica, el enriquecimiento o purificación celular simplifica el estudio de un problema biológico. En biotecnología, disminuye la cantidad de reactivos utilizados en procesos corriente abajo como por ejemplo transferencia de genes, crio-preservación o expansión celular (Nordon and Schindhelm, 1999). En bancos de sangre y tejidos, permite concentrar la cantidad suficiente de células para alcanzar la dosis terapéutica efectiva.

Las separaciones, al igual que otros bioprocesos imponen estrés mecánico a las células que se refleja en muerte celular (daño letal). No obstante, las células viables remanentes experimentan afectación funcional (daño sub-letal) que pueden limitar el rendimiento de bioprocesos corriente abajo, su efectividad terapéutica y el resultado de pruebas bioquímicas y funcionales.

Las células pueden separarse con base en sus propiedades físicas, por ejemplo velocidad de sedimentación (métodos físicos), o más selectivamente mediante la unión específica de anticuerpos monoclonales a antígenos celulares (métodos inmunológicos) (Nordon and Schindhelm, 1999). Las distintas técnicas de separación celular disponibles presentan diferencias en desempeño, costo y la magnitud de los campos de fuerza empleados para ejecutar la separación (Tomlinson et al., 2012), por lo cual el estrés mecánico impuesto a las células no es el mismo.

Técnicas basadas en dispositivos micro-fluídicos permiten la separación celular con base en propiedades físicas de las células tales como su elasticidad en respuesta a campos acústicos, susceptibilidad magnética, tamaño y densidad, sin necesidad de marcaje ("*lab-on-a-chip methods*") (Radisic et al., 2006). Dentro de este grupo, la familia de técnicas hidrodinámicas conocidas como "SPLITT" (del inglés "*Split-flow thin cell fractionation*") utiliza canales delgados rectangulares, tipo Hele-Shaw, con un espesor muy pequeño comparado con su ancho B y longitud L (Jiménez and Naranjo, 1993), a través de los cuales la muestra con una mezcla de células fluye en sentido longitudinal, y por efecto de un campo de fuerza, actuando en sentido perpendicular, se produce la separación (Giddings, 1985). Dado que el campo de fuerza puede ser la gravedad ($1 g$) y que las tasas de flujo empleadas son bajas (<10 ml/min), se ha asumido que es inocua para la función celular (Hoyos, 2003; Benincasa et al., 2005).

En este trabajo se determinó el efecto de dos técnicas de separación sobre algunos parámetros de función celular: separación hidrodinámica SPLITT que aparentemente impone bajo estrés mecánico, y centrifugación/sedimentación, que es una de las técnicas de separación más ampliamente utilizados y mejor comprendidos (Sharpe, 1988). Como modelos celulares se escogieron por un lado glóbulos rojos, los cuales al ser células en suspensión que están expuestas *in vivo* a estrés mecánico en la circulación, son considerados estándar para el estudio del efecto lesivo de diversos ambientes hidrodinámicos (Zhang et al., 1995). Por otro lado, se estudiaron también macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2, que permiten estudiar la respuesta de células que siendo adherentes deben ser manipuladas en suspensión.

Se observó que los glóbulos rojos, por su forma discoide característica responden al estrés mecánico impuesto por estas técnicas de separación celular con la formación de espículas en la membrana adquiriendo forma de equinocito. Así mismo se evidenció disminución de diámetro y volumen celular. Todos estos cambios son prevenidos por la adición de plasma autólogo. Por lo tanto, se recomienda que para células que deben ser manipuladas en suspensiones altamente diluidas y que deben ser utilizadas de inmediato tras la separación, se suplemente el medio con plasma, suero o albúmina.

Por otro lado, la determinación del potencial de membrana mostró ser un indicador sensible del efecto del estrés mecánico de la separación sobre la función celular y, mediante la utilización de una sonda sensible al voltaje se pudo evaluar la respuesta de poblaciones celulares. Se observó que la dilución e incubación a temperatura ambiente en solución salina (NaCl 154 mM) por 1-2 horas, resultó por sí misma en despolarización de la membrana celular, por lo que se recomienda que el medio de suspensión empleado para las separaciones celulares sea lo más cercano posible a la composición del medio extracelular fisiológico del modelo celular en cuestión, e incluya también K, Mg, glucosa y un amortiguador de pH.

Tras la separación celular se observó hiperpolarización de la membrana y reducción del volumen celular, los cuales fueron inhibidos por adición del quelante de calcio ácido etilen-glicol-tetraacético (EGTA), lo que indica que son procesos dependientes de la concentración extracelular de calcio. Esta evidencia lleva a proponer que se considere la adición de quelantes de calcio al medio de suspensión con el fin de prevenir el daño celular asociado a la separación celular. Adicionalmente, se observó disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media.

Mediante análisis computacional de dinámica de fluidos se pudo establecer que durante la separación hidrodinámica SPLITT, efectivamente el estrés mecánico es bajo, del orden de $0,71-4,77 \text{ N/m}^2$, con tasas de disipación de energía máxima de $1,1-79,1 \text{ kW/m}^3$ cuando se utilizan flujos entre 1,5 y 10 ml/min, los cuales corresponden a los parámetros de operación empleados previamente para lograr la purificación exitosa de células sanguíneas y proteínas plasmáticas (Fuh and Giddings, 1995) , así como de macrófagos J774.A1 infectados con *Leishmania* (Hoyos et al., 2009). Sin embargo, fue llamativo que las mayores fuerzas hidrodinámicas se observaron fuera del canal y más específicamente en el conector de la salida inferior, cuyo diámetro es reducido y se encuentra dispuesto en ángulo recto con respecto a la zona de transporte del canal. Lo anterior, lleva a

proponer la necesidad de realizar ajustes en el diseño de los canales SPLITT y de otros dispositivos de separación campo-flujo ("*field and flow fractionation*", FFF), con el fin de minimizar el daño celular y optimizar su desempeño. Por otro lado, se determinó que durante la centrifugación las zonas de mayor estrés se asocian a colisiones de las partículas con las paredes en su trayectoria de sedimentación hacia el fondo del tubo. Se emplearon aceleraciones relativas entre 100 y 1500 *g*, que son las utilizadas en la mayoría de protocolos de lavado y centrifugación simple, así como en gradiente de densidad. Los valores máximos de esfuerzo cortante en centrifugación fueron del orden de $7,9 \times 10^{-8}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ N/m² y la máxima tasa de disipación de energía de $7,9 \times 10^{-3}$ a $9,5 \times 10^{-1}$ kW/m³. Estos valores, se encuentran varios órdenes de magnitud por debajo de los observados durante separación hidrodinámica SPLITT. Sin embargo, teniendo en cuenta que la centrifugación/sedimentación permite manipular células incluso sin necesidad de dilución, sigue siendo el método de elección cuando se requiere concentrar células a partir de una suspensión.

El estudio de la línea celular de macrófagos de ratón J774.A2 permitió determinar el patrón de respuesta a estrés mecánico impuesto por la separación, en células que siendo adherentes deben ser manipuladas en suspensión. Como era de esperarse, el sólo efecto de desprenderlas mecánicamente del frasco de cultivo con el uso de "*scrappers*" y mantenerlas en suspensión durante varias horas, resultó en cambios en el potencial de membrana. De manera específica, en células J774 el tiempo de adherencia aumenta la densidad de corrientes rectificadoras de salida de potasio, de manera que a las 24 horas de adherencia su potencial de membrana en reposo oscila entre -39 y -90 mV (Forero et al., 1999; Ypey and Clapham, 1984). En este estudio, las células mantenidas en suspensión durante 12 horas tuvieron un potencial promedio de -14 mV y tras la separación celular se observó hiperpolarización asociada a reducción de volumen celular. Los implicados son canales de potasio dependientes de voltaje, como quedó en evidencia gracias a la utilización del inhibidor farmacológico 4-amino-piridina (Grissmer et al., 1994). A pesar de los cambios producidos en el potencial de membrana, la separación celular no resultó en aumento de la producción de óxido nítrico, determinada como concentración de nitritos en el sobrenadante, por lo tanto, se sugiere que no se produjo activación de estos macrófagos.

Los macrófagos al ser células que normalmente se adhieren, adoptan forma casi esférica cuando son mantenidas en suspensión, por lo que no se observan cambios en la forma después la separación celular. Sin embargo, se observó disminución de diámetro y volumen, de manera dosis-dependiente con respecto a la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas impuestas. Esta evidencia lleva a proponer la medición de las dimensiones celulares para evaluar respuesta celular ante estrés mecánico y, también como indicador de la recuperación después del mismo tanto en células normalmente suspendidas como en células adherentes mantenidas en suspensión.

Por primera vez se analiza el estrés mecánico desarrollado en un canal SPLITT y se le compara con otro método de separación de amplia utilización como la centrifugación. Aunque el esfuerzo cortante y la tasa de disipación de energía máxima que se desarrollan durante la separación SPLITT son inferiores a las observadas durante centrifugación, las mediciones morfológicas y funcionales realizadas demuestran que no es inocua, como se había asumido hasta ahora (Hoyos, 2003; Benincasa et al., 2005). Adicionalmente, los resultados obtenidos permiten identificar algunos

cambios de diseño que son necesarios con el fin de minimizar el daño celular por estrés mecánico, no sólo de los dispositivos SPLITT sino también de otros del tipo separación campo-flujo (FFF) gravitacional, en lo que se refiere a los conectores de entrada y salida.

1. Marco teórico

El propósito de la separación celular es seleccionar positivamente (enriquecer) un tipo celular específico, o bien remover (empobrecer) células no deseadas (selección negativa). En investigación biomédica, el enriquecimiento de un tipo celular específico simplifica el estudio de un problema biológico. En biotecnología, disminuye la cantidad de reactivos utilizados en procesos corriente abajo como por ejemplo transferencia de genes, crio-preservación o expansión celular. En bancos de sangre y tejidos, permite alcanzar la cantidad suficiente de células para lograr la dosis terapéutica efectiva (Nordon and Schindhelm, 1999).

1.1 Métodos de separación celular

Las células pueden separarse con base en sus propiedades físicas, por ejemplo velocidad de sedimentación (métodos físicos), o más selectivamente mediante la unión específica de anticuerpos monoclonales a receptores de superficie (métodos inmunológicos) (Nordon and Schindhelm, 1999). La selectividad de los métodos de separación se relaciona con la modalidad de separación (Tabla 1). Además de las consideraciones de selectividad, el desempeño de un dispositivo para separación celular está determinado por cantidad de muestra que puede ser procesada por unidad de tiempo, el factor de enriquecimiento y/o depleción, rendimiento y pureza (Tomlinson et al., 2012).

Los métodos de separación basados en propiedades físicas de las células, también llamados no inmunológicos son relativamente rápidos y simples. Sus desventaja es la baja especificidad de la separación cuando los tipos celulares presentes en la muestra no presentan diferencias físicas significativas (Kang and Park, 2005). En los métodos basados en campo gravitacional, las células se separan de acuerdo con su tamaño, forma, densidad o velocidad de sedimentación. Aunque estas características reflejan la función propia del tipo celular, no son tan específicas como lo es el reconocimiento de proteínas de membrana de un método inmunológico. A pesar de ello, las técnicas no inmunológicas son un campo promisorio porque facilitan a los investigadores determinar diferencias incluso sutiles en las propiedades celulares que son de potencial utilidad biomédica y que han llevado a entender mejor la relación existente entre propiedades físicas, morfología y función celular. Por ejemplo, la dielectroforesis ha permitido separar satisfactoriamente subpoblaciones de leucocitos y también ha llevado encontrar correlación entre

la capacitancia de la membrana celular con el área de superficie y con la presencia de estructuras membranosas como pliegues y micro-vellosidades (Yang and Kamino, 1997).

Tabla 1: Sistemas de separación celular.

Propiedades celulares	Métodos de separación
Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugación simple/sedimentación • Centrifugación en gradiente de densidad • Centrifugación elutriada: <ul style="list-style-type: none"> ○ Flujo cruzado ○ Contraflujo
Densidad	
Dispersión de luz	
Genotipo	<ul style="list-style-type: none"> • “Fluorescence-activated cell sorting” FACS
Fenotipo citoplasmático	
Fenotipo de superficie (“cluster of differentiation” CD)	<ul style="list-style-type: none"> • Separación magnética: <ul style="list-style-type: none"> ○ Perlas (3-10µm) ○ Coloides (<100nm) • Separación por afinidad: <ul style="list-style-type: none"> ○ Placas ○ Perlas

Modificado a partir de (Nordon and Schindhelm, 1999).

1.1.1 Centrifugación/sedimentación

En la sedimentación convencional las células sedimentan a través de un líquido bajo la fuerza gravitacional. En los métodos de centrifugación, la velocidad de sedimentación se aumenta haciéndola girar a gran velocidad, con lo que se incrementa la aceleración gravitacional. La centrifugación es el procedimiento estándar para separar células a partir de una suspensión, por ejemplo en todo tipo de lavado, aunque muchas veces se utiliza también para separar distintas clases de células, como plaquetas y glóbulos rojos (Nordon and Schindhelm, 1999).

La velocidad de sedimentación de una célula en una dilución infinita puede ser predicha a partir de la ley de Stokes (Brown, 1989). Cuando el número de Reynolds es inferior a uno, la resistencia al avance a través del fluido, F está dada por la fórmula de Stokes:

$$F = 6 \pi \alpha \mu v \quad (1)$$

Donde α es el radio de la célula, μ la viscosidad del fluido, y v la velocidad de sedimentación. La célula alcanzará la velocidad límite v_0 , cuando la fuerza de resistencia al avance es igual a su peso efectivo, dado por:

$$F = 6 \pi \alpha \mu v_0 = w \left(1 - \frac{\rho}{\rho_c}\right) \quad (2)$$

Dado que el volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi\alpha^3$, el peso de la esfera es $w = \frac{4}{3}\pi\alpha^3\rho g$; por tanto:

$$6 \pi \alpha \mu v_0 = \frac{4}{3} \pi \alpha^3 \rho g \left(1 - \frac{\rho}{\rho_c}\right) \quad (3)$$

Por lo cual:

$$v_0 = \frac{2 \alpha^2 (\rho_c - \rho) g}{9 \mu} = \frac{d^2 (\rho_c - \rho) g}{18 \mu} \quad (4)$$

Siendo d el diámetro celular. Esta velocidad límite se denomina velocidad de sedimentación y como es proporcional a g , puede aumentarse utilizando una centrífuga para aplicar una gravedad efectiva mayor. Para calcular la velocidad en condiciones de centrifugación, se tiene en cuenta la velocidad angular w , y el radio de rotación (distancia desde el centro del rotor) R :

$$v_0 = \frac{d^2 (\rho_c - \rho) w^2 R}{18 \mu} \quad (5)$$

La tabla 2 muestra las velocidades de sedimentación para glóbulos rojos, granulocitos, linfocitos y plaquetas altamente diluidas en plasma a 37°C (Nordon and Schindhelm, 1999). Los granulocitos y los linfocitos tienen coeficientes de sedimentación mayores que los glóbulos rojos, por lo que la formación de una capa blanca (*"buffy coat"*) que contiene los leucocitos, por encima de la masa de glóbulos rojos después de la centrifugación puede parecer paradójica. Sin embargo, la masa de eritrocitos empaquetados tiene una densidad promedio que se acerca a la de un solo glóbulo rojo (1,1 g/cm³), mayor que la de linfocitos o granulocitos (1,06 a 1,08 g/cm³). De esa manera, los leucocitos son desplazados por la masa de glóbulos rojos y emergen en la interfase entre eritrocitos y plasma para formar la capa de *"buffy coat"*.

Tabla 2: Propiedades de sedimentación de células sanguíneas diluidas en plasma a 37°C.

	Eritrocitos	Plaquetas	Linfocitos	Granulocitos
Frecuencia (células/ μl)	5000000	230000	2500	4500
Radio (10^{-4}cm)	2,7 – 2,9	1,0 – 1,2	4,5 -9,0	5,0 – 7,5
Fracción volumétrica (%)	40-50	0,1-0,2	0,1-0,8	0,2-0,8
Densidad (g/cm^3)	1,1	1,05	1,06	1,08
Coefficiente de sedimentación (10^{-9} s)	90-100	4-7	130-530	230-540

Tomado de (Nordon and Schindhelm, 1999).

1.1.2 Separación hidrodinámica SPLITT

La separación hidrodinámica hace referencia al uso de canales finos a través de los cuales un flujo transporta una muestra y ésta se separa por el efecto de un campo de fuerza transversal, por ejemplo gravedad, ultrasonido o campo magnético (Fuh, 2000). Los canales finos de separación por transporte lateral SPLITT (*"Split-flow thin"*) pueden usarse en continuo o por lotes, con fines preparativos para separar células con base en propiedades físicas tales como tamaño, volumen y densidad (Giddings, 1985), pero utilizando velocidades de flujo y campos de fuerza muy bajos en comparación con otros métodos (velocidades de flujo de 1-10 ml/min; campos gravitacionales de 1-2 g), por lo cual tiene un menor impacto mecánico sobre las células (Hoyos, 2003). Utilizando SPLITT se ha separado sangre humana completa en fracciones 92-98% puras de proteínas plasmáticas, eritrocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos y neutrófilos con viabilidades celulares de 97-99% (Fuh and Giddings, 1995); células de mieloma y esplenocitos normales de ratón (Benincasa et al., 2005); macrófagos de ratón infectados con *Leishmania* (Hoyos et al., 2009) y glóbulos rojos infectados con *Plasmodium* (Velasco, K and Cortés, G, 2009).

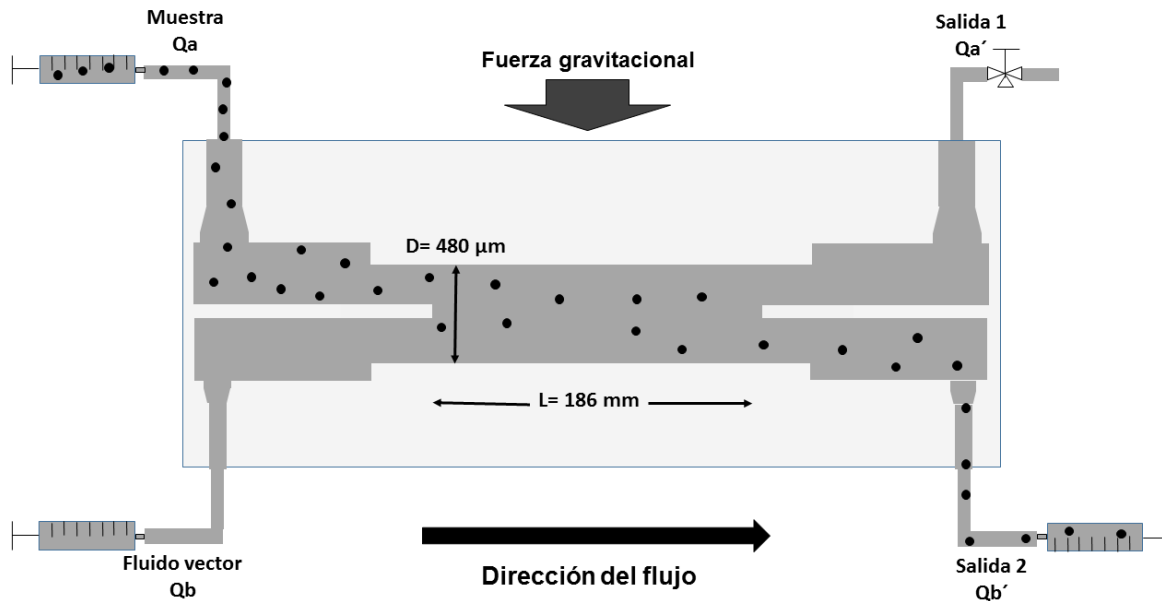
En la ilustración 1 se puede ver que la mezcla de células se introduce al sistema por la entrada superior izquierda y es transportada en sentido longitudinal junto con un fluido transportador que ingresa por la entrada inferior izquierda. La porción central del sistema se conoce como zona de transporte y es en ella donde ocurre la separación celular gracias al efecto de un campo de fuerza perpendicular, que puede ser la gravedad (1 g), permitiendo que células con diferencias en tamaño y densidad se ubiquen en diferentes líneas de flujo y puedan ser recuperadas ya sea por la salida superior o la inferior, ubicadas a la derecha del canal. Las tasas de flujo son controladas mediante bombas de inyección y de succión. En este sistema, la tasa de flujo total Q es equivalente a la suma de la tasa de flujo de la muestra Qa' y del fluido vector Qb' :

$$Q = Qa' + Qb' \quad (6)$$

Tanto el flujo total Q , como la relación entre éste y la tasa de flujo a la entrada y la salida (Qa'/Q y Qa/Q) determinan las fuerzas hidrodinámicas que experimentan las células. Si la relación de flujo

de entrada Qa'/Q , es baja y el flujo total es elevado, las células serán empujadas por el fluido transportador hacia arriba comprimiéndolas contra la pared de la zona de transporte permitiendo su recolección por la salida superior, por el contrario, si dicha relación es alta se favorecerá la sedimentación de las células y su recolección será por la salida inferior.

Ilustración 1. Representación esquemática de un sistema de separación SPLITT.



1.2 Las fuerzas hidrodinámicas generan daño celular

Las células son delicadas y su procesamiento conlleva necesariamente a exponerlas a fuerzas hidrodinámicas de magnitud variable. Fuerzas suficientemente intensas resultan en daño celular evidente y destrucción celular, mientras que unas de menor magnitud pueden inducir diferentes respuestas fisiológicas, sin causar necesariamente daño físico evidente (Chisti, 2001).

Las fuerzas hidrodinámicas pueden ser de dos tipos, esfuerzo cortante (“*shear stress*”) y normal. Ambos se definen como el producto de la viscosidad por el gradiente de velocidad. Sin embargo, en el caso del esfuerzo cortante la dirección del gradiente es perpendicular al flujo (du_x/dy), mientras que en el normal es paralela (du_x/dx) (Hu et al., 2011). En algunos casos, el esfuerzo cortante puede descomponerse en dos partes, una de las cuales es el estrés elongacional. Estas fuerzas pueden deformar la membrana celular y dependiendo de su magnitud y del tiempo de exposición, pueden

generar daño celular (Leverett et al., 1972). En un tubo, el gradiente de cizalla en la pared γ , está determinado por la velocidad V , y por el radio del tubo r , mediante la relación:

$$\gamma = \frac{8V}{2r} \quad (7)$$

A su vez, el esfuerzo cortante en la pared τ , es equivalente al gradiente de cizalla γ , multiplicado por la viscosidad del medio μ :

$$\tau = \gamma \mu \quad (8)$$

Otro parámetro empleado para caracterizar las fuerzas hidrodinámicas y relacionarlas con el daño celular es la tasa de disipación de energía ε (Bluestein and Mockros, 1969) (*“energy dissipation rate”, EDR*), que expresa tanto el componente cortante como el normal del esfuerzo, así como el gradiente de velocidad en tres dimensiones (x, y, z). La EDR es el producto tensorial del tensor de estrés τ , por el tensor del gradiente de velocidad ∇U (Brodkey, 2004; Bird et al., 2007):

$$\varepsilon = \tau : \nabla U \quad (9)$$

Para un fluido Newtoniano incompresible (como es el caso de los medios de cultivo acuosos y las soluciones electrolíticas) en un régimen laminar, transitorio o turbulento, la ecuación (9) se convierte en (Brodkey, 2004):

$$\varepsilon = \tau : \nabla U = \mu [\nabla U + (\nabla U)^T] : \nabla U = \mu \sum_i \sum_j [\nabla U + (\nabla U)^T]_{ij} \nabla U_{ij} \quad (10)$$

Donde μ es la viscosidad del medio, $(\nabla U)^T$ es el transpuesto de ∇U , y ∇U es el gradiente del vector de velocidad dado por:

$$\nabla U = \begin{bmatrix} \frac{\partial U_x}{\partial x} & \frac{\partial U_y}{\partial x} & \frac{\partial U_z}{\partial x} \\ \frac{\partial U_x}{\partial y} & \frac{\partial U_y}{\partial y} & \frac{\partial U_z}{\partial y} \\ \frac{\partial U_x}{\partial z} & \frac{\partial U_y}{\partial z} & \frac{\partial U_z}{\partial z} \end{bmatrix} \quad (11)$$

La EDR representa la tasa a la cual un trabajo es realizado sobre un fluido, o para los propósitos de este trabajo, una célula. Aunque no puede ser medida directamente, puede ser calculada a partir de las ecuaciones (10) y (11), teniendo en cuenta que en las condiciones habituales de separación celular se utilizan medios acuosos como fluido de suspensión, los cuales se comportan como fluidos Newtonianos no compresibles y que el vector de velocidad puede ser determinado con precisión. Esta última condición, limita el uso de la EDR a los sistemas en los cuales se puede realizar la

medición experimental del vector de velocidad U , o éste puede ser determinado analíticamente (flujo laminar).

1.3 Concepto de daño celular

Fuerzas hidrodinámicas suficientemente intensas pueden causar disrupción de la membrana celular y llevar a muerte celular, especialmente en las células animales, carentes de la pared celular que sí está presente en algunos eucariota y procariota. Teniendo en cuenta que cuando se habla de esfuerzo cortante se hace referencia a fuerzas que actúan en dirección tangencial con respecto a la dirección del flujo, se puede entender que las células adherentes experimentan deformación significativa de su membrana. En contraste, las células suspendidas pueden rotar disminuyendo la deformación de su membrana y cambiando continuamente la superficie expuesta al esfuerzo cortante. Las células en suspensión son de hecho, más sensibles al estrés normal (elongacional) que al esfuerzo cortante (García-Briones and Chalmers, 1994). Por lo anterior, existe una diferencia importante entre las fuerzas hidrodinámicas necesarias para afectar o matar una célula adherida a una superficie y una célula en suspensión. La sensibilidad de las células animales a fuerzas hidrodinámicas puede variar de una línea celular a otra, así como entre diferentes clones de una misma línea celular (Godoy, 2008).

En términos prácticos, las células animales pueden tolerar algún nivel de estrés hidrodinámico, pero hay un punto más allá del cual éste causa muerte celular (medida como disminución de viabilidad, aumento de necrosis o apoptosis). Otros efectos lesivos diferentes de la muerte celular son denominados “sub-letales”.

1.4 Parámetros para medir daño celular

Los procedimientos de separación celular resultan en muerte celular, la cual puede ser medida mediante el uso de colorantes que normalmente no penetran la membrana celular (técnicas de exclusión de colorante, por ejemplo azul tripán y yoduro de propidio) o mediante la detección en el sobrenadante de algunos componentes del citosol que son liberados cuando hay daño de la membrana (por ejemplo lactato deshidrogenasa, potasio, y en el caso de glóbulos rojos, hemoglobina) (Sharpe, 1988).

Otros efectos nocivos, distintos de la muerte celular (efectos sub-letales) pueden ser difíciles de medir y dependen en gran medida del tipo celular específico. Cuando se trabaja con células nucleadas, los ensayos de proliferación celular pueden ser utilizados para determinar la afectación producida después de la separación celular. Por su parte, en células del sistema inmune se han

utilizado también la capacidad de fagocitosis, motilidad y expresión de proteínas de superficie, como se revisará más adelante (Sroka et al., 2009; Stanciu et al., 1996; Vachiéry et al., 1999; Zahler et al., 1997). En células tumorales y en fibroblastos, se ha determinado potencial de membrana mediante el uso de sondas fluorescentes (Seidl et al., 1999). Este último abordaje es interesante, por cuanto la membrana celular representa la estructura que en primera instancia sensa y responde al estrés mecánico.

Como se ha mencionado previamente, la sensibilidad a las fuerzas hidrodinámicas es diferente en células adherentes y en células en suspensión. Los glóbulos rojos, al ser células que *in vivo* se encuentran en suspensión y están expuestas a estrés mecánico en el sistema circulatorio, han sido sugeridos como el modelo de referencia para caracterizar el efecto lesivo de diversos ambientes hidrodinámicos (Zhang et al., 1995). Debido a que los eritrocitos no pueden multiplicarse, el efecto lesivo generado por el estrés mecánico no puede ser enmascarado por adaptaciones asociadas a la proliferación (Chisti, 2001), como sí ocurre en algunas líneas celulares (Godoy-Silva et al., 2009).

1.5 Aditivos que mitigan el daño celular hidrodinámico

El daño celular asociado a las fuerzas hidrodinámicas ha sido bien caracterizado en diversos dispositivos de procesamiento industrial, así como el efecto protector de algunos aditivos (Hu et al., 2011). Es bien conocido que en condiciones de cultivo la suplementación con plasma (Zhang et al., 1995), albúmina bovina y suero (Elias et al., 1995) mejora la viabilidad celular por aumento de la tolerancia al estrés mecánico. Mediciones directas han permitido documentar que en presencia de tales agentes la turbulencia y el esfuerzo cortante disminuyen (Hülscher et al., 1990). Aunque el papel del aumento de la viscosidad del medio ha sido controvertido (Croughan et al., 1989; McQueen and Bailey, 1989), otros mecanismos que pueden contribuir al efecto protector son la unión de proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina y fibrinógeno) a las paredes de los bioreactores y dispositivos de manipulación de las células, impidiendo la adhesión celular (Hochmuth et al., 1972), y la transferencia de colesterol desde lipoproteínas plasmáticas hacia la membrana celular, lo que disminuye su fluidez y su sensibilidad al esfuerzo cortante (Ramirez and Mutharasan, 1992).

1.6 La separación genera daño celular hidrodinámico

Las células animales son células que pertenecen a organismos multicelulares y diseñadas para estar asociadas en la mayoría de casos. Aislarlas de su estado nativo con el soporte mecánico y nutritivo que le proporciona un tejido sólido vascularizado, las hace susceptibles a estrés mecánico (Hu et al., 2011). El estrés mecánico impuesto a las células por la separación queda en evidencia por el hecho que algunas de ellas mueren durante el proceso. Comúnmente el efecto de un método de

separación sobre las células de interés suele ser expresado en términos de viabilidad celular, la cual se expresa como el porcentaje de células que permanecen vivas o viables, mediante ensayos de exclusión de colorantes que únicamente entran a células muertas (no viables) (Tomlinson et al., 2012). La viabilidad celular no informa entonces cómo es la función de las células que quedaron vivas después del procedimiento de separación: para conocer el efecto de la separación celular sobre la fisiología celular es necesario conducir estudios funcionales específicos.

El mantenimiento de la viabilidad celular es la característica más importante de un método de separación celular (Nordon and Schindhelm, 1999). En términos biológicos, de nada sirve separar una población celular con un alto grado de pureza si la mayoría de las células están muertas o han experimentado cambios funcionales que pueden afectar su comportamiento durante los ensayos que se realizan después de la separación celular. La viabilidad se preserva mejor cuando las células son separadas en condiciones que son lo más cercanas a aquellas de donde las células son aisladas. Esto usualmente se logra mediante la utilización de un medio de crecimiento o soluciones balanceadas con sales que pueden incluir otros componentes como suero o albúmina. Los medios de separación no deben incluir ningún componente que pueda alterar las células. Debido a que el estrés físico producido por la exposición prolongada a fuerzas gravitacionales (g) elevadas (centrifugación) o por el paso a través de matrices sólidas (cromatografía de afinidad), también genera cambios en las células, es absolutamente necesario minimizar el tiempo de separación (Sharpe, 1988), aunque la utilización de métodos basados en fuerzas de separación de menor magnitud pueden en teoría preservar mejor la función celular.

El efecto que tienen algunos métodos de separación sobre la función celular clásicamente ha sido estudiado en células del sistema inmune utilizando pruebas funcionales específicas. Se ha comparado el efecto de la separación inmuno-magnética y de la centrifugación en gradiente de densidad con Percoll® sobre la función de neutrófilos humanos obtenidos a partir de sangre periférica (Zahler et al., 1997), estudiando la expresión de la integrina CD-11b (que indica pre-activación celular) mediante citometría de flujo y la producción de radicales libres de oxígeno mediante quimioluminiscencia con la reacción de lucigenina, sin encontrar diferencias entre los dos métodos de separación. Teniendo en cuenta que los ensayos carecían de células control no sometidas a separación que tuvieran nivel de pureza equivalente a la de los grupos experimentales, no es posible establecer conclusiones acerca del efecto de la separación *per se* sobre la función celular; solamente puede concluirse que los efectos de la separación inmuno-magnética y la centrifugación en gradiente de densidad sobre la pre-activación y activación de neutrófilos y sobre su capacidad de producción de radicales libres de oxígeno son similares.

También en neutrófilos, se ha estudiado la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clases I y II (MHC I y MHC II, respectivamente) sometidos a centrifugación en gradiente de densidad de Percoll®, con respecto a aquellos purificados a partir de sangre periférica mediante lisis de glóbulos rojos (células control) (Vachiéry et al., 1999). Los neutrófilos sometidos a centrifugación expresaron 26% menos antígenos MHC clase I y 33% menos antígenos MHC II en comparación con células purificadas mediante lisis hipotónica de glóbulos rojos.

Más recientemente, se estudió el efecto de 5 métodos de separación distintos sobre motilidad de leucocitos polimorfonucleares humanos (Sroka et al., 2009). Se comparó un método de aislamiento a partir de coágulos sanguíneos mediante lisis hipotónica de eritrocitos, con 4 métodos basados en centrifugación: sedimentación en cloruro de amonio (160 xg), centrifugación en gradiente de densidad usando Percoll® (20000 g), usando Ficoll®-400 (400 g) y Dextrán-T500 (400 g). La morfología y el desplazamiento de las células fueron evaluados mediante microscopía de luz con video-registro y análisis de imágenes. Se encontró que los leucocitos aislados mediante el método de coágulos y mediante centrifugación con Percoll® presentan mayor capacidad de movimiento, mientras que las células separadas por centrifugación en cloruro de amonio, Ficoll®-400 y Dextrán-T50 mostraron disminución de la motilidad y del área de superficie. Teniendo en cuenta la magnitud de la fuerza gravitacional g aplicada en cada método, se puede concluir que no se observó asociación entre la fuerza aplicada durante la separación y el impacto sobre la motilidad celular. En cambio, parece ser el medio de suspensión empleado durante la centrifugación el que determina los cambios funcionales observados.

Por otro lado, ensayos realizados con linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos han mostrado que las células seleccionadas positivamente mediante técnica inmuno-magnética producen más interleucina-4 (IL-4) que aquellas seleccionadas negativamente (Stanciu et al., 1996). Los niveles de IL-4 se determinaron en lisados celulares y sobrenadantes de medio de cultivo después de 20 horas de incubación. Los hallazgos sugieren que la utilización de anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 de alguna manera conduce a activación de linfocitos T e incrementa su producción de IL-4.

Además de esta aproximación al estudio de la función celular especializada, otro posible abordaje es el de utilizar pruebas más generales, por ejemplo el potencial de membrana. En este sentido, se ha determinado que la separación mediante “*sorting*” celular resulta en hiperpolarización significativa de la membrana de células tumorales de cáncer de mama BT474 así como de fibroblastos normales de piel N1 (Seidl et al., 1999).

1.7 Las fuerzas hidrodinámicas generan cambios en la membrana celular

Las células responden a estrés mecánico con cambios rápidos en las propiedades eléctricas de su membrana por activación de canales iónicos, cascadas de señalización, expresión de moléculas de adhesión celular y regulación génica (White and Frangos, 2007).

Si bien todas las células detectan y responden a fuerzas mecánicas en el medio externo (por ejemplo, cizallamiento), estos mecanismos sirven también para responder a cambios en su medio interno, como por ejemplo estrés osmótico que lleva a deformaciones de membrana y activan mecanismos regulatorios para reducir el volumen celular (Haswell et al., 2011). Los canales iónicos activados por estiramiento responden directamente a estos estímulos físicos y los traducen en

señales eléctricas, generando cambios en el potencial de membrana y modificaciones en la tasa de crecimiento celular y en el patrón de expresión génica (Arnadóttir and Chalfie, 2010; Shivashankar, 2011). Sin embargo, en el caso de células anucleadas que carecen de maquinaria transcripcional y traduccional, como algunos glóbulos rojos, la respuesta celular a estrés mecánico y osmótico clásicamente lleva a cambios morfológicos así como cambios regulatorios en el volumen celular (Sakota et al., 2009).

Los eritrocitos, que están fisiológicamente expuestos a fuerzas hidrodinámicas *in vivo*, son altamente sensibles a estrés mecánico y responden a deformaciones locales de la membrana con aumento del calcio intracelular (Larsen et al., 1981) y activación de corrientes de potasio dependientes de calcio (IK1, IK_{Ca}3.1 o canal Gardos) que producen hiperpolarización de la membrana (Johnson and Tang, 1992; Johnson, 1994). Con el citoplasma más negativo con respecto al medio extracelular, se establece un gradiente eléctrico que favorece la fuga de cloruro y disminución del volumen celular (Dyrda et al., 2010). Por otro lado, tanto el aumento de la concentración citosólica de calcio como la disminución del volumen celular resultan en formación de equinocitos. La primera, por externalización de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Lin et al., 1994); y la segunda por fosforilación de la proteína de membrana banda 3 (Ferru et al., 2011). De igual manera, las células que son adherentes *in vivo* también responden con cambios de membrana cuando son expuestas a flujo. Por ejemplo, macrófagos de ratón de la línea celular J774.A1 responden al estrés mecánico inducido por el flujo con cambios en la conductancia de canales de potasio. La deformación de la membrana activa canales de potasio conocidos como rectificadores retardados (I_{Kd} o Kv1.3/1.5) que resulta en hiperpolarización (Randriamampita and Trautmann, 1987; Martin et al., 1995). Estos canales iónicos también son importantes en la respuesta de activación celular inducida por lipopolisacárido (LPS) y en la producción de óxido nítrico (Vicente et al., 2003, 2005).

2. Formulación del problema y objetivos

Las separaciones celulares son ampliamente utilizadas en laboratorios de investigación y diagnóstico clínico, en producción biotecnológica y en bancos de sangre y de tejidos. Un método ideal de separación celular debe permitir procesar volúmenes de muestra altos y obtener poblaciones celulares con elevado grado de pureza, preservando tanto la viabilidad como la función celular (Sharpe, 1988). Desafortunadamente, las separaciones celulares, al igual que otros bio-procesos imponen sobre las células fuerzas hidrodinámicas que son lesivas y que se reflejan en muerte celular y alteraciones funcionales en las células remanentes (Chisti, 2001; Hu et al., 2011). Aunque se conocen los efectos de algunas técnicas de separación sobre la función específica de células del sistema inmune (Stanciu et al., 1996; Zahler et al., 1997; Vachiéry et al., 1999; Sroka et al., 2009), no se conoce el modelo general de respuesta de las células animales ante el estrés mecánico impuesto por las bio-separaciones. Los glóbulos rojos humanos son el modelo celular mejor conocido y el hecho de estar *in vivo* en suspensión y expuesto a fuerzas hidrodinámicas los convierten en un estándar para el estudio del efecto lesivo del estrés mecánico (Zhang et al., 1995). Sin embargo, es esperable que la respuesta observada en células adherentes sea diferente.

En las últimas décadas se ha desarrollado una familia de técnicas de separación que utilizan dispositivos micro-fluídicos y campos de fuerza reducidos, por lo que preservan la viabilidad celular y se ha asumido que no impactan la función celular (Benincasa et al., 2005; Gossett et al., 2010).

La hipótesis de trabajo de esta investigación fue que el estrés mecánico impuesto por las técnicas de separación celular genera cambios funcionales en las células, que pueden ser medidos mediante el uso de indicadores, aplicables en varios modelos celulares. Se investigó el efecto de la separación hidrodinámica SPLITT, que de manera característica emplea tasas de flujo bajas y el campo gravitacional (1 *g*) (Giddings, 1985; Fuh and Giddings, 1995; Hoyos, 2003), y se comparó con la centrifugación/sedimentación, que es una de las técnicas más utilizadas y mejor comprendidas para separar y lavar células y que impone campos gravitacionales de mayor magnitud. Los modelos de estudio fueron por un lado glóbulos rojos humanos, como estándar de células en suspensión, y por otro macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2, células normalmente adherentes e inmortalizadas. Se evaluó la función celular mediante análisis de forma, diámetro y volumen celular, así como el potencial de membrana y concentración de hemoglobina corpuscular media. El estrés mecánico impuesto sobre las células por la separación se determinó mediante análisis computacional de dinámica de fluidos para calcular esfuerzo cortante y tasa de disipación de energía.

Los resultados obtenidos permitieron analizar el efecto de las fuerzas hidrodinámicas impuestas por dos técnicas de separación sobre la función celular; proponer un modelo general de respuesta celular al estrés mecánico de la separación; y demostrar la utilidad del análisis de la forma y geometría celular y del potencial de membrana para caracterizar el efecto “biológico” de los procedimientos de separación celular. Se realizaron sugerencias con respecto a la formulación del medio de suspensión para realizar las separaciones; y con base en el análisis de dinámica de fluidos, se propusieron cambios en el diseño de los dispositivos de separación celular SPLITT con el fin de minimizar el daño celular y mejorar su implementación.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Determinar el efecto del estrés mecánico de dos técnicas de separación sobre algunos parámetros funcionales celulares.

2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de dos técnicas de separación sobre la morfología de glóbulos rojos humanos.
- Determinar el efecto de dos técnicas de separación sobre la función de glóbulos rojos humanos.
- Determinar el efecto de dos técnicas de separación sobre la morfología de la línea celular de macrófagos de ratón J774.A2.
- Determinar el efecto de dos técnicas de separación sobre la función de la línea celular de macrófagos de ratón J774.A2.

3. Las técnicas de separación SPLITT y centrifugación no comprometen la viabilidad celular

3.1 Introducción

La obtención de fracciones de glóbulos rojos con alto grado de pureza, rendimiento y viabilidad es de importancia en bancos de sangre y medicina transfusional. El procesamiento en banco de sangre, al igual que otros procesos industriales impone fuerzas mecánicas a los eritrocitos que pueden resultar tanto en hemólisis con daño sub-letal de las células remanentes que limitan su función normal y compromete su efectividad terapéutica una vez transfundidos (Sowemimo-Coker, 2002).

La separación hidrodinámica SPLITT en modo gravitacional (1 *g*) utiliza canales pequeños y finos del tipo Hele-Shaw (Jiménez and Naranjo, 1993), a través de los cuales se hace fluir la muestra y la separación ocurre debido a un campo de fuerza perpendicular al flujo (la gravedad, en este caso), gracias a diferencias en propiedades físicas tales como densidad y tamaño celular. Además de la gravedad, pueden ser utilizados campos de fuerza electromagnética y ultrasonidos (Fuh, 2000). La separación SPLITT puede ser utilizada en continuo para procesar volúmenes de sangre grandes y obtener fracciones de glóbulos rojos, plaquetas y proteínas plasmáticas en corto tiempo, con pureza y viabilidad elevadas (Fuh and Giddings, 1995); estas características combinadas con la utilización de tasas de flujo muy bajas que minimizan daño celular, hacen de SPLITT una técnica atractiva para separaciones a gran escala. Por su parte la centrifugación es el método tradicional para concentrar glóbulos rojos a partir de sangre completa. En condiciones de banco de sangre se utilizan aceleraciones relativas de hasta 1500 *g* durante 15 minutos para producir unidades de glóbulos rojos, con hemólisis inferior a 1% (American Association of Blood Banks, 2012). Lo anterior hace que la centrifugación sea considerada un método de referencia para separación celular.

Los glóbulos rojos, al ser células en suspensión que están expuestas *in vivo* a estrés mecánico en el torrente circulatorio, han sido sugeridas como el modelo celular estándar para el estudio

comparativo del potencial lesivo de diversos ambientes hidrodinámicos (Chisti, 2001; Zhang et al., 1995). Debido a que los eritrocitos humanos son células post-mitóticas anucleadas son incapaces de multiplicarse y los efectos lesivos del estrés mecánico no pueden ser enmascarados por cambios adaptativos en la tasa de proliferación, como sí ocurre en otros tipos celulares (Godoy-Silva et al., 2009). Por su parte los macrófagos de ratón J774.A2 son células normalmente adherentes que deben ser disociadas mecánicamente para ser puestas en suspensión y manipuladas a través de un dispositivo de separación celular, por lo cual se espera que su respuesta a las fuerzas hidrodinámicas sea diferente. El propósito del siguiente grupo de ensayos fue determinar el efecto de las dos técnicas de separación (SPLITT y centrifugación) sobre la viabilidad celular en glóbulos rojos humanos y macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2 como paso inicial para luego cumplir con los objetivos propuestos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Obtención y preparación de muestras de sangre periférica

A partir de voluntarios sanos se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica las cuales fueron recolectadas en tubos con EDTA (Vacutainer®, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para evitar interacciones entre células, fue necesario preparar suspensiones altamente diluidas (dilución 1:100; hematocrito final 0,5%). Teniendo en cuenta que para las técnicas de separación hidrodinámica se utilizan habitualmente soluciones salinas isotónicas (Fuh and Giddings, 1995; Assidjo et al., 1999), se utilizó como fluido para preparar las suspensiones celulares y como fluido vector para separación SPLITT, una solución electrolítica con la siguiente composición (en mM): 140 NaCl; 5 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 10 glucosa; pH 7,4; 292±0,8 mOsm/l (reactivos de Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). El pH fue medido con un electrodo de pH (Sartorius pH meter PB-11, Sartorius Intech USA LLC, Bohemia, NY, USA) y ajustado a 7,40 mediante la adición de NaOH. La osmolaridad de la solución fue determinada con un osmómetro de vapor (Vapro® 5600, ELITech Group Wescor Biomedical Systems, Logan, UT, USA) y fue 292±08 mOsm/l. Todos los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente (25°C).

3.2.2 Cultivo de macrófagos de ratón J774.A2

Por ser células normalmente adherentes e inmortalizadas los macrófagos de ratón J774.A2 fueron empleados como controles para compararlos con glóbulos rojos. Macrófagos peritoneales de ratón de la línea J774.A2 obtenidos a partir de la ATCC (TIB 67) fueron mantenidos en monocapa en botellas de 25 cm² a 37°C y 5% de CO₂, empleando medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal al 10% (v/v) de bovino proveniente de un mismo lote (Invitrogen). Para realizar los ensayos de separación fue necesario desprender los macrófagos de las botellas de cultivo y ponerlos en suspensión; dado que el proceso de disociación con tripsina es

ineficiente en esta línea celular, se optó por disociarlos mediante el uso de raspadores (Nunc®, Cell Scrapers, Thermo Scientific, USA). Después de la disociación mecánica, los macrófagos fueron resuspendidos en tubos de polipropileno de 15 ml (Falcon®, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) con medio de cultivo sin suero fetal bovino, toda vez que se utilizó la determinación de lactato deshidrogenasa como indicador de muerte celular, y el suero contiene elevada actividad de esta enzima, suficiente para interferir con la determinación de viabilidad celular.

Para la realización de los ensayos de separación, se prepararon suspensiones celulares altamente diluidas con el fin de evitar colisiones entre células que alteran el patrón de flujo e incrementan estrés mecánico, empleando una concentración final de células equivalente a la utilizada para glóbulos rojos. A partir de las células cultivadas en suspensión por 12 horas, se realizaron diluciones hasta alcanzar un recuento celular de 3×10^9 células/l, utilizando una solución de composición (en mM): 140 NaCl; 5 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 10 glucosa; pH 7,4; $292 \pm 0,8$ mOsm/l (reactivos de Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). El recuento celular fue determinado mediante citometría de impedancia utilizando un contador de partículas (Coulter® Z2, Beckman Coulter, USA); este método permite la determinación del número de células haciéndolas pasar en suspensión altamente diluidas, a través de una celda con una solución electrolítica conductora a través de la cual fluye corriente y cuya resistencia eléctrica es conocida, cada vez que pasa una célula ésta es detectada como un cambio de resistencia por interferir con la resistencia generada por el paso sólo de fluido.

3.2.3 Separación hidrodinámica SPLITT

Glóbulos rojos

Se preparó un volumen de 50 ml de suspensión celular (hematocrito 0,5% en solución electrolítica isotónica; recuento celular 4×10^4 células/ μ l), a partir del cual llenó una jeringa de polipropileno 10 ml (Plastipak® referencia 302499, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) que sirvió como fracción de entrada. Se empleó un canal de separación SPLITT de 186 mm de largo, 20 mm de ancho y 0,250 mm de profundidad. Las suspensiones celulares fueron pasadas una sola vez por el canal inyectándolas por la entrada superior *a'* con una tasa de flujo constante de 0,2 ml/min. El fluido vector se inyectó a través de la entrada inferior *b'* con flujos variables entre 1,3 y 9,8 ml/min, para alcanzar flujos totales entre 1,5 y 10 ml/min (Ilustración 2; tabla 3), valores que corresponden con los utilizados previamente para la separación de células sanguíneas y proteínas plasmáticas (Fuh and Giddings, 1995). Las fracciones de salida fueron recolectadas por la salida inferior para la determinación de hemoglobina libre en el sobrenadante. Las tasas de flujo fueron controladas con bombas de inyección y de succión (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Macrófagos J774.A2

El procedimiento para someter los macrófagos a separación hidrodinámica SPLITT fue similar al realizado para glóbulos rojos, para poder comparar el efecto del mismo tratamiento sobre los dos modelos celulares (Tabla 3). Se empleó como control negativo la misma fracción de entrada sin haber sido expuesta al canal de separación. Para controlar el efecto de la dilución y manipulación de la muestra se utilizaron macrófagos tomados directamente del cultivo en suspensión, sin diluir. El orden en el cual se emplearon las diferentes tasas de flujo fue aleatorio. Todas las muestras fueron procesadas 1 hora después y de manera simultánea. Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabla 3. Condiciones de operación de la celda de separación hidrodinámica SPLITT.

Flujo muestra Qa' (ml/min)	Flujo fluido vector Qb' (ml/min)	Flujo total Q (ml/min)	Qa'/Q
0,2	1,3	1,5	0,133
0,2	2,8	3,0	0,067
0,2	4,3	4,5	0,044
0,2	6,3	6,5	0,031
0,2	7,8	8,0	0,025
0,2	9,8	10,0	0,020

3.2.4 Centrifugación

Glóbulos rojos

Para los ensayos de centrifugación, se preparó un volumen de 60 ml de suspensión celular (hematocrito 0,5% en la solución electrolítica isotónica), a partir del cual se dispensaron 10 ml en 6 tubos de polipropileno de 15 ml (Falcon®, BD Biosciences, San Jose, CA, USA): un tubo fue considerado como control negativo no centrifugado y 5 tubos fueron centrifugados utilizando aceleraciones relativas de 100, 200, 400, 900 y 1500 g durante 10 minutos sin freno, éstos parámetros corresponden con los utilizados habitualmente para la realización de lavados de células y para la preparación de componentes sanguíneos en banco de sangre (American Association of Blood Banks, 2012); el orden de centrifugación fue aleatorio. Se empleó una centrífuga de rotor de ángulo fijo (Biofugue R Prime, Thermo Scientific Sorvall, USA). Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Macrófagos J774.A2

El procedimiento para someter los macrófagos a centrifugación fue similar al realizado para glóbulos rojos, para poder comparar el efecto del mismo tratamiento sobre los dos modelos celulares. Se empleó como control negativo la misma fracción de entrada sin haber sido expuesta a centrifugación. Para controlar el efecto de la dilución y manipulación de la muestra se utilizaron macrófagos tomados directamente del cultivo en suspensión, sin diluir. El orden en el cual se emplearon las diferentes tasas de flujo fue aleatorio. Todas las muestras fueron procesadas de manera simultánea. Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.5 Viabilidad celular

Glóbulos rojos

Las fracciones de salida del canal SPLIT fueron recolectadas y centrifugadas a 4°C para obtener sobrenadantes. Inicialmente, se centrifugó a 2750 g durante 15 minutos y los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos, para realizar una segunda centrifugación a 21000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes así obtenidos fueron congelados a -30°C hasta su procesamiento. Un volumen remanente de la fracción de entrada, no sometida a separación alguna sirvió como control negativo. El proceso de obtención de sobrenadantes fue el mismo tanto para los controles negativos no sometidos a separación como para las fracciones de salida obtenidas después de los tratamientos (todos los flujos en SPLIT y todas las aceleraciones relativas en centrifugación), de manera que pudiera controlarse el efecto de la manipulación de la muestra y del proceso de obtención de los sobrenadantes.

El daño celular lítico (muerte celular) después de la separación celular puede medirse mediante la detección en el sobrenadante de algún componente del citosol, en el caso de glóbulos rojos, hemoglobina libre en el sobrenadante. Las concentraciones de hemoglobina en los sobrenadantes se determinaron mediante técnica espectrofotométrica a 540 nm , utilizando un lector de absorbancia en placas de 96 pozos (Ultramark EX, BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). El espectro de absorción de hemoglobina (tanto oxigenada como desoxigenada) en el rango visible se caracteriza por un pico de absorción entre 500 y 600 nm . Por lo tanto, se utilizó la medición de absorbancia a 540 nm en sobrenadantes obtenidos después de separación SPLIT y centrifugación para estimar la viabilidad celular en glóbulos rojos. Se construyó una curva de calibración con un estándar de 100% de hemólisis mediante lisis hipotónica con agua y 12 diluciones seriadas hasta una concentración equivalente a 0,024% de hemólisis.

Teniendo en cuenta que algunas condiciones de estrés mecánico en glóbulos rojos, se ha informado que el plasma tiene un efecto protector mejorando la viabilidad celular (Zhang et al., 1995; Kameneva et al., 1997), se realizaron algunos ensayos empleando plasma autólogo a 10%.

Macrófagos

Normalmente la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) es significativamente mayor en el citosol con respecto al medio extracelular, de manera que ante la ruptura de la membrana plasmática ocurre liberación del contenido intracelular y pueden medirse niveles incrementados de LDH en el sobrenadante. La viabilidad celular en macrófagos se determinó por la detección de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante, mediante técnica cinética ultravioleta (340 nm) (LDH-L-SL, ELITech Clinical Systems, Francia), utilizando un lector de absorbancia en placas de 96 pozos (Ultramark EX, BioRad Laboratories Inc., USA). La actividad de LDH se midió por cuantificación de la reducción de NAD en presencia de lactato para producir NADH^H y piruvato. La actividad de la enzima se calculó a partir del cambio de absorbancia en el tiempo (Δ Absorbancia/minuto en 159 segundos; de acuerdo con las recomendaciones del fabricante). Se construyó una curva de calibración con un estándar de 100% de lisis y 12 diluciones seriadas hasta una concentración equivalente a 0,024% de lisis. Para garantizar la lisis total de los macrófagos, el estándar de 100% de lisis se preparó utilizando agitación mecánica en vórtex y una solución de saponina 0,15% p/v en NaCl 154 mM, pH 7,4. Dado que el suero fetal bovino tiene actividad de LDH, para los ensayos de viabilidad se utilizaron macrófagos cultivados en suspensión por 12 horas en medio de cultivo RPMI 1640 sin suero.

Las fracciones de salida del canal SPLIT y sus controles negativos, fueron recolectados y centrifugados a 4°C para obtener sobrenadantes. Inicialmente, se centrifugó a 2750 g durante 15 minutos y los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos, para realizar una segunda centrifugación a 21000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes así obtenidos fueron congelados a -30°C hasta su procesamiento. En el caso de los ensayos de centrifugación, los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos y fueron centrifugados una sola vez a 21000 g durante 15 minutos a 4°C; los sobrenadantes así obtenidos fueron congelados a -30°C hasta su procesamiento.

3.2.6 Determinación de viscosidad

La viscosidad dinámica de las soluciones utilizadas para diluir las células fue determinada con un reómetro (Reometer CVOR-200, Bohlin Instruments, Malvern Instruments Ltd., Westborough, MA, USA). La solución fue servida sobre una placa de 40 mm de diámetro con ayuda de una cuchara, sobre la cual se aplicó un gradiente de cizalla controlado con un cono. Los ensayos fueron realizados a 25°C. Todas las soluciones evaluadas mostraron comportamiento Newtoniano y la viscosidad se determinó como la pendiente de la relación entre esfuerzo cortante y gradiente de cizalla.

3.2.7 Análisis estadístico

En el texto, los resultados se presentan como media \pm 1 desviación estándar. Para facilitar la apreciación visual de la significancia estadística de las diferencias observadas, en todas las ilustraciones las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%; una diferencia se considera estadísticamente significativa cuando el intervalo de confianza no se sobrepone. La distribución de los datos se evaluó mediante prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre diferentes tasas de flujo empleadas en SPLITT y entre diferentes aceleraciones relativas en centrifugación, se realizaron mediante análisis de varianza para mediciones repetidas o prueba de Friedman con análisis *post hoc* con prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

En los glóbulos rojos sometidos a separación SPLITT en presencia de plasma, se utilizó análisis de varianza de dos vías con análisis *post hoc* de Bonferroni. Se estableció un nivel de significancia en un valor $p < 0,05$ e intervalo de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e IBM® SPSS v 20.0 (IBM Inc., New York, NY, USA).

3.2.8 Consideraciones éticas

Durante la realización de este estudio se cumplieron las normas para investigación con seres humanos y para la manipulación de muestras de origen biológico (resolución 8430 de 1993, República de Colombia; Declaración de Helsinki) y se recibió la aprobación del comité de ética institucional (Centro Internacional de Física y Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Glóbulos rojos

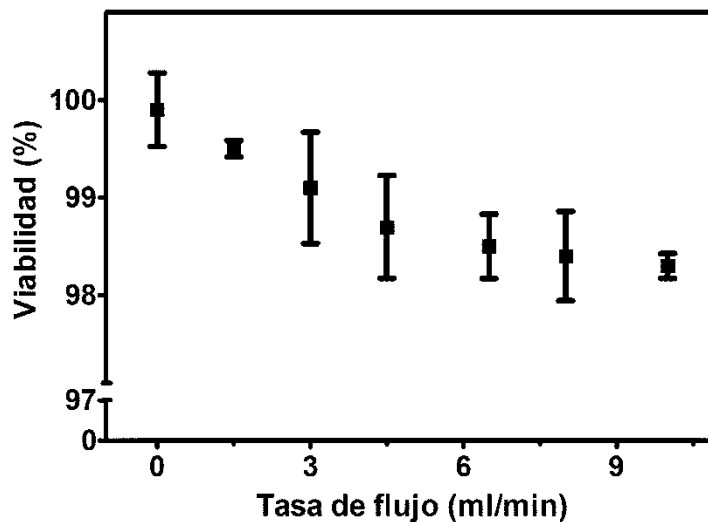
La viabilidad celular promedio, medida como presencia de hemoglobina libre en el sobrenadante después de un paso a través del canal SPLITT estuvo por encima de 98% para todas las tasas de flujo evaluadas ($p=0,0001$) (Ilustración 2). Sin embargo, con respecto a la fracción de entrada no manipulada a través del canal, la viabilidad fue significativamente menor cuando se utilizaron tasas de flujo de 4,5 ml/min y mayores.

El mantenimiento de la viabilidad celular en glóbulos rojos después de separación hidrodinámica SPLITT en modo gravitacional ha sido informado previamente por Giddings y colaboradores,

quienes utilizaron 5 pasos secuenciales con tasas de flujo entre 1 y 10 ml/min y con aceleraciones relativas entre 2,4 y 165 g , usando como fluido transportador solución salina y amortiguador fosfato (PBS), obteniendo fracciones de eritrocitos con viabilidad promedio de $99\pm 1\%$ (Fuh and Giddings, 1995). No obstante, en ese estudio no se determinó el efecto de los distintos parámetros de operación (flujo y aceleración gravitacional) sobre la viabilidad, ésta sólo se evaluó una vez finalizados los 5 pasos del proceso de separación.

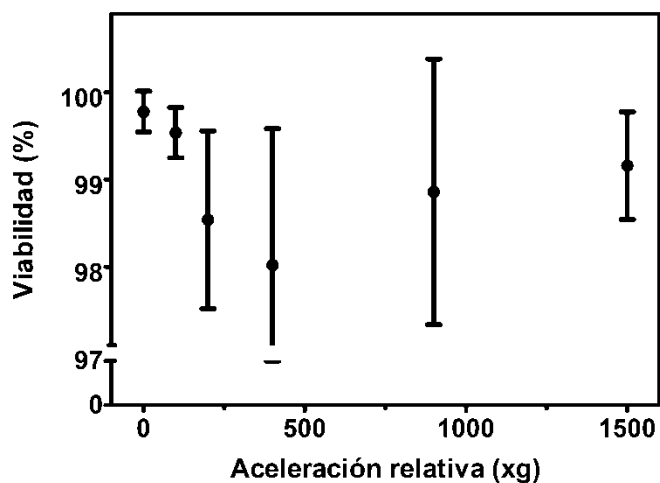
En glóbulos rojos sometidos a centrifugación, la viabilidad promedio también estuvo por encima de 98% sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la aceleración relativa (Ilustración 3). Los valores de aceleración gravitacional y tiempo de centrifugación aquí utilizados fueron similares a los empleados para la obtención de concentrados de glóbulos rojos a escala de banco de sangre (American Association of Blood Banks, 2012), condiciones en las cuales se ha establecido como parámetro de calidad, una hemólisis promedio inferior a 1,0% (Sowemimo-Coker, 2002). Aunque para células sometidas a aceleraciones de 200 g y superiores, la hemólisis promedio estuvo entre 98 y 99%, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a las células no centrifugadas.

Ilustración 2. Viabilidad celular en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a diferentes tasas de flujo a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.



Los resultados se muestran como media y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes.

Ilustración 3. Viabilidad celular en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a centrifugación bajo diferentes aceleraciones.



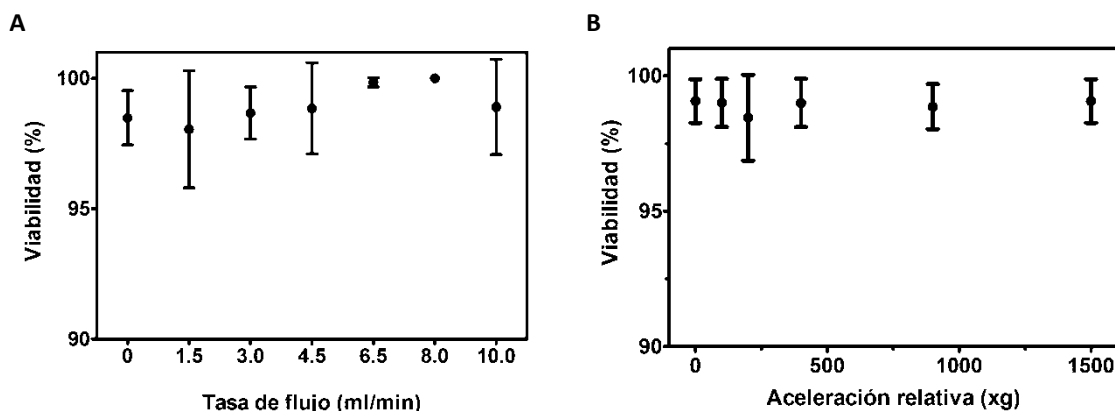
Los resultados se muestran como media y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes.

3.3.2 Macrófagos

La viabilidad promedio de macrófagos, medida mediante actividad de LDH en el sobrenadante fue $99,8 \pm 0,3$ en la fracción de entrada y se mantuvo por encima de 98% tras la separación hidrodinámica SPLITT sin diferencias significativas entre las diferentes tasas de flujo evaluadas. Después de centrifugación se observó también mantenimiento de la viabilidad sin diferencias de acuerdo con la aceleración relativa empleada (Ilustración 4).

En un estudio previo utilizando SPLITT para separar macrófagos de ratón de la línea celular J774.A1 se informaron viabilidades celulares por encima de 90%, medidas con técnica de exclusión de colorante (yoduro de propidio) y análisis mediante microscopía de fluorescencia, habiendo empleado tasas de flujo de 1-2,5 ml/min y medio de cultivo RPMI como fluído vector (Hoyos et al., 2009). Las diferencias observadas en viabilidad con respecto a los datos del presente estudio pueden explicarse por las técnicas utilizadas para evaluar la viabilidad. Aquí se empleó determinación de LDH en el sobrenadante, habiendo tenido la precaución de que los macrófagos hubieran sido lavados y resuspendidos en medio de cultivo sin suero, 12 horas antes de los ensayos de separación, con el fin de evitar errores de medición dados por actividad de esta enzima en el suero.

Ilustración 4. Viabilidad celular en macrófagos de ratón J774.A2 antes y después de ser expuestos a dos técnicas de separación.



A) Separación hidrodinámica SPLITT.

B) Centrifugación. Los resultados se muestran como medias y las barras de error corresponden a intervalos de confianza al 95%, a partir de 10 ensayos independientes.

Por otro lado, el hecho que la viabilidad celular observada después de centrifugación haya sido similar a la observada después de separación SPLITT sugiere que estos macrófagos no son susceptibles de daño lítico al menos dentro del rango de flujos de 1-10 ml/min en SPLITT y de 1-1500 g durante 10 minutos en centrifugación.

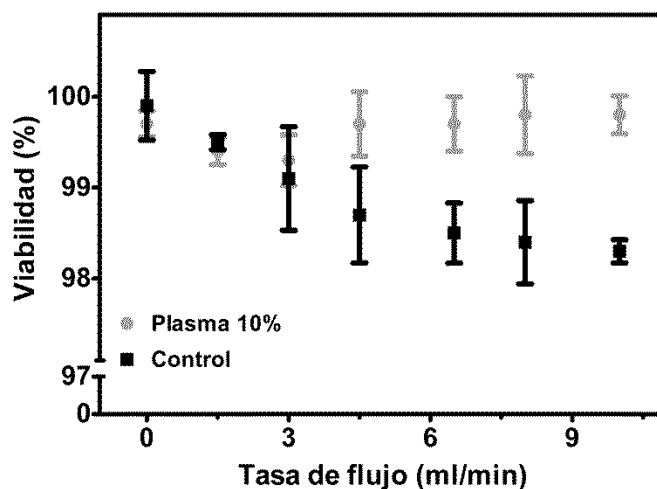
3.3.3 Efecto protector del plasma autólogo

Si bien la viabilidad celular de glóbulos rojos sometidos a SPLITT se conservó, con flujos de 4,5 ml/min y superiores, la viabilidad fue significativamente inferior con respecto a la fracción de entrada ($99,1 \pm 0,9$ vs $98,3 \pm 0,2$; $p=0,002$). Dado que se ha informado que en algunas condiciones de estrés mecánico el plasma protege a los glóbulos rojos disminuyendo su hemólisis, se realizaron ensayos en presencia de plasma autólogo a 10% para determinar su efecto sobre la viabilidad de eritrocitos sometidos a separación SPLITT. Se observó que las células suplementadas con plasma presentan viabilidades significativamente superiores con respecto a las células control no suplementadas (Ilustración 5).

Los mecanismos de protección del plasma frente al estrés mecánico son múltiples. Se ha descrito disminución del esfuerzo cortante y la turbulencia (Hülscher et al., 1990), en algunos casos explicada por aumento de la viscosidad del medio (Croughan et al., 1989; McQueen and Bailey, 1989). Sin embargo, en este caso la viscosidad no parece explicar el efecto protector. La viscosidad de la solución salina isotónica fue 1,003 Pa·s mientras que la de la solución salina suplementada con plasma al 10% fue 1,006 Pa·s y ambas soluciones tuvieron un comportamiento Newtoniano;

estas diferencias en los valores medidos pueden considerarse dentro del intervalo de error analítico.

Ilustración 5. Efecto de la suplementación con plasma autólogo sobre la viabilidad de glóbulos rojos sometidos a flujo a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.



Los resultados se muestran como medias y las barras de error corresponden a intervalos de confianza al 95%, a partir de 10 ensayos independientes.

Por otra parte, se ha informado que algunos dispositivos de separación campo-flujo ocurre interacción entre glóbulos rojos y paredes del dispositivo por interacciones entre las proteínas de membrana y el polímero empleado para la fabricación del canal (Chianéa et al., 1999). Algunos componentes del plasma, como albúmina o fibrinógeno pueden interactuar con las paredes del canal, limitando así la unión de las células y disminuyendo su cizallamiento en las paredes (Hochmuth et al., 1972). Otro mecanismo de protección involucra la transferencia de colesterol desde lipoproteínas plasmáticas hacia la membrana celular disminuyendo su fluidez y sensibilidad al esfuerzo cortante (Ramirez and Mutharasan, 1992).

En resumen, en las condiciones de operación utilizadas en la separación SPLITT se conserva la viabilidad celular en valores apropiados para pensar en que pueden evaluarse otros efectos de la separación diferentes a la muerte celular (efectos sub-letales), por ejemplo la morfología. Sin embargo, bajo el supuesto que tanto los efectos letales como sub-letales son producidos por el estrés mecánico de la separación, y teniendo en cuenta que la presencia de plasma muestra un efecto protector contra la lisis, se decidió tener también en cuenta la adición de plasma en los ensayos de evaluación del efecto de la separación SPLITT sobre la morfología celular.

3.4 Conclusiones

- Suspendidos en solución electrolítica isotónica con pH ajustado a 7,40 y sometidos a separación hidrodinámica SPLITT con flujos entre 1,5 y 10 ml/min, los glóbulos rojos mantienen una viabilidad celular superior a 98%.
- En la misma solución, los glóbulos rojos sometidos a centrifugación con aceleraciones relativas entre 100 y 1500 *g* durante 10 minutos, mantienen su viabilidad en valores similares a los observados después de separación SPLITT.
- Después de separación SPLITT se observó que con flujo de 4,5 ml/min y superior la viabilidad de glóbulos rojos es menor que en las células control. Este fenómeno fue inhibido en presencia de plasma autólogo.
- Suspendidos en solución electrolítica isotónica, los macrófagos de ratón de la línea J774.A2 mantienen su viabilidad por encima de 98% después de separación SPLITT y después de centrifugación.

4. Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en cambios morfológicos atribuibles a estrés mecánico

4.1 Introducción

Además de la muerte celular, el estrés mecánico puede inducir otros cambios celulares, denominados sub-letales. Aunque ha sido previamente documentado que diferentes dispositivos biomédicos y bioreactores producen cambios morfológicos en glóbulos rojos que son atribuibles a fuerzas hidrodinámicas (Bluestein and Mockros, 1969; Zhang et al., 1995; 1988; Sakota et al., 2009, 2008), el impacto de las técnicas de separación hidrodinámica SPLITT sobre la forma celular no ha sido determinado, en parte porque se ha asumido que las tasas de flujo bajas y el campos de fuerza que se utilizan no generan daño celular significativo (Benincasa et al., 2005; Hoyos, 2003).

La forma normal de glóbulos rojos es discoide, con exceso de área de superficie con respecto al volumen celular. Estas características contribuyen a su función y a la estabilidad mecánica de los eritrocitos, que cuando experimentan deformación por altas velocidades de flujo o por el paso a través de capilares sanguíneos de diámetro reducido, adoptan forma de paracaídas y luego retornan a su forma natural de disco sin experimentar hemólisis. Bajo las condiciones de flujo turbulento impuestas por bombas de circulación extracorpórea y válvulas cardíacas protésicas, los eritrocitos experimentan cambios morfológicos consistentes en la formación de prolongaciones de la membrana que los hacen ver como células espiculadas, conocidas como equinocitos (Black and Jones, 1976). Cuanto mayores son velocidad y turbulencia, mayor proporción de células se convierten en equinocitos y a su vez con más número de espículas por eritrocito; esta respuesta de cambio de forma ante estrés mecánico puede ser cuantificada mediante el uso de indicadores como el índice morfológico (Black and Jones, 1976). Los equinocitos son células que además aparecen deshidratadas (crenadas) y son menos deformables, por lo que al ser transfundidas exhiben propiedades reológicas y hemodinámicas alteradas siendo más viscosas, interactuando más con el endotelio vascular lo que resulta en flujo sanguíneo lento; además son más susceptibles de experimentar hemólisis (Reinhart and Chien, 1986). Por su parte, células adherentes como los macrófagos adquieren forma casi esférica cuando son puestas en suspensión y se desconoce si en estas condiciones exhiben cambios morfológicos tras la exposición a estrés mecánico. El objetivo del siguiente grupo de experimentos fue determinar el efecto de dos técnicas de separación celular (SPLITT y centrifugación) sobre la morfología celular respondiendo así a los objetivos de este trabajo asociados con forma.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Glóbulos rojos

La obtención y preparación de las muestras de sangre periférica, así como los procedimientos de separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación como los descritos previamente en las secciones 3.2.1 a 3.2.4. Inmediatamente después de la separación SPLITT, las fracciones de salida fueron transferidas a placas de cultivo de 24 pozos, con el fin de realizar la evaluación de la forma celular mediante microscopía de luz. Se emplearon como controles negativos, remanentes de la suspensión celular de la fracción de entrada, los cuales habían sido sometidos a la misma manipulación y tiempos de procesamiento que las fracciones de salida, excepto por no haber sido sometidos a separación SPLITT. Teniendo en cuenta los resultados del capítulo 3 en relación con el efecto del plasma sobre la viabilidad de eritrocitos expuestos a separación SPLITT, se realizaron también algunos experimentos utilizando solución salina suplementada con plasma autólogo al 10%, como fluido para diluir la muestra y como líquido transportador.

Para evaluar el efecto de la centrifugación sobre la morfología de glóbulos rojos, se emplearon las mismas aceleraciones centrífugas utilizadas en los ensayos de viabilidad: 100, 200, 400, 900 y 1500 *g* durante 10 minutos. Inmediatamente después de la centrifugación, el *pellet* fue resuspendido suavemente en el mismo tubo de centrifugación y fue luego transferido a placas de 24 pozos para la valoración de morfología mediante microscopía de luz.

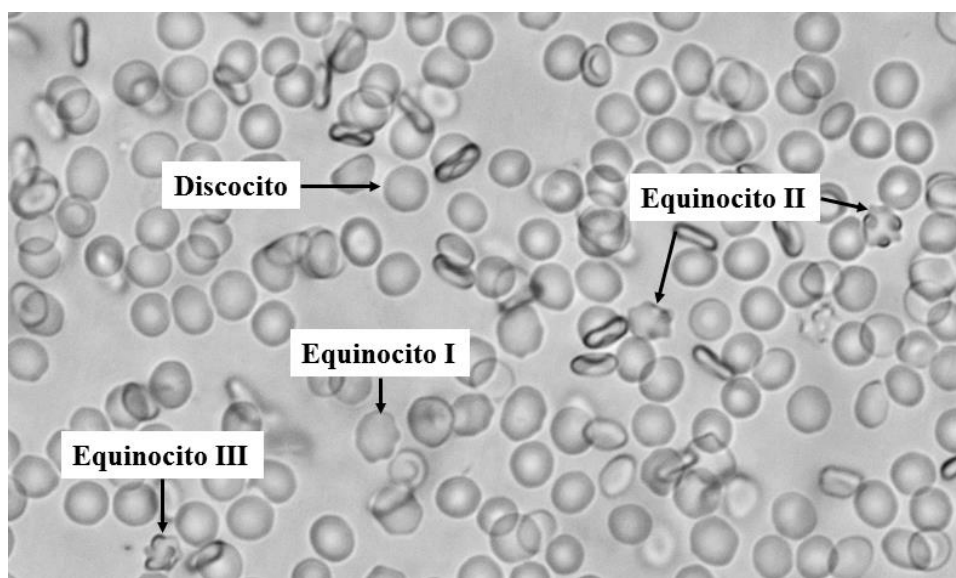
Morfología celular

Las muestras y los controles de la separación hidrodinámica SPLITT y de la centrifugación fueron transferidos a placas de 24 pozos para obtener microfotografías con un microscopio de luz invertido (objetivo 40X) y un sistema de adquisición de imágenes (Axio Cam, Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen, Germany). Las imágenes así obtenidas fueron almacenadas en formato .zvi y subsecuentemente analizadas para determinar la forma de 100 células por cada tratamiento (a partir de 14 experimentos independientes) (AxioVision SE64 Rel 4.8, Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen, Germany). La intensidad de la transformación discocito-equinocito se determinó mediante el índice morfológico, un indicador que pondera la intensidad del cambio morfológico mediante la clasificación de los equinocitos en tipos I al III, de acuerdo con el número de espículas por células (Ilustración 6), aplicando la siguiente fórmula (Black and Jones, 1976):

$$\text{INDICE MORFOLOGICO} = [1 \times \text{equinocitos I}] + [2 \times \text{equinocitos II}] + [3 \times \text{equinocitos III}] \quad (12)$$

El índice morfológico en una muestra puede tener valores entre 0 y 300, el primero si la totalidad de los glóbulos rojos son discocitos y el segundo si todos son equinocitos tipo III.

Ilustración 6. Clasificación de la morfología de glóbulos rojos.



Preparación húmeda en NaCl 154 mM (pH 7,40; 290 mOsm/l), obtenida con un objetivo 40X.

Geometría celular

Algunas respuestas celulares al estrés mecánico dependen de la deformación de la membrana, y éstas pueden ser así mismo desencadenadas por el estrés osmótico que también deforma la membrana celular, generándose en ambos casos cambios regulatorios para disminuir el volumen (Hoffmann et al., 2009). Por lo anterior, se decidió estudiar el comportamiento del volumen celular después de la exposición a la separación (SPLITT y centrifugación).

El hematocrito y el recuento eritrocitario se determinaron mediante citometría de impedancia haciendo uso de un analizador hematológico (Sysmex 14N, Sysmex Corp, USA). El volumen corpuscular medio (VCM) se calculó a partir del hematocrito y el recuento eritrocitario ($VCM = \text{hematocrito} / \text{recuento} * 10$). Después de ser manipuladas a través de la celda SPLITT y de centrifugación, las suspensiones de glóbulos rojos no exhibieron cambios en el VCM, a pesar de que al ser examinadas bajo microscopio se observaban significativamente disminuidas de tamaño. Lo anterior, llevo a concluir que el VCM, en nuestras condiciones experimentales no era un indicador confiable de volumen celular.

Por otra parte, el volumen celular se evaluó también empujando un contador de partículas (Coulter® Z2, Beckman Coulter, USA), basado en citometría de impedancia, en el cual las células se hacen pasar a través de un circuito DC, diluidas en un líquido conductor. Cada vez que una célula pasa, se genera un cambio de voltaje toda vez que ésta se comporta como un resistor. La amplitud del cambio de voltaje es proporcional al volumen celular (Graham, 2003). Los ensayos preliminares empleando este analizador de partículas, que funciona con base en este método, mostró que después de la separación aumentaba el volumen celular, a pesar de que al microscopio las células tenían menor diámetro, por lo que esas mediciones no se consideraron confiables. Es conocido que en este método, la amplitud del cambio de voltaje depende no solamente del volumen celular sino también de la conductividad de la célula (Beckman Coulter: Technical Application Information). Teniendo en cuenta que previamente se ha informado que después del uso de algunas técnicas de separación celular se produce hiperpolarización de la membrana (Seidl et al., 1999), es decir que se altera la conductancia de la misma, es esperable que la medición del volumen celular utilizando únicamente impedanciometría no sea confiable. De hecho, se ha desarrollado un método para corrección por conductividad (opacidad) que se denomina tecnología Coulter® 3D VCS (volumen, conductividad, *scatter*), en la cual se utilizan métodos ópticos para ajustar los valores de volumen (Beckman Coulter: Technical Application Information). El analizador de partículas utilizado en estos ensayos (Beckman Coulter Z1, Beckman Coulter Inc, USA) no cuenta con este tipo de tecnología, por lo tanto en nuestras condiciones experimentales las mediciones de volumen con base en impedanciometría no son confiables.

De acuerdo con lo anterior, un tercer método fue utilizado para determinar el volumen celular: la medición del diámetro a partir de registros fotográficos y la utilización de ecuaciones para calcular el volumen celular utilizando modelos desarrollados a partir de glóbulos rojos normales con forma de disco (Canham and Burton, 1968). Al comienzo de cada experimento, una fotografía de líneas micrométricas calibradas se utilizó para determinar el factor de conversión $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Utilizando el objetivo seco 40X, se seleccionó una porción de la imagen en la cual no hubieran eritrocitos superpuestos, y se contaron 10 campos empleando el método zig-zag hasta completar la medición de 100 células por experimento. En estos ensayos de medición de diámetro celular se consideró como unidad de análisis a las células, por este motivo, como se seleccionaron 100 células por experimentos a partir de 14 experimentos independientes, se consideró un tamaño muestral de $100 \times 14 = 1400$ células por cada tratamiento.

Los valores de diámetro, se utilizaron para calcular volumen (V) e índice de esfericidad, utilizando las fórmulas propuestas por Canham y Burton para glóbulos rojos humanos normales con forma de disco (Canham and Burton, 1968):

$$V = 29,7 D - 134,6 \quad (13)$$

$$\text{INDICE DE ESFERICIDAD} = 4,84 \times \frac{V^{2/3}}{A} \quad (14)$$

4.2.2 Macrófagos de ratón J774.A2

Los macrófagos cultivados en suspensión por 12 horas, aquellos diluidos en solución electrolítica y los que eran obtenidos en las fracciones de salida después de separación hidrodinámica y centrifugación, conservaron su forma esférica, sin cambios aparentes en las prolongaciones de membrana. Por lo anterior, y debido a que los inconvenientes anteriormente descritos en las mediciones de volumen mediante impedanciometría con glóbulos rojos también los observamos con macrófagos, el análisis morfológico de macrófagos se basó únicamente en las mediciones de diámetro mediante microscopía de luz (Ilustración 7).

El cultivo de macrófagos, su disociación mecánica, la solución empleada para diluirlos y como los procedimientos de separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación fueron similares a los descritos previamente en las secciones 3.2.1 a 3.2.4. Inmediatamente después de la separación SPLITT, las fracciones de salida fueron transferidas a placas de cultivo de 24 pozos, con el fin de realizar su evaluación mediante microscopía de luz. Se emplearon como controles negativos de la separación SPLITT, remanentes de la suspensión celular de la fracción de entrada, los cuales habían sido sometidos a la misma manipulación y tiempos de procesamiento que las fracciones de salida, excepto por no haber sido sometidos a separación SPLITT. Se utilizaron como controles negativos del proceso de dilución de las muestras para preparar las fracciones de entrada, macrófagos mantenidos en cultivo en suspensión por 12 horas en RPMI con suero fetal bovino al 10%.

Para evaluar el efecto de la centrifugación sobre la morfología de macrófagos, se emplearon las mismas aceleraciones centrífugas utilizadas en los ensayos de viabilidad: 100, 200, 400, 900 y 1500 *g* durante 10 minutos. Inmediatamente después de la centrifugación, el *pellet* fue resuspendido suavemente en el mismo tubo de centrifugación y fue luego transferido a placas de 24 pozos para la valoración de morfología mediante microscopía de luz. Se utilizaron como controles negativos, remanentes de la suspensión celular no centrifugada y macrófagos en cultivo en suspensión (12 horas después de su disociación mecánica, en RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10%).

Geometría celular

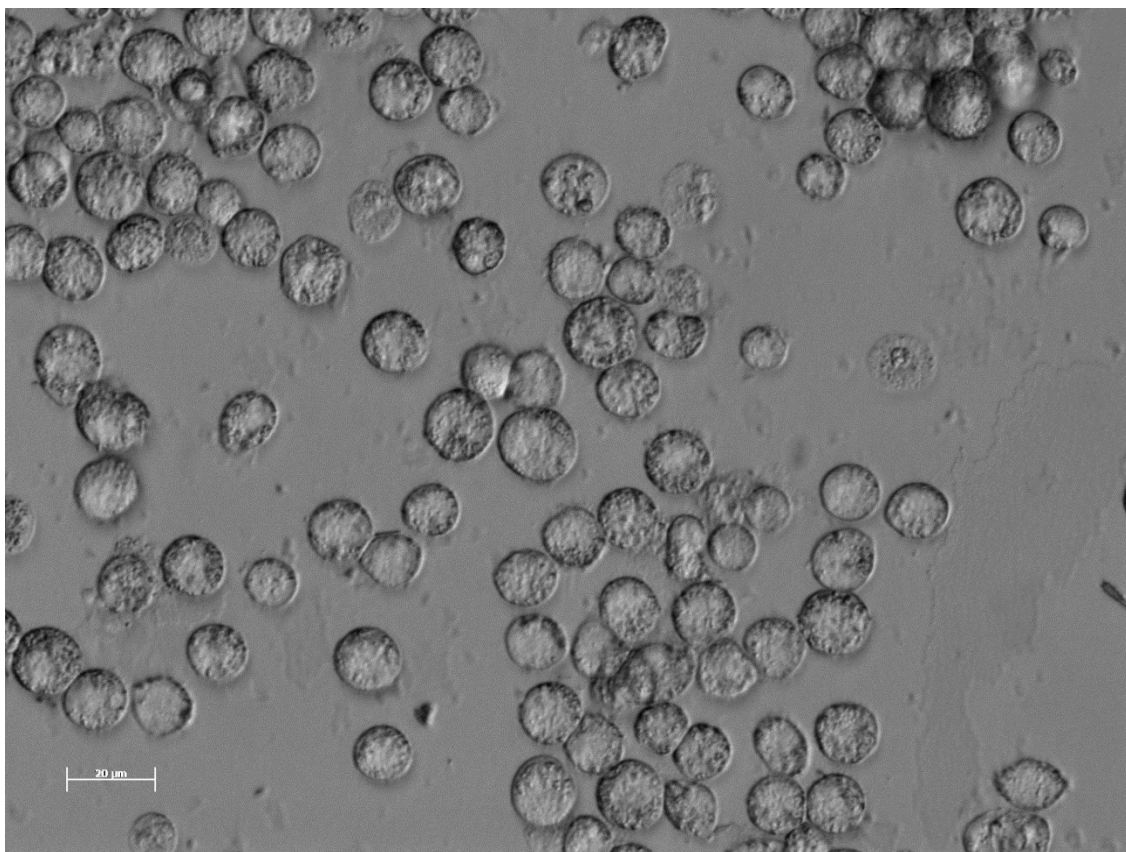
Las muestras y los controles de la separación hidrodinámica SPLITT y de la centrifugación fueron transferidos a placas de 24 pozos para obtener microfotografías con un microscopio de luz invertido (objetivo 40X) y un sistema de adquisición de imágenes (Axio Cam, Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen, Germany). Las imágenes así obtenidas fueron almacenadas en formato .zvi y subsecuentemente analizadas para medir el diámetro en 100 células por cada tratamiento, a partir de 14 experimentos independientes, para un tamaño muestral total de 1400 células por tratamiento (AxioVision SE64 Rel 4.8, Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen, Germany).

Al comienzo de cada experimento, una fotografía de líneas micrométricas calibradas se utilizó para determinar el factor de conversión $\mu\text{m}/\text{pixel}$. A partir de las microfotografías almacenadas de cada

ensayo, se midió el diámetro celular (D). Los valores de radio ($r = D/2$), se utilizaron para calcular volumen (V), asumiendo una forma esférica (Ilustración 8), mediante las siguientes fórmulas:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (15)$$

Ilustración 7. Macrófagos de ratón J774.A2 cultivados en suspensión.



Las células fueron cultivadas en suspensión durante 12 horas en RPMI 1640 y suero fetal bovino (10% v/v). Preparación húmeda, imagen obtenida con un objetivo 40X.

4.2.3 Fuerzas hidrodinámicas

De acuerdo con los resultados del capítulo 3, se determinó la necesidad de realizar un análisis de las fuerzas hidrodinámicas impuestas por los dos métodos de separación, con el fin de evaluar su potencial relación con el daño celular letal y sub-letal.

Las fuerzas hidrodinámicas pueden ser de dos tipos: esfuerzo cortante (*shear stress*) y normal. Ambos se definen como el producto de la viscosidad por el gradiente de velocidad. Sin embargo, en el caso del esfuerzo cortante la dirección del gradiente es perpendicular al flujo (du_x/dy), mientras que en el normal es paralela (du_x/dx) (Hu et al., 2011). En algunos casos, el esfuerzo cortante puede descomponerse en dos partes, una de las cuales es el estrés elongacional. Estas fuerzas pueden deformar la membrana celular y dependiendo de su magnitud y el tiempo de exposición, generar daño celular (Leverett et al., 1972). De acuerdo con las ecuaciones (7) y (8) el máximo esfuerzo cortante, experimentado por las células en contacto con la pared es directamente proporcional a la velocidad del fluido. Adicionalmente, la tasa de disipación de energía es un escalar que cuantifica tanto el esfuerzo cortante como el normal, siendo este último incluso más lesivo para las células en suspensión (ecuaciones 9; 10 y 11) (García-Briones and Chalmers, 1994). Por lo anterior, para analizar la relación entre la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas y el daño celular se determinó el esfuerzo cortante, tasa de disipación de energía y tiempo de exposición, para la separación SPLITT y centrifugación mediante el uso de simulaciones de dinámica de fluidos, con el paquete computacional ANSYS v14.0, módulo FLUENT (ANSYS Inc., Canonsburg, PA, USA). Los diseños del interior del canal de separación SPLITT y del tubo usado en la centrifugación se elaboraron con el paquete Solid Works Standard (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Concord, MA, USA) y fueron exportados en formato .igs.

El canal SPLITT completo fue modelado con una optimización de malla con un tamaño de celda de 7 μm en las entradas y las salidas. Para el tubo de centrifuga, el tamaño de celda fue 9 μm en el fondo del tubo; para propósitos de comparación, el diámetro de un glóbulo rojo es $8,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Para las simulaciones en FLUENT, se utilizó un método segregado basado en presión y un modelo de fase discreta, para el cual se emplearon valores de densidad de 1100 kg/m^3 para glóbulos rojos (Urbina, A and Palomino F, 2008) y 1071 kg/m^3 para macrófagos (Navarrete, I et al., 2013) (determinadas con el uso de perlas marcadoras de densidad, Percoll® Density Marker Bead Kit, referencia DMB-10, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA); para macrófagos se asumió forma esférica y para glóbulos rojos forma discoide con índice de esfericidad 0,79 (Tabla 4).

No se impuso balance de energía toda vez que se asumieron condiciones isotérmicas y pérdidas por fricción insignificantes. Se empleó la formulación implícita para resolver las ecuaciones para la operación en estado estable, asumiendo flujo laminar y modelo fluido viscoso con presión absoluta de 74660 Pa en la salida (presión atmosférica promedio en el laboratorio). Las condiciones de frontera incluyeron no deslizamiento en las paredes y velocidad constante en las entradas del canal SPLITT. Los esquemas utilizados para la discretización espacial fueron: ajuste de segundo orden para momento, interpolación estándar de FLUENT para presión, celda basada en mínimos cuadrados para gradiente, esquema SIMPLE para acoplamiento presión-velocidad. El flujo a través del canal SPLITT se configuró con 2 entradas (entrada superior para la muestra y entrada inferior para fluido vector) y una salida (inferior) (Ilustración 1). Para las simulaciones del tubo de centrifuga, se estableció una presión absoluta de 74660 Pa y velocidad 0 m/s en el centro del menisco, y gravedad dirigida hacia el centro del tubo (Ilustración 8). Todas las simulaciones fueron

realizadas con una CPU Intel®CORE™i7 corriendo a 2,2 GHz, con 6,0 GB de RAM y 700 GB de disco duro.

Tabla 4: Características físicas y geométricas del canal de separación hidrodinámica SPLITT utilizadas para los cálculos de fuerzas hidrodinámicas.

Característica	Símbolo	Value		
Canal				
Profundidad	W	480 μm		
Longitud	L	186 mm		
Ancho	B	20 mm		
Conectores				
Diámetro hidráulico de la entrada	D_h	1,50 mm		
Diámetro hidráulico de la salida	D_h	0,76 mm		
Fluido				
Naturaleza química		NaCl 154 mM		
Temperatura de trabajo	ϕ	25°C		
Densidad (a 25°)	ρ	1007,1 kg/m ³		
Viscosidad (a 25°)	μ	0,0013 Pa·s		
Tasa de flujo, Q (ml · min ⁻¹)	Velocidad en zona de transporte (m · s ⁻¹)	Número Reynolds en zona de transporte	Velocidad promedio en conector de salida (m · s ⁻¹)	Número Reynolds en conector de salida
1,5	0,00011	15,4	0,014	16,4
3	0,00021	30,7	0,028	32,9
4,5	0,00032	46,1	0,042	49,3
6,5	0,00046	66,6	0,061	71,2
8	0,00057	82,0	0,075	87,7
10	0,00071	102,5	0,094	109,6

En la ilustración 8 se muestra el efecto del campo de gravedad terrestre y fuerza centrífuga (g y $r\omega^2$, respectivamente) sobre el tubo de centrífuga. El vector resultante $g_{\text{centrífuga}}$ corresponde a la aceleración neta que actúa sobre el tubo. Para las simulaciones, el plano cartesiano (x' , y') fue considerado. La aceleración relativa N generada por el rotor es definida por la relación entre $r\omega^2$ y g (ecuación 16):

$$N = \frac{r\omega^2}{g} \quad (16)$$

Los componentes del vector de aceleración centrífuga $g_{centrifuga}$ en el plano (x', y') se muestran en la ecuación (17):

$$g_{centrifuga} = \frac{\sqrt{2}}{2} (g(N - 1); -g(N + 1)) \quad (17)$$

Los valores de aceleración centrífuga utilizados para las simulaciones se presentan en la Tabla 5. En la convergencia en FLUENT, los residuos fueron 1×10^{-7} . Se implementó una función de “*execute on demand*” definida por el usuario, la cual calculó la tasa de disipación de energía (EDR) usando la siguiente ecuación (ecuación 10) [18]:

$$\epsilon = \tau : \nabla U = \mu [\nabla U + (\nabla U)^T] : \nabla U = \mu \sum_i \sum_j [\nabla U + (\nabla U)^T]_{ij} \nabla U_{ji} \quad (10)$$

donde μ es la viscosidad del fluido, ∇U es el tensor del gradiente de velocidad, y $(\nabla U)^T$ es el transpuesto de ∇U . EDR es la medida de la tasa a la cual la energía es transferida al líquido, energía que en últimas se transforma en calor o es absorbida por las partículas suspendidas en el fluido. EDR tiene unidades de densidad de energía por unidad de tiempo por unidad de volumen (i.e., $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-3}$), o de poder por unidad de volumen (i.e., $W \cdot m^{-3}$).

Ilustración 8. Configuración geométrica del tubo de centrífuga.

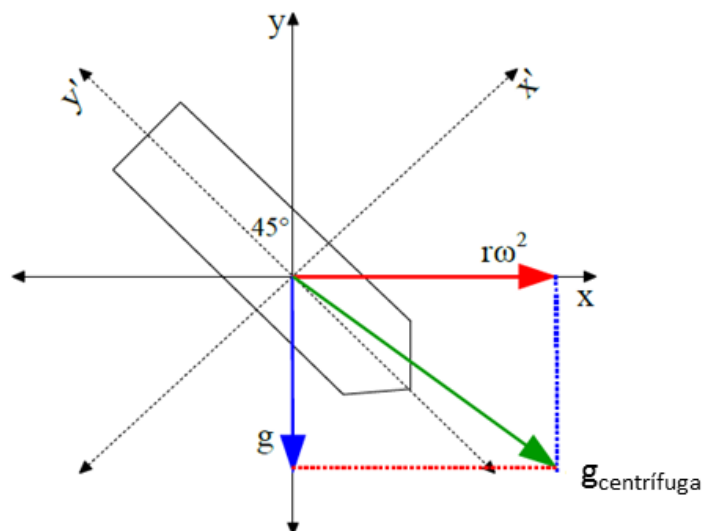


Tabla 5: Parámetros físicos empleados para calcular la tasa de disipación de energía en el tubo de centrífuga.

Aceleración relativa N (g)	$g_{centrífuga}$ (m/s ²)	
	x'	y'
100	686,03	-699,89
200	1379,00	-1392,86
400	2764,93	-2778,79
900	6229,75	-6243,61
1500	10387,54	-10401,40

4.2.4 Análisis estadístico

En el texto, los resultados se presentan como media \pm 1 desviación estándar. Para facilitar la apreciación visual de la significancia estadística de las diferencias observadas, en todas las ilustraciones, las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%; una diferencia es estadísticamente significativa cuando los intervalos de confianza no se superponen.

La distribución de los datos se evaluó mediante prueba de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov, de acuerdo con el tamaño de la muestra. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza para mediciones repetidas o prueba de Friedman con análisis *post hoc* con prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Para realizar comparaciones entre grupos de acuerdo con la tasa de flujo y con la presencia de plasma se utilizó análisis de varianza de dos vías con análisis *post hoc* de Bonferroni. Se realizaron análisis de correlación bivariada de Spearman entre indicadores de estrés mecánico y parámetros de daño celular (letal y sub-letal). Se estableció un nivel de significancia en un valor $p < 0,05$ e intervalo de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e IBM® SPSS v 20.0 (IBM Inc., New York, NY, USA).

4.2.5 Consideraciones éticas

Durante la realización de este estudio se cumplieron las normas para investigación con seres humanos y para la manipulación de muestras de origen biológico (resolución 8430 de 1993, República de Colombia; Declaración de Helsinki) y se recibió la aprobación del comité de ética institucional (Centro Internacional de Física y Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Glóbulos rojos

Morfología celular (transformación discocito-equinocito)

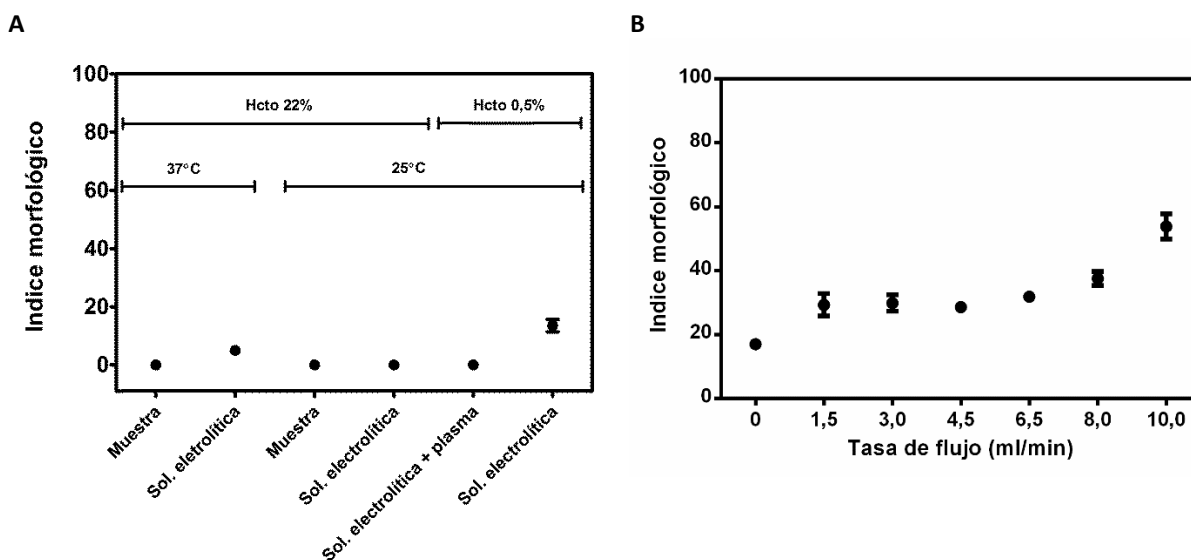
Teniendo en cuenta que la temperatura y la presencia de plasma pueden ser factores que determinen la formación de equinocitos (Brecher and Bessis, 1972), se realizaron primero ensayos para determinar el efecto de la temperatura y la dilución de la muestra (hematocrito final), asumiendo esta última como indicador de la concentración final de plasma.

El proceso dilución de la muestra en solución electrolítica hasta un hematocrito final de 0,5% resultó en formación significativa de equinocitos ($p=0,0001$) (Ilustración 9A); fenómeno que fue

inhibido por la suplementación con plasma al 10%. De acuerdo con esto, para poder analizar el efecto de la separación, se calculó un índice morfológico corregido mediante la sustracción del valor observado en la fracción de entrada, para poder expresar únicamente el incremento observado después de la separación.

Después de la separación SPLITT con flujo entre 1,5 y 6,5 ml/min se observó incremento significativo de la formación de equinocitos con respecto a la fracción de entrada. Por encima de este rango de flujo, el aumento del índice morfológico fue progresivo, con valores significativamente mayores para flujos de 8 ml/min en comparación con tasa de flujo menores, y con valores aún más elevados para flujos de 10 ml/min con respecto a 8 ($p=0,00001$) (Ilustración 9B). El comportamiento observado sugiere que con flujos entre 1,5 y 6,5 ml/min la relación es de pendiente constante (orden 0) mientras que por encima de 8 ml/min la pendiente incrementa (orden 1), lo que hace pensar que puede tratarse de una relación exponencial, con un valor umbral por encima de 8 ml/min en el cual la formación de equinocitos es aún mayor.

Ilustración 9. Índice morfológico en glóbulos rojos después de haber sido manipulados a través de un canal de separación hidrodinámica SPLITT.



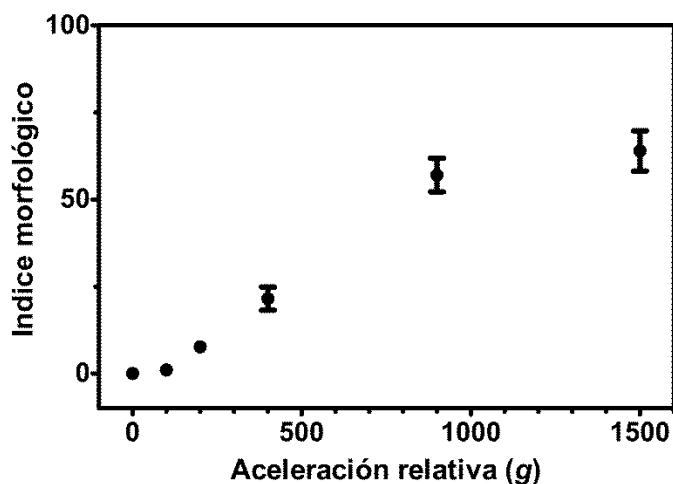
A) Efecto de la temperatura y la dilución sobre la formación de equinocitos. El aumento de equinocitos observado en muestras altamente diluidas se ve inhibido por la adición de plasma al 10%.

B) Índice morfológico después de la exposición al flujo a través del canal SPLITT; los resultados se expresan como diferencia entre cada tratamiento y la fracción de entrada. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes.

Aunque se han descrito valores críticos de estrés mecánico por encima de los cuales ocurre hemólisis significativa (Sallam and Hwang, 1984; Lu et al., 2001), tal fenómeno no había sido descrito para la transformación morfológica por trauma hidrodinámico. Estas formas anómalas, son más frágiles mecánicamente, más viscosas y menos deformables (Reinhart and Chien, 1986; Waugh et al., 1992), lo que afecta su efectividad terapéutica cuando son transfundidas a un receptor y exhiben mayor susceptibilidad a hemólisis en procesos corriente abajo.

Después de la centrifugación, el índice morfológico cuando se usó aceleración de 100 g fue similar al de células control, pero para aceleraciones entre 200 y 1500 g se observó incremento progresivo y significativo (Ilustración 10). Los resultados sugieren que en las condiciones de centrifugación utilizadas, existe un valor crítico por encima de 200 g más allá del cual la formación de equinocitos es proporcional al campo gravitacional utilizado.

Ilustración 10. Índice morfológico en glóbulos rojos antes y después de haber sido sometidos a centrifugación bajo diferentes aceleraciones.



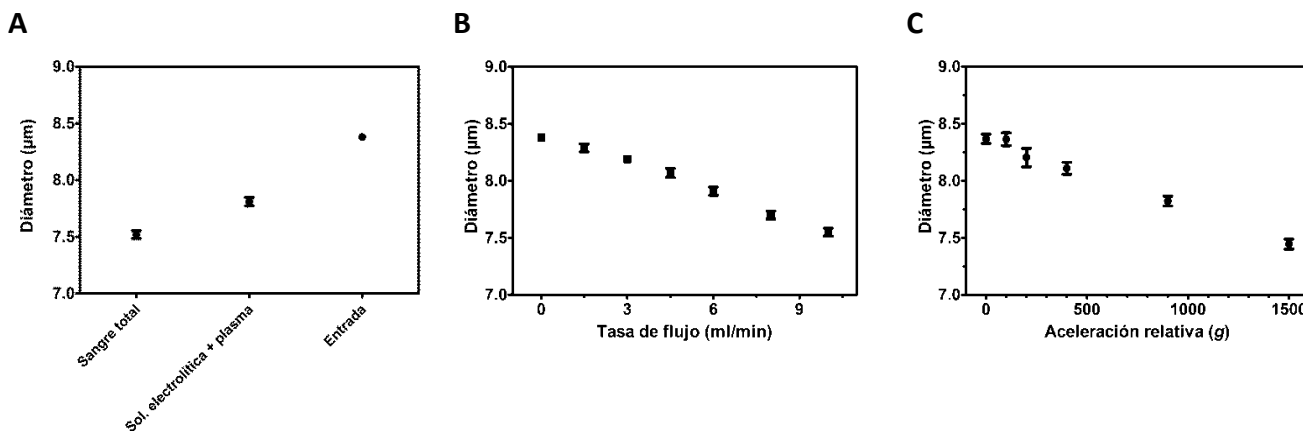
Los resultados se muestran como diferencia con respecto a células diluidas no centrifugadas. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes. Las diferencias entre 200, 400 y 900 g son significativas ($p=0,0001$), así como entre 900 y 1500 g ($p=0,01$).

Geometría celular

El diámetro celular medido por medio de microscopía de luz y análisis de imágenes fue $7,52 \pm 0,65 \mu\text{m}$ (media \pm SD) en muestras de sangre completa recién extraída. Las células suspendidas en salina suplementada con plasma (311 mOsm/l) tuvieron un diámetro de $8,10 \pm 0,70 \mu\text{m}$, mientras que las células suspendidas sólo en salina ($292 \pm 0,8$ mOsm/l) tuvieron un diámetro mayor ($8,44 \pm 0,63 \mu\text{m}$; $p=0,0001$). El aumento del diámetro celular de acuerdo con el medio de suspensión puede estar relacionado con su osmolaridad efectiva (Ilustración 11A).

Tanto la separación hidrodinámica SPLITT como la centrifugación resultaron en disminución significativa y progresiva del diámetro celular hasta $7,55 \pm 0,67 \mu\text{m}$ con flujos de 10 ml/min (Ilustración 11B) y $7,44 \pm 0,80 \mu\text{m}$ con 1500 g, con respecto a la fracción de entrada ($p=0,0001$) (Ilustración 11C). Un diámetro celular disminuido con respecto a la fracción de entrada es sugestivo de “encogimiento” celular (disminución del volumen) y se relaciona bien con los hallazgos previos de formación de equinocitos o células crenadas (Reinhart and Chien, 1986; Waugh et al., 1992). A continuación se analizarán los cambios observados en volumen celular e índice de esfericidad.

Ilustración 11. Diámetro de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación celular.

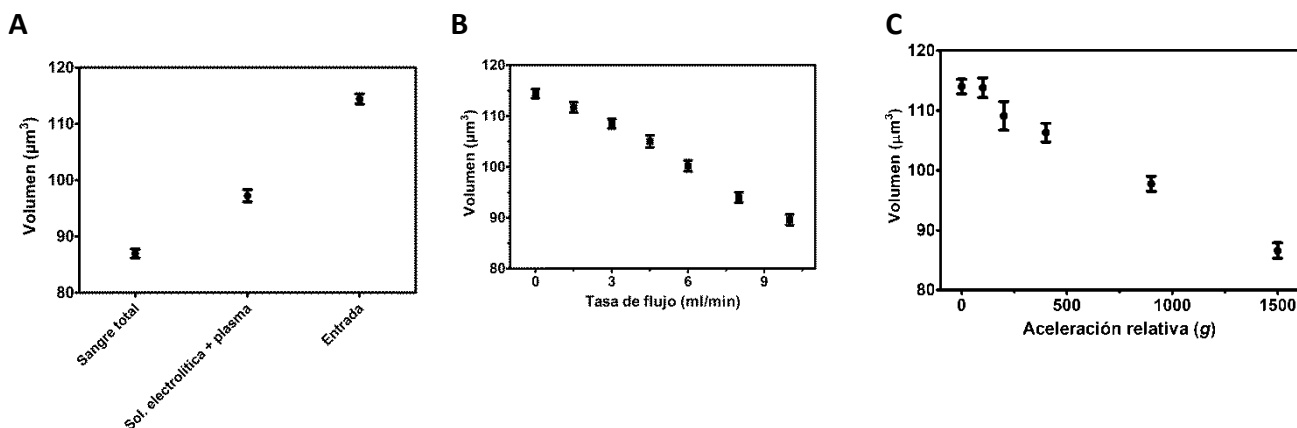


A) Efecto de la dilución y la presencia de plasma; cuando se indica se adicionó plasma autólogo al 10% (v/v).

B) Separación SPLITT.

C) Centrifugación. Los resultados se presentan como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes, $n=1400$ células.

Ilustración 12. Volumen de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación celular.

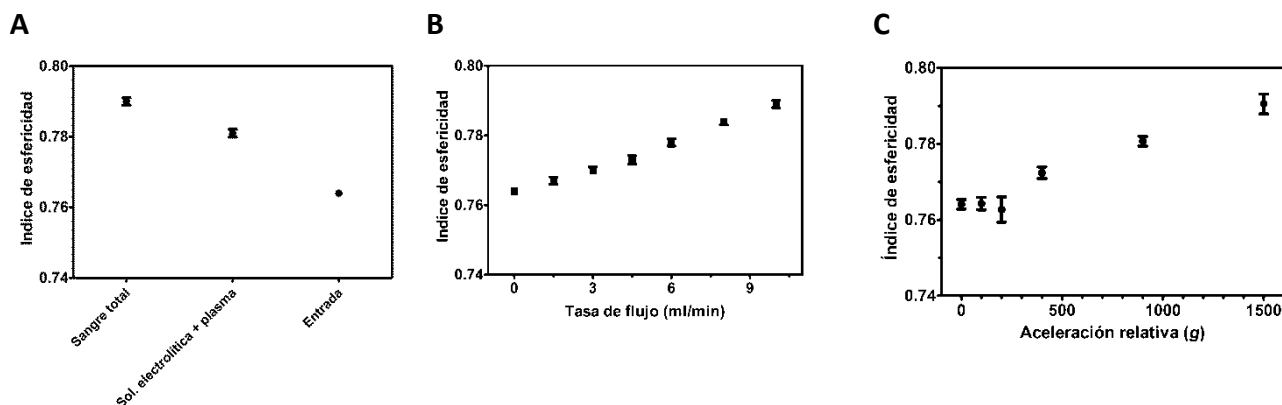


- A) Efecto de la dilución y la presencia de plasma; cuando se indica se adicionó plasma autólogo al 10% (v/v).
 B) Separación SPLITT.
 C) Centrifugación. Los resultados se presentan como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes, n=1400 células.

Se observaron cambios en el volumen celular promedio de acuerdo con el medio de dilución. En células control no diluidas (sangre completa) el volumen promedio fue $87,0 \pm 15,2 \mu\text{m}^3$; en glóbulos rojos diluidos en solución electrolítica suplementada con plasma $97,2 \pm 20,7 \mu\text{m}^3$; y en solución sin plasma $114,4 \pm 17,2 \mu\text{m}^3$ ($p=0,0001$) (Ilustración 12A). Teniendo en cuenta que la osmolaridad de la solución salina fue 292 mOsm/l y al suplementarla con plasma ésta se elevó a 311 mOsm/l, se puede concluir una disminución de 19 mOsm/l del medio resulta en aumento del volumen celular equivalente a 18%. Por su parte, tanto la separación SPLITT como la centrifugación resultaron en disminución del volumen celular (Ilustración 12B-C), lo que sugiere que alguna manera la separación celular activa mecanismos de transporte a través de la membrana que resultan en disminución neta del contenido intracelular de iones y agua.

Se observaron diferencias significativas en el índice de esfericidad, de acuerdo con la dilución y la presencia de plasma. En muestras de sangre completa fue $0,790 \pm 0,020$; en glóbulos rojos diluidos en solución electrolítica con plasma $0,781 \pm 0,02$; mientras que en células diluidas solución sin plasma $0,764 \pm 0,018$ ($p=0,0001$; ilustración 13A). Previamente se ha informado que las dimensiones y el índice de esfericidad de glóbulos rojos son afectados por la presencia de albúmina, la cual actúa como estabilizadora de la membrana eritrocitaria y de la forma de disco (Jay, 1975). Por otra parte, después de la separación celular SPLITT y de centrifugación se observó aumento significativo del índice de esfericidad (Ilustración 13B y C), con respecto a las fracciones de entrada no expuestas a separación, lo cual puede ser explicado por la formación de equinocitos, los cuales en estado avanzado (equinocitos III) exhiben pérdida de la forma de disco y adquieren forma esférica (Wong, 1999).

Ilustración 13. Índice de esfericidad de glóbulos rojos sometidos a dos técnicas de separación.



A) Efecto de la dilución y la presencia de plasma; cuando se indica se adició plasma autólogo al 10% (v/v).

B) Separación SPLITT.

C) Centrifugación. Los resultados se presentan como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes, n= 1400 células.

Fuerzas hidrodinámicas

En el canal de separación hidrodinámica SPLITT, operado con tasas de flujo entre 1,5 y 10,0 ml, las velocidades máximas alcanzadas estuvieron entre 0,055 y 0,367 m/s, respectivamente, y se observaron en el conector de la salida inferior toda vez que es el componente del canal con menor diámetro. En esa misma ubicación, el esfuerzo cortante en la pared fue de 0,71 a 4,77 N/m² (Ilustraciones 14 y 15). Durante la centrifugación entre 100 y 1500 g, la velocidad máxima alcanzada fue de 0,01 a 0,09 m/s y se observó justo antes de que las células alcanzaran el fondo del tubo, puesto que la velocidad de sedimentación es proporcional al radio de rotación (distancia entre el centro del rotor y la partícula). Por su parte, el esfuerzo cortante fue de $7,9 \times 10^{-8}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ N/m² (Ilustraciones 14) para aceleraciones equivalentes a 100 y 1500 g, respectivamente; los valores máximos se registraron en diferentes puntos del tubo describiendo colisiones de las partículas contra las paredes en su trayectoria hacia el fondo del mismo (Ilustración 16). Queda así en evidencia que el esfuerzo cortante generado en la separación SPLITT es varios órdenes de magnitud superior cuando se le compara con la centrifugación.

Ilustración 14. Fuerzas hidrodinámicas desarrolladas durante la separación hidrodinámica SPLITT (tasas de flujo 1,5-10,0 ml/min) y la centrifugación (100-1500 g).

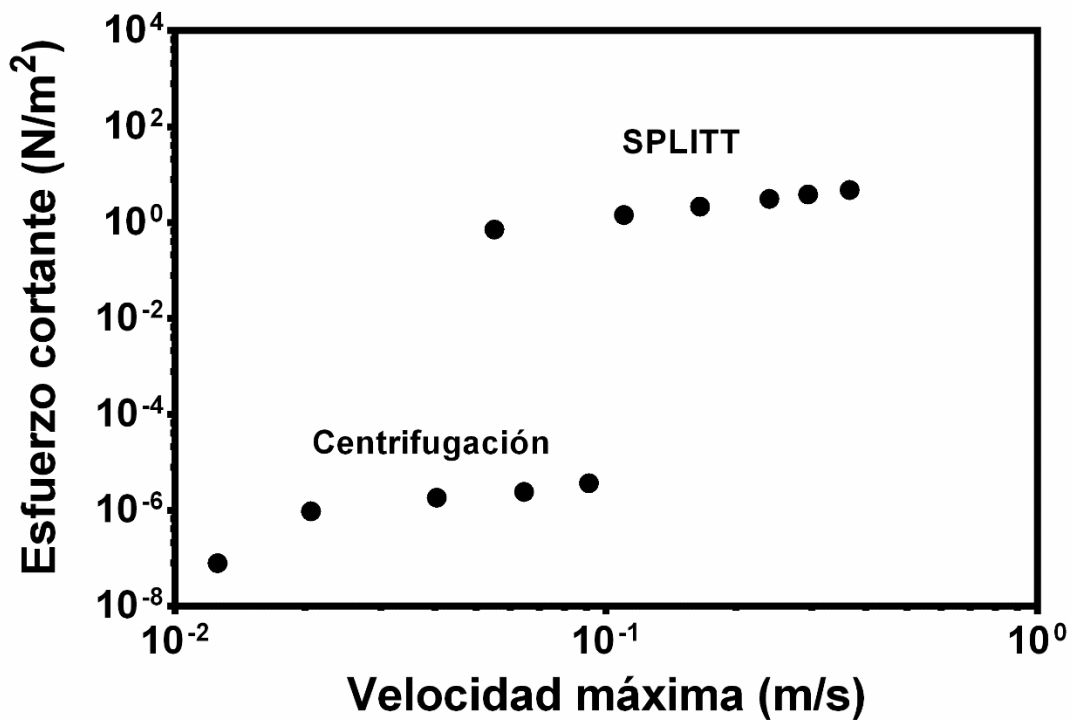
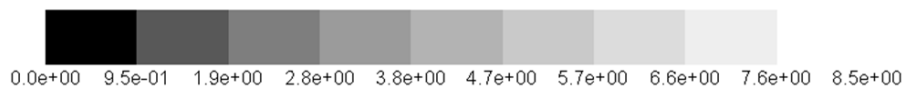
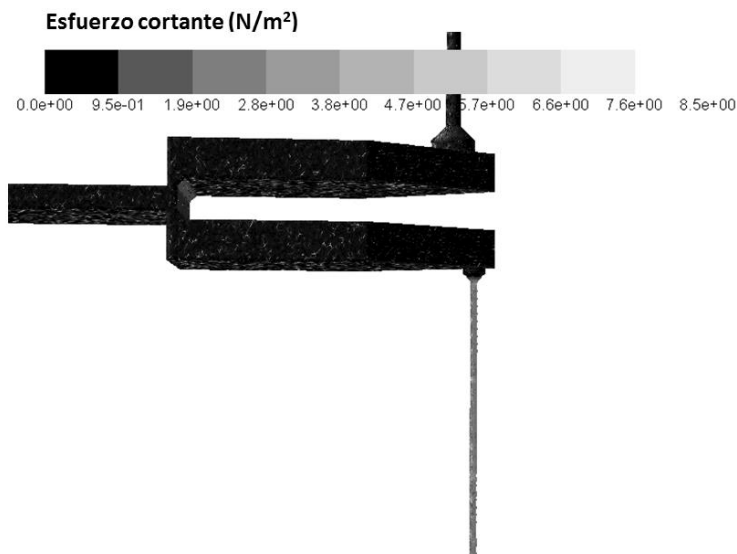


Ilustración 15. Esfuerzo cortante en el canal SPLITT.

A

Esfuerzo cortante (N/m²)

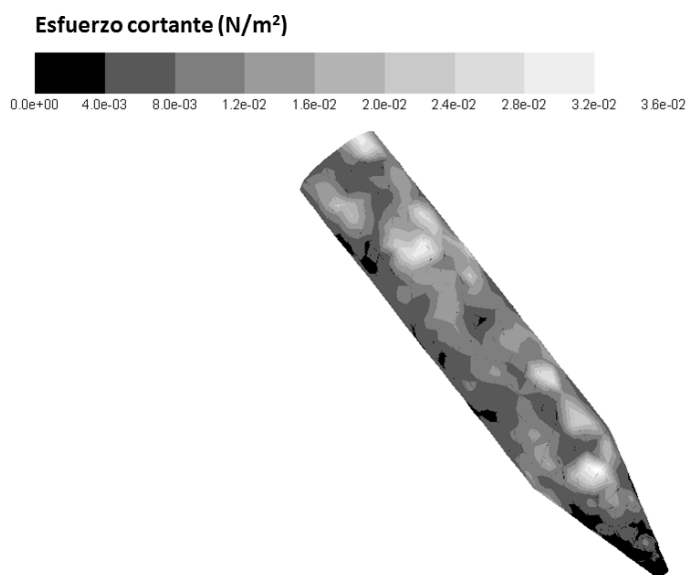


B

Cuando el canal fue operado a 10 ml/min. A) Vista completa del canal. B) Vista aumentada de la salida inferior (ver la ilustración 1 para localizar todos los componentes del canal).

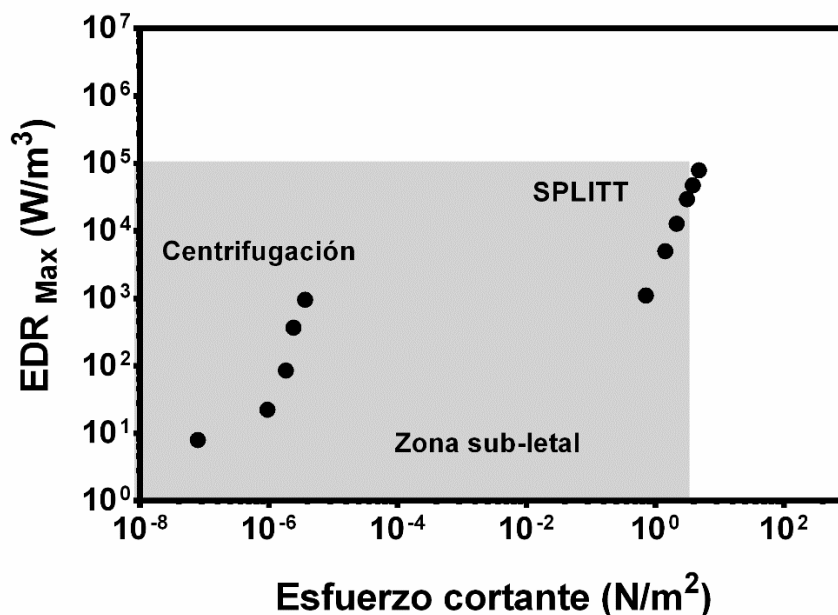
Aunque el esfuerzo cortante es frecuentemente utilizado como predictor de daño hidrodinámico, debe tenerse en cuenta que se están presentando los valores máximos registrados en la pared, lugar por el cual sólo una pequeña proporción de las células se encuentra. Además, ante un gradiente de cizalla, las células en suspensión pueden rotar disminuyendo su potencial lesivo. De hecho, el esfuerzo normal se relaciona mucho mejor con el daño celular (García-Briones and Chalmers, 1994). En este sentido, la tasa de disipación de energía (*energy dissipation rate, EDR*) cobra utilidad por cuanto cuantifica no sólo esfuerzo cortante sino también el normal. Los valores máximos de EDR se observaron en el conector de salida inferior (como se indica en la ilustración 1) del canal SPLITT y estuvo entre 1,1 y 79,1 kW/m³ para tasas de flujo entre 1,5 y 10,0 ml/min. Durante la centrifugación, la máxima EDR se observó justo antes de que las células lleguen al fondo del tubo y estuvo entre $7,9 \times 10^{-3}$ y $9,5 \times 10^1$ kW/m³, para aceleraciones relativas entre 100 y 1500 *g*, respectivamente. Como ha sido descrito previamente para canales de geometrías de diferentes, la relación entre EDR y esfuerzo cortante es directa (Ilustración 17) (Ma et al., 2002).

Ilustración 16. Esfuerzo cortante en el tubo de centrifuga operado a 1500 g.



Es necesario tener en cuenta que, por un lado, en el canal SPLITT se espera que la mayoría de las células sean transportadas por el centro del canal (bajo cizallamiento). Por otro lado, durante centrifugación la velocidad máxima se alcanza por fracciones de segundo, mientras que durante la duración total del protocolo (10 minutos) las células estarán siendo comprimidas en el fondo del tubo por efecto de la presión. Lo anterior, lleva a considerar necesariamente la presión como determinante de daño celular. A partir de los datos de simulaciones, se tuvieron en cuenta también los datos de presión estática (por encima de la atmosférica), encontrando que en el canal SPLITT, operado con flujos entre 1,5 y 10 ml/min se desarrollan presiones de 274 a 1100 Pa. En contraste, durante centrifugación entre 100 y 1500 g, la presión estática en el fondo el tubo fue de 37 a 129 Pa (Ilustración 18).

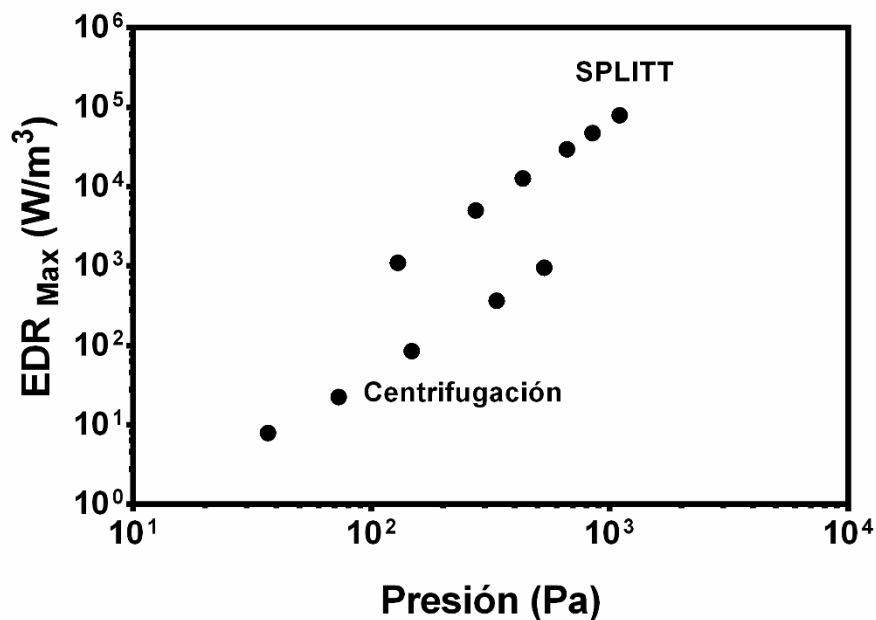
Ilustración 17. Relación entre máxima tasa de disipación de energía (EDR) y esfuerzo cortante durante separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación*.



*La zona sombreada en gris ha sido previamente considerada por otros autores como de efectos sub-letales (Ma et al., 2002).

Con el fin de relacionar el daño celular experimentado por efecto de la separación con la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas, se realizaron análisis de correlación bivariada de Spearman. Se encontró que la hemólisis (daño letal) se correlaciona de manera significativa y directa con el tiempo de exposición ($R=0,495$; $p=0,002$). También existe una correlación directa entre hemólisis y daño sub-lítico, medido como índice morfológico ($R=0,144$; $R^2=0,02$; $p=0,044$). La máxima tasa de disipación de energía se correlacionó moderadamente con el daño sub-letal (índice morfológico ($R=0,458$; $p=0,000$), mientras que la correlación del daño sub-letal con el esfuerzo cortante y presión fue leve ($R=0,396$ and $0,296$, respectivamente; $p=0,000$).

Ilustración 18. Relación entre presión y máxima tasa de disipación de energía (EDR_{Max}) durante separación SPLITT y centrifugación.

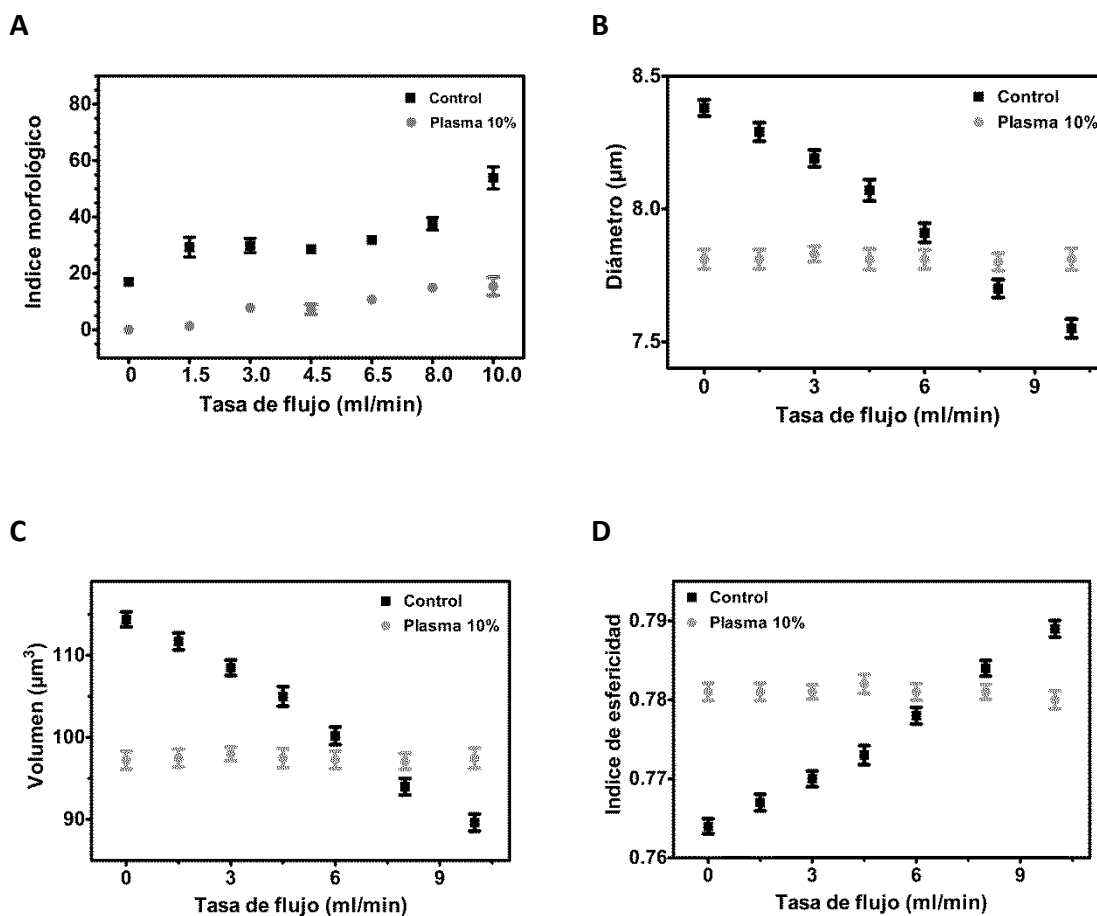


Efecto protector del plasma

Teniendo en cuenta que en los controles, la suplementación con plasma autólogo al 10% mostró proteger contra la formación de equinocitos y los cambios geométricos inducidos por la dilución de la muestra, se realizaron ensayos para determinar si el plasma también podía proteger contra los cambios observados tras la exposición al flujo a través del canal de separación hidrodinámica SPLITT.

En presencia de plasma, los glóbulos rojos control de las fracciones de entrada no mostraron formación de equinocitos (Ilustración 19A) y después de la separación SPLITT el índice morfológico fue significativamente menor con respecto a las células no suplementadas, para todas las tasas de flujo evaluadas. El efecto protector del plasma contra la formación de equinocitos puede atribuirse a la regulación del contenido lipídico de la membrana. Por un lado, la transferencia de colesterol desde lipoproteínas plasmáticas disminuye la fluidez de la membrana, la sensibilidad al estrés mecánico (Ramirez and Mutharasan, 1992) y la vesiculación de la membrana que resulta en la formación de equinocitos (Brecher and Bessis, 1972). Por otra parte, la fosfatidilcolina, un fosfolípido que favorece la transformación en equinocito, es transferido hacia la albúmina estabilizando la forma de disco del glóbulo rojo (Shohet and Haley, 1973).

Ilustración 19. Efecto protector del plasma contra el daño sub-letal producido por separación hidrodinámica SPLITT.



A) Índice morfológico. B) Diámetro. C) Volumen celular. D) Índice de esfericidad. Las células control fueron diluidas en solución salina isotónica. Las células suplementadas con plasma fueron diluidas en salina con plasma autólogo al 10%. Los resultados se presentan como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%, a partir de 14 experimentos independientes.

En relación con la geometría de los glóbulos rojos, y como se mencionó previamente, las células suspendidas en salina suplementada con plasma mostraron menor diámetro y volumen, con mayor índice de esfericidad, cuando se les compara con los eritrocitos suspendidos en salina no suplementada con plasma (Ilustración 19). Estos resultados pueden explicarse por el efecto osmótico de las proteínas plasmáticas, dado que a la concentración en que fue empleado incrementó la osmolaridad del medio de 290 a 311 mOsm/l. Además, las células suplementadas no exhibieron cambios geométricos relacionados con la separación SPLITT (Ilustración 19A-D). Este

efecto protector contra los cambios morfológicos inducidos por el estrés mecánico, no pueden ser atribuidos en este caso a cambio en la viscosidad del medio, ya que los valores medidos en las dos soluciones no fueron significativamente diferentes (1,003 vs 1,006 Pa·s). En cambio, podrían explicarse por disminución en la interacción de las células con las paredes del dispositivo (Hochmuth et al., 1972; Chianéa et al., 1999), y por la regulación del contenido lipídico de la membrana (Brecher and Bessis, 1972; Shohet and Haley, 1973; Ramirez and Mutharasan, 1992).

4.3.2 Macrófagos de ratón J774.A2

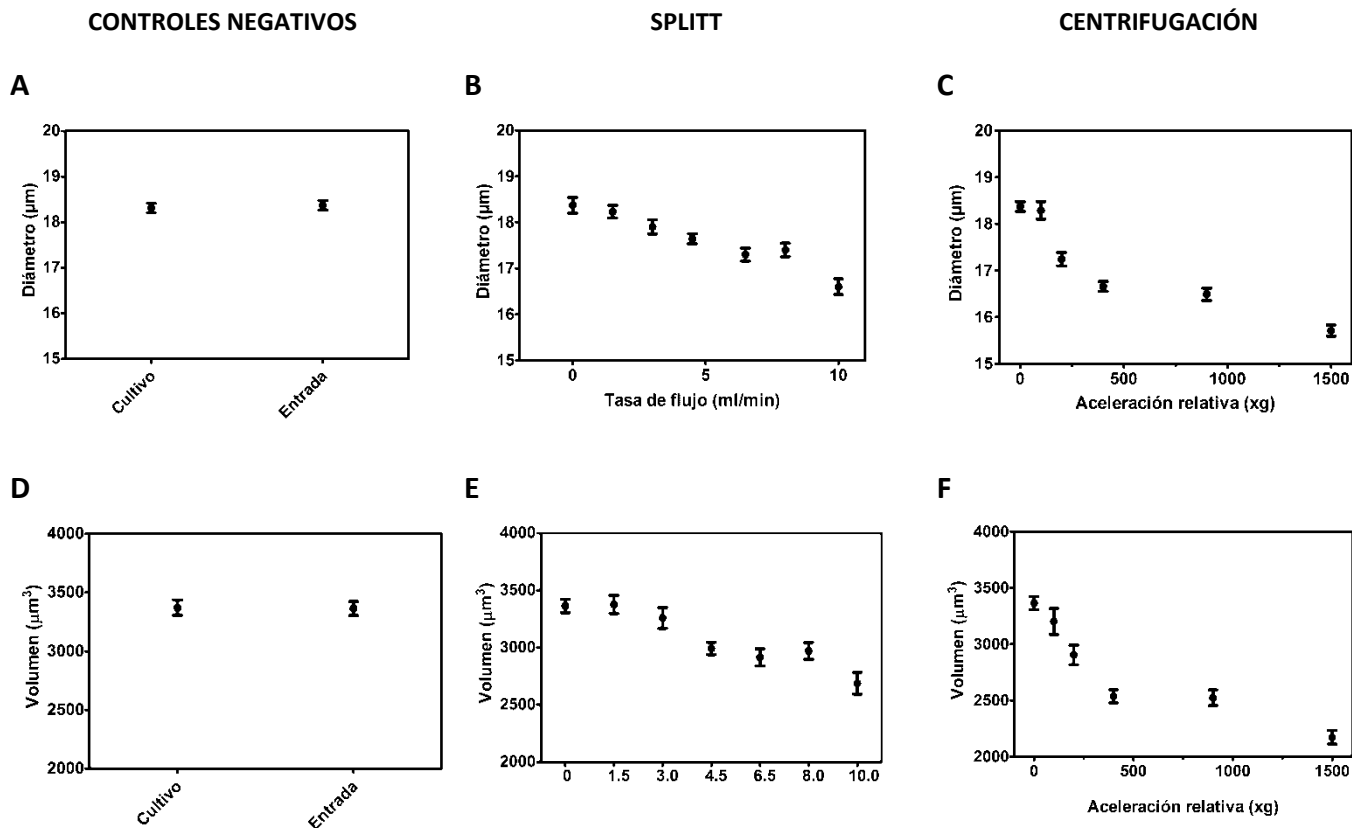
Geometría celular

El diámetro de macrófagos J774.A2 cultivados en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), en suspensión durante 12 horas fue $18,3 \pm 2,0 \mu\text{m}$ y después de haber sido suspendidos en la solución externa (fracción de entrada) fue $18,4 \pm 1,9 \mu\text{m}$ ($p > 0,05$). Después de haber sido expuestos a separación hidrodinámica SPLITT se observó disminución significativa y progresiva del diámetro hasta valores de $16,6 \pm 3,2 \mu\text{m}$ con flujo de 10 ml/min ($p = 0,0001$). Después de centrifugación también se observó disminución significativa del diámetro hasta $15,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$ con 1500 g ($p = 0,0000$) (Ilustración 20 A-C).

El volumen de macrófagos en cultivo fue $3372 \pm 1230 \mu\text{m}^3$ y en la fracción de entrada $3364 \pm 1128 \mu\text{m}^3$ ($p > 0,05$). La exposición al flujo a través del canal de separación SPLITT, el volumen disminuyó de manera progresiva de acuerdo con la tasa de flujo hasta $2688 \pm 1806 \mu\text{m}^3$ con flujos de 10 ml/min ($p = 0,0001$). De manera similar, tras la centrifugación el volumen disminuyó hasta $2171 \pm 1164 \mu\text{m}^3$ con la exposición a 1500xg ($p = 0,0000$) (Ilustración 20 D-F).

Los macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2 son, por naturaleza adherentes, por lo que permiten analizar el comportamiento de células que siendo cultivadas en condiciones de adherencia deben ser manipuladas en suspensión para la realización de ensayos bioquímicos y funcionales o para su procesamiento industrial. En el presente trabajo se utilizaron células cultivadas en suspensión durante 12 horas; en estas condiciones, los macrófagos J774 adquieren una forma casi esférica, con un diámetro promedio de $18,3 \pm 2,0 \mu\text{m}$, valor cercano al informado por nuestro grupo para células J774 .A1 (Forero et al., 1999), pero inferior al reportado por Gallin ($22 \mu\text{m}$) (McKinney and Gallin, 1990). Estas diferencias pueden ser explicadas por diferencias en la técnica empleada para realizar las mediciones a partir de micro-fotografías, así como por cambios en la concentración de suero fetal bovino empleada en el medio de cultivo. Aquí se empleó una concentración de 10%, mientras que ellos usaron 5% y como es sabido, la presencia de proteínas en el suero determina un aumento de la osmolaridad del medio, en forma proporcional a su concentración; a menor concentración de suero menor osmolaridad y mayor diámetro celular. También debe tenerse en cuenta que aquí se utilizaron células mantenidas en suspensión durante 12 horas mientras que ellos usaron células con cortos tiempo de adherencia (0-2 horas).

Ilustración 20. Geometría de macrófagos J774.A2 control y sometidos a dos técnicas de separación celular.



A-C: diámetro; D-F: área de superficie; G-H: volumen celular. Las barras de error corresponden a intervalos de confianza al 95% a partir de 14 experimentos independientes, total 1400 células.

El proceso de dilución de la muestra no afectó las dimensiones celulares, mientras que los dos métodos de separación evaluados sí lo hicieron. El diámetro y volumen celular disminuyeron de manera significativa después del uso de separación hidrodinámica SPLITT, particularmente con flujo de 10 ml/min, y con el uso de centrifugación, especialmente por encima de 200 g . De hecho, se observó una relación inversa y significativa entre fuerzas hidrodinámicas (cizallamiento y EDR) y volumen celular, lo que sugiere que en respuesta a estrés mecánico se activan mecanismos regulatorios de disminución del volumen celular (Hoffmann et al., 2009).

Fuerzas hidrodinámicas

Dado que el proceso de sedimentación de partículas en un medio es proporcional a la diferencia de densidades entre el medio y la partícula, y que la densidad de macrófagos es significativamente inferior a la de glóbulos rojos (1,071 y 1,100 g/cm³, respectivamente), los valores de EDR máxima en macrófagos fueron también inferiores. La máxima EDR en centrifugación de macrófagos, registrada en el fondo del tubo estuvo entre 6,5 x10⁻³ y 8,7x10⁻¹ kW/m³ para aceleraciones de 100 y 1500 g, respectivamente (mientras que para glóbulos rojos estos valores estuvieron entre 7,9 x10⁻³ y 9,5x10⁻¹ kW/m³). A pesar de lo anterior, para macrófagos también se observaron relaciones directamente proporcionales entre velocidad y esfuerzo cortante, así como entre éste y máxima EDR.

Para examinar la relación entre las fuerzas hidrodinámicas durante la separación celular y el daño letal y sub-letal en macrófagos, se realizaron análisis de correlación bivariada de Spearman entre esfuerzo cortante, máxima EDR, tiempo de exposición, viabilidad y volumen celular. No se observó correlación significativa entre viabilidad y las variables mencionadas. Por el contrario, el volumen celular se correlaciona de manera significativa y negativa con esfuerzo cortante, máxima EDR y presión (R=-0,909 y R=-0,921; p=0,000). De hecho, a partir del coeficiente de determinación se puede concluir que más del 80% de la variación en el volumen celular de macrófagos después de la separación celular se explica por las fuerzas hidrodinámicas, tanto esfuerzo cortante, como esfuerzo normal (cuantificado también en la max EDR), a diferencia de los observado en glóbulos rojos en los cuales los cambios de volumen fueron de magnitud similar después de ambos tipos de separación celular. Lo anterior, permite cuestionar si este efecto diferencial es producto de la morfología distintiva de cada tipo celular, es decir si los macrófagos por el hecho de ser casi esféricos son más sensibles a estrés mecánico, o más bien es por el hecho de ser células normalmente adherentes que tuvieron que ser disociadas mecánicamente para cultivarse en suspensión.

4.4 Conclusiones

- En glóbulos rojos, la evaluación de la formación de equinocitos mediante el índice morfológico y la medición de las dimensiones celular permitieron determinar daño sub-letal después de utilizar dos técnicas de separación celular.
- Las técnicas de separación celular evaluadas resultan en transformación discocito-equinocito, la cual es más intensa por encima de 8 ml/min de flujo en separación SPLITT y por encima de 200 g en centrifugación.
- La suplementación con plasma autólogo al 10% protege contra la formación de equinocitos durante separación SPLITT, por lo que se recomienda su inclusión en los medios de suspensión cuando deben manipularse células altamente diluidas.

- Los glóbulos rojos mostraron disminución de diámetro y volumen celular e incremento de esfericidad después de la exposición a separación SPLITT y centrifugación, pero tales cambios fueron de magnitud similar.
- Mediante análisis de correlación se determinó que la hemólisis se asocia directamente con el tiempo de exposición, mientras que la formación de equinocitos lo hace inversamente con esfuerzo cortante y tasa máxima de disipación de energía (EDR_{max}).
- Los macrófagos de ratón J774.A2 mantenidos en suspensión adquieren una forma casi esférica, en la cual no se observaron cambios apreciables después de separación celular.
- En macrófagos, el diámetro y el volumen celular mostraron disminución progresiva después de separación SPLITT y de centrifugación, de manera dependiente del esfuerzo cortante y la máxima EDR ($R=0,9$).
- La forma celular (discocito vs esfera), las características de adherencia (células suspendidas vs adherentes) y las propiedades de la membrana y el citoesqueleto pueden determinar la magnitud de los cambios morfológicos observados en respuesta a las fuerzas hidrodinámicas de la separación celular.
- El hecho que después de ser expuestas a separación celular estos dos modelos celulares muestren disminución de diámetro y volumen sugieren que pueden estar en marcha mecanismos de regulación del volumen celular. En este sentido, la determinación del potencial de membrana puede esclarecer algunos de los mecanismos implicados.

5. Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización de la membrana

5.1 Introducción

Dado que el efecto inicial de las fuerzas hidrodinámicas sobre las células implica la deformación de la membrana plasmática, es en ella donde se producen las respuestas celulares de primera línea frente al estrés mecánico. En este sentido, el potencial de membrana permite detectar cambios tempranos producidos por la activación de canales iónicos. La utilización de sondas fluorescentes sensibles a voltaje permite la medición del potencial de membrana en varias células de manera simultánea, lo que refleja el comportamiento poblacional en respuesta a un estímulo determinado, en este caso el estrés mecánico impuesto por la separación celular. El objetivo de los siguientes experimentos fue determinar el efecto de dos técnicas de separación celular (SPLITT y centrifugación) sobre el potencial de membrana en glóbulos rojos y macrófagos para dar respuesta a los objetivos asociados con determinación de la función en estos modelos celulares.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Glóbulos rojos

La obtención y preparación de las muestras de sangre periférica, así como los procedimientos de separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación fueron como los descritos previamente en las secciones 3.2.1 a 3.2.4.

Soluciones

Debido a que previamente algunos autores han informado de la utilización de sondas sensibles al voltaje para la determinación del potencial de membrana en glóbulos rojos, haciendo uso de NaCl como medio de suspensión (Hoffman and Laris, 1974), y que estas mediciones son sensibles a la composición iónica del medio intra y extracelular, se realizaron inicialmente ensayos de control empleando solución salina isotónica (NaCl 154 mM, pH ajustado a 7,40; osmolaridad $290 \pm 0,7$ mOsm/l) y una solución electrolítica que además de sodio contenía otros cationes importantes para la función celular. La composición de esta solución electrolítica fue (en mM): 140 NaCl; 5 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 10 glucosa; pH 7,4; 290 mOsm/l (reactivos de Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

Potencial de membrana

El potencial de membrana se determinó mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente aniónica sensible a potencial DiSBAC₂(3) (568/590-630 nm; Invitrogen). Esta sonda por su carga se acumula en el citosol cuando ocurre despolarización aumentando su fluorescencia. Para cuantificar el efecto se parte del hecho que la concentración intracelular de potasio es mayor que la extracelular y valiéndose del compuesto valinomicina, un ionóforo lipofílico capaz de formar complejos con iones K los cuales son transportados a través de la membrana celular, se incrementa la permeabilidad de la membrana a este ión hasta el punto que el potencial de membrana es determinado completamente por el gradiente transmembrana para potasio. La adición de valinomicina hiperpolariza las células si la concentración de potasio extracelular es menor que la intracelular, y las despolariza si es mayor. Si se adiciona valinomicina a suspensiones celulares equilibradas con una sonda fluorescente sensible a voltaje, la cual se distribuye acorde con éste, en soluciones con un rango de concentraciones de potasio, se puede construir una curva de calibración que relacione la fluorescencia con el potencial de membrana, el cual puede ser calculado a partir de la ecuación de Nernst (Shapiro, 2000).

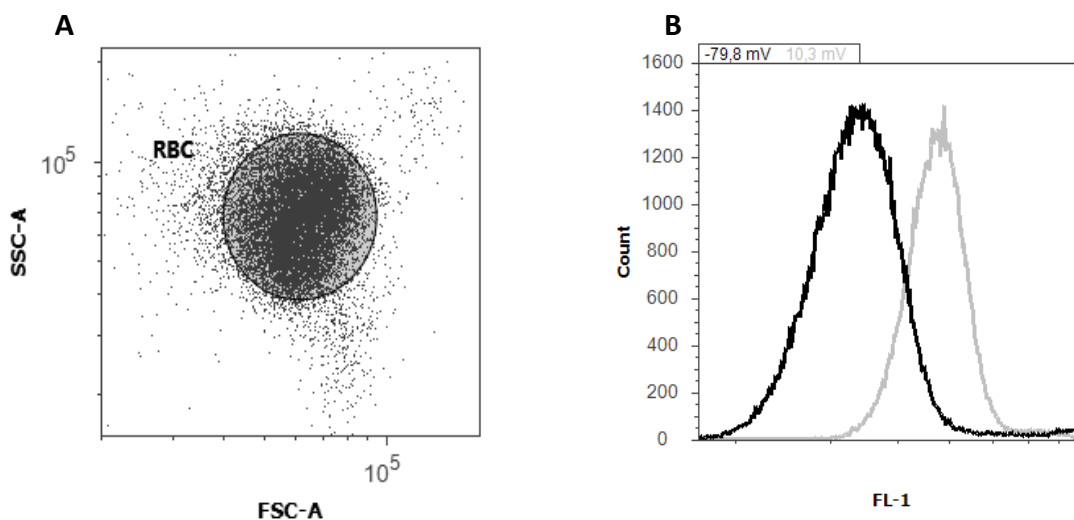
La sonda DiSBAC₂(3) se utilizó a una concentración final en la mezcla de reacción de 230 nM en DMSO y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para la determinación cuantitativa del potencial, se construyó una curva de calibración utilizando valinomicina 1 μM en etanol y soluciones con concentración conocida de potasio, en cuyo caso el potencial de reposo puede ser calculado como el potencial de Nernst para ese ión (Klapperstück et al., 2011).

Por cada grupo de muestras se prepararon controles de auto-fluorescencia y se construyó una curva de calibración estándar. Los valores de fluorescencia se midieron con un citómetro de flujo equipado con láser argón con longitudes de onda de excitación y emisión de 535/585 ± 62 nm (FACS[®]Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para cada muestra, se adquirieron 100000 eventos. Los datos fueron analizados con el programa Attune[®] Cytometric Software v1.2.5

(Applied Biosystems Inc, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). A partir del citograma de dispersión de luz (SSC vs FSC) se seleccionó la ventana correspondiente a glóbulos rojos; el potencial de membrana se calculó a partir del valor de área bajo la curva (FL-1 A) (Ilustración 21).

Teniendo en cuenta que en glóbulos rojos el estrés mecánico activa corrientes de potasio dependientes de calcio (Dyrda et al., 2010), se realizaron ensayos utilizando un quelante de calcio en la solución externa con el fin de determinar si los cambios observados en el potencial de membrana eran dependientes de la concentración extracelular de calcio ionizado. Para tal fin se adicionó a la solución electrolítica ácido etilen-glicol-tetra-acético (EGTA) 2 mM (osmolaridad final 292 mOsm/l) como quelante de calcio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros de celulosa con tamaño de poro de 0,2 μm y equilibradas en aire ambiente (presión parcial de oxígeno, $p\text{O}_2=117$ mmHg; presión parcial de dióxido de carbono, $p\text{CO}_2=0,2$ mmHg; presión atmosférica 560 mmHg).

Ilustración 21. Determinación del potencial de membrana de glóbulos rojos mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente aniónica DiSBAC₂(3).



- A) Citograma de dispersión de luz en el que se muestra la ventana correspondiente a glóbulos rojos que se empleó para el análisis de fluorescencia.
- B) La despolarización genera aumento de la fluorescencia. En negro se muestra el estándar correspondiente a $-79,8$ mV y en gris a $+10,3$ mV; el cambio observado en la intensidad de fluorescencia fue $0,36\%/mV$.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

Una de las funciones más importantes de los glóbulos rojos es el transporte de oxígeno unido a la hemoglobina. El alto contenido intracelular de hemoglobina impone a estas células un reto osmótico significativo. La CHCM es un indicador porcentual de la concentración de hemoglobina intracelular, y se calcula a partir de la concentración de hemoglobina total y el hematocrito. Este indicador proporciona información acerca de la función específica de los glóbulos rojos.

La concentración de hemoglobina total (*Hb*) se determinó mediante el método de ciano-meta-hemoglobina (540 nm) y el hematocrito (*Hcto*) fue calculado a partir de las mediciones de volumen por citometría de impedancia, con un analizador hematológico (Sysmex® 14N, Sysmex Corp, USA). A su vez, la CHCM se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CHCM (\%) = \frac{Hb \text{ (g/dl)}}{Hcto (\%)} \times 100 \quad (18)$$

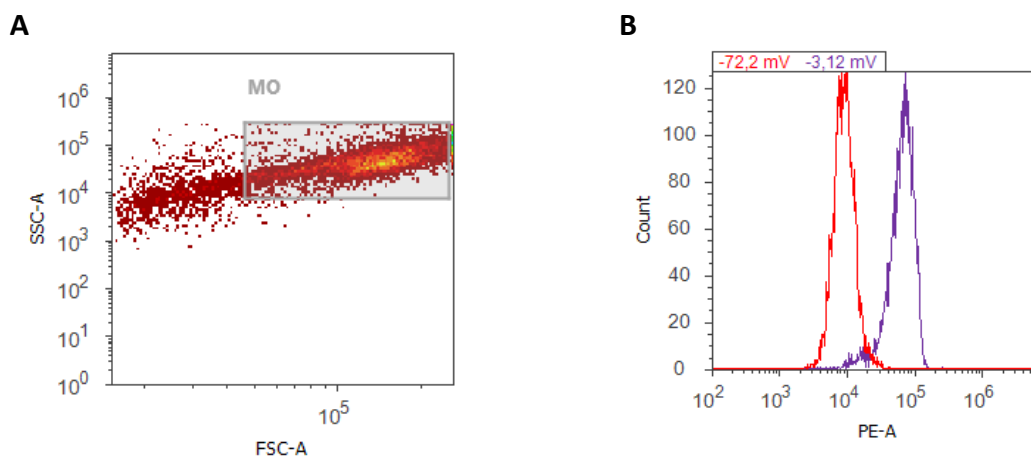
5.2.2 Macrófagos de ratón J774.A2

La obtención y preparación de suspensiones de macrófagos de ratón J774.A2, así como los procedimientos de separación hidrodinámica SPLITT y centrifugación como los descritos previamente en las secciones 3.2.2 a 3.2.4.

Potencial de membrana

El potencial de membrana de macrófagos de ratón se determinó mediante la misma técnica anteriormente descrita. Se utilizó una solución electrolítica con la siguiente composición (en mM): 140 NaCl; 5 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 10 glucosa; pH 7,4; 292±0,8 mOsm/l (reactivos de Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) (Ilustración 22). Teniendo en cuenta que en macrófagos J774, la exposición al flujo activa corrientes de potasio (Randriamampita and Trautmann, 1987), se utilizó un inhibidor de estos canales con el fin de determinar si los cambios observados en el potencial de membrana de se explican por activación de estos canales. Para tal fin se adicionó a la solución externa 4-amino-piridina 10 mM (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)(Grissmer et al., 1994).

Ilustración 22. Determinación del potencial de membrana de macrófagos de ratón J774.A2 mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente aniónica DiSBAC₂(3).



A) Citograma de dispersión de luz en el que se muestra la ventana correspondiente a macrófagos que se empleó para el análisis de fluorescencia.

B) La despolarización genera aumento de la fluorescencia. En púrpura se muestra el estándar correspondiente a -13,2 mV y en rojo -72,2 mV.

Nitritos en el sobrenadante

Como células fagocíticas, los macrófagos cumplen funciones de efectores de la respuesta inmune celular. En respuesta a ciertos estímulos, por ejemplo interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α o lipo-polisacárido (LPS) (vía clásica) los macrófagos experimentan un fenómeno conocido como activación, mediante el cual se incrementa su capacidad microbicida, tumoricida y de secreción de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios (Mosser and Edwards, 2008). Una de las características de los macrófagos activados por esta "vía clásica" es el aumento de actividad de óxido nítrico sintetasa inducible (MacMicking et al., 1997). Esta enzima promueve la formación de óxido nítrico que por tener una vida media corta y experimentar rápida oxidación a nitritos es de difícil detección. Por tanto, la determinación de nitritos es una forma de cuantificar la producción de óxido nítrico, e indirectamente de activación. La concentración de nitritos puede determinarse colorimétricamente mediante la utilización del reactivo de Griess. Este reactivo contiene ácido sulfanílico, el cual reacciona con nitritos formando una sal de diazonio, éste última a su vez se acopla con α -naftilamina produciendo un compuesto de color rosado que puede medirse a 548 nm.

Teniendo en cuenta que en macrófagos expuestos al flujo se produce activación de corrientes de potasio (Randriamampita and Trautmann, 1987), y que algunos canales de potasio están implicados en la activación celular y la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos estimulados con

LPS (Vicente et al., 2003, 2005), se quiso determinar la concentración de nitritos en el sobrenadante de macrófagos después de ser sometidos a SPLITT y a centrifugación.

Los nitritos en el sobrenadante se determinaron mediante técnica colorimétrica con el uso del reactivo de Griess (520-590 nm) (Griess Reagent Kit for Nitrite Determination, G-7921, Molecular Probes, Invitrogen), utilizando un lector de absorbancia en placas de 96 pozos (Ultramark EX, BioRad Laboratories Inc., USA). Como control positivo, se emplearon sobrenadantes de cultivo de macrófagos, 12 horas después de haber sido activados con LPS 20 pg/ml e IFN- γ 1 μ g/ml (LPS a partir de *E. coli*, referencia L-8274 e IFN- γ recombinante de ratón, referencia I-4777, respectivamente, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

5.2.3 Análisis estadístico

En el texto, los resultados se presentan como media \pm 1 desviación estándar. Para facilitar la apreciación visual de la significancia estadística de las diferencias observadas, en todas las ilustraciones las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%; las diferencias son significativas cuando los intervalos de confianza no se sobreponen. La distribución de los datos se evaluó mediante prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba de Friedman con análisis *post hoc* con prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Se estableció un nivel de significancia en un valor $p < 0,05$ e intervalo de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e IBM® SPSS v 20.0 (IBM Inc., New York, NY, USA).

5.2.4 Consideraciones éticas

Durante la realización de este estudio se cumplieron las normas para investigación con seres humanos y para la manipulación de muestras de origen biológico (resolución 8430 de 1993, República de Colombia; Declaración de Helsinki) y se recibió la aprobación del comité de ética institucional (Centro Internacional de Física y Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización de glóbulos rojos

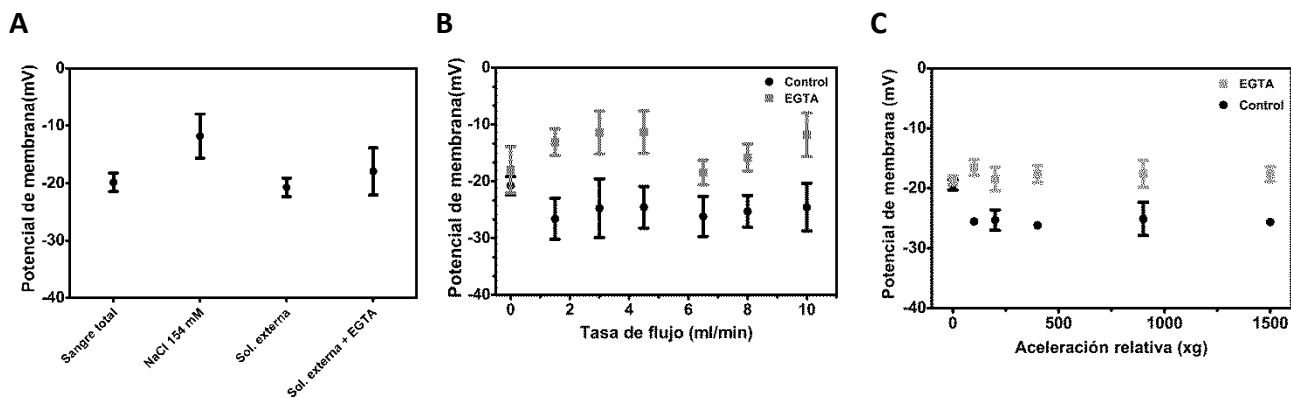
El potencial de membrana (V_m) medido en glóbulos rojos recién extraídos fue $-19,9 \pm 2,0$ mV, utilizando tanto solución salina como solución electrolítica. Este valor es cercano al medido con otras sondas fluorescentes y mediante *patch clamp* para el mismo valor de pH extracelular (Hoffman and Laris, 1974), lo que sugiere que la manipulación a través del citómetro de flujo por sí misma no estaría afectando significativamente el valor basal. Este valor de V_m es relativamente bajo comparado con el potencial de equilibrio para el potasio, lo que sugiere que en eritrocitos, la permeabilidad basal a otros iones, como por ejemplo el cloruro es determinante del potencial de membrana en reposo (Hoffman and Laris, 1974).

Se observó que la sola incubación durante 2 horas (que fue el tiempo aproximado que tardaron los experimentos de separación y el procesamiento de las muestras hasta la medición de potencial de membrana mediante citometría de flujo) en solución salina isotónica (pH 7,4), sin someter a separación alguna, resultó en despolarización (Ilustración 23A). Dos posibles mecanismos pueden explicar este resultado. Por un lado, la incubación a una temperatura inferior a la corporal normal, en este caso a 25°C disminuye la actividad de la bomba Na/K ATPasa. Por otro lado, la incubación en un medio externo libre de potasio resulta en aumento de la concentración intracelular de sodio (Glynn, 1956) produciéndose despolarización. Para abordar este fenómeno, se realizaron ensayos con una solución electrolítica que contenía potasio 5 mM, utilizando la misma temperatura y tiempo de incubación. El potencial de membrana así medido fue $-20,8 \pm 3,0$ mV, valor similar al de los glóbulos rojos recién extraídos ($p > 0,05$), por lo que se concluye que la despolarización observada por la incubación en solución salina se explica por ausencia de potasio en el medio extracelular (Glynn, 1956).

Después de la separación se observó hiperpolarización hasta valores de $-26,6 \pm 2,8$ mV después de separación SPLITT con flujo de 10 l/min y $-25,6 \pm 0,3$ mV ($p = 0,0001$) después de centrifugación a 1500 g durante 10 minutos (Ilustración 23B-C). Este fenómeno fue inhibido completamente en presencia de EGTA. De hecho, las células tratadas con EGTA tampoco experimentaron cambios en índice morfológico ni en volumen celular ($115,26 \pm 17,28 \mu\text{m}^3$ después de la exposición a 10 ml/min; $p > 0,05$ con respecto a $114,4 \pm 17,2 \mu\text{m}^3$ en la fracción de entrada). Lo anterior sugiere que están involucrados fenómenos que dependen de la concentración extracelular de calcio. Posiblemente, el estrés mecánico de la separación resulta en entrada de calcio desde el medio extracelular hacia

el citosol, y este fenómeno es determinante tanto en los cambios de potencial de membrana como en la formación de equinocitos y la disminución del volumen celular.

Ilustración 23. Potencial de membrana en glóbulos rojos antes y después de ser sometidos a dos técnicas de separación celular.



A) El potencial de membrana medido en células suspendidas en solución externa por dos horas es representativo del valor en sangre total recién extraída.

B) Separación hidrodinámica SPLITT.

C) Centrifugación. Se utilizó el quelante de calcio EGTA para determinar si los cambios observados son dependientes del calcio ionizado extracelular. Los resultados se muestran como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95%, a partir de 16 experimentos independientes.

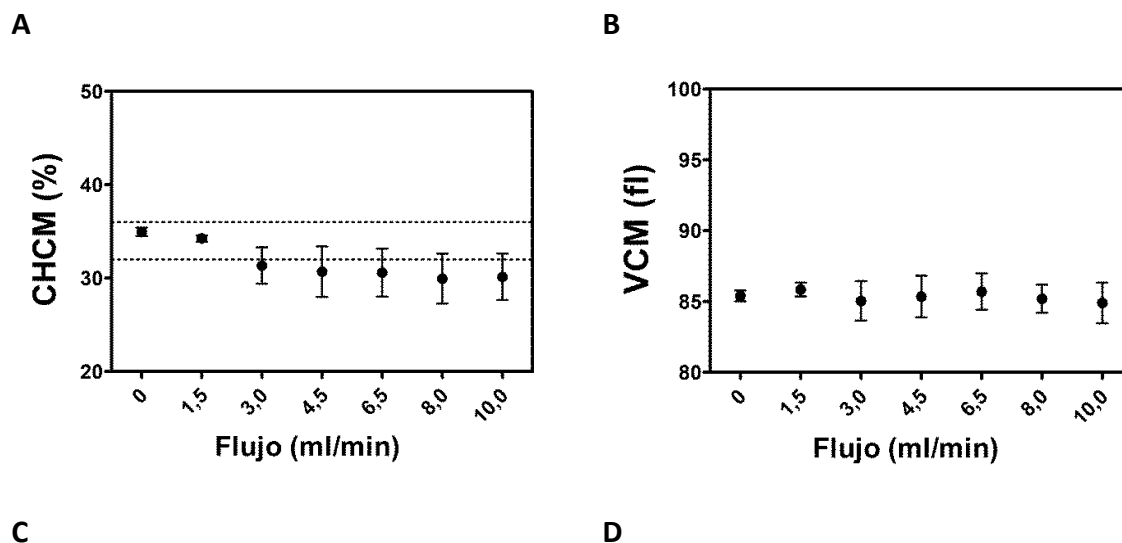
El canal de potasio dependiente de calcio (canal Gardos) de la membrana eritrocitaria ha sido previamente implicado en la respuesta eritrocitaria a la deformación de la membrana y a estrés osmótico (Bennekou et al., 2003). La deformación de la membrana desencadena inicialmente entrada de calcio desde el medio extracelular y aumento de su concentración intracelular (Soldati et al., 1997), lo que activa canales de potasio dependientes de calcio que resulta en hiperpolarización (Johnson and Tang, 1992). Establecida una carga neta más negativa del citosol, se favorece la fuga de cloruro y deshidratación celular, que se ve reflejada en menor volumen celular (Dyrda et al., 2010). Otros eventos desencadenados por calcio intracelular también ayudan a comprender por qué en presencia de EGTA no se observó formación de equinocitos. La elevación de calcio en el citosol también conlleva a externalización de fosfatidiletanolamina y fosfatilserina, que además de considerarse un evento apoptótico, favorece la formación de equinocitos (Daleke, DL and Huestis, WH, 1989). La evidencia presentada permite plantear la necesidad de considerar la utilización de quelantes de calcio como aditivos protectores contra el estrés mecánico en glóbulos rojos.

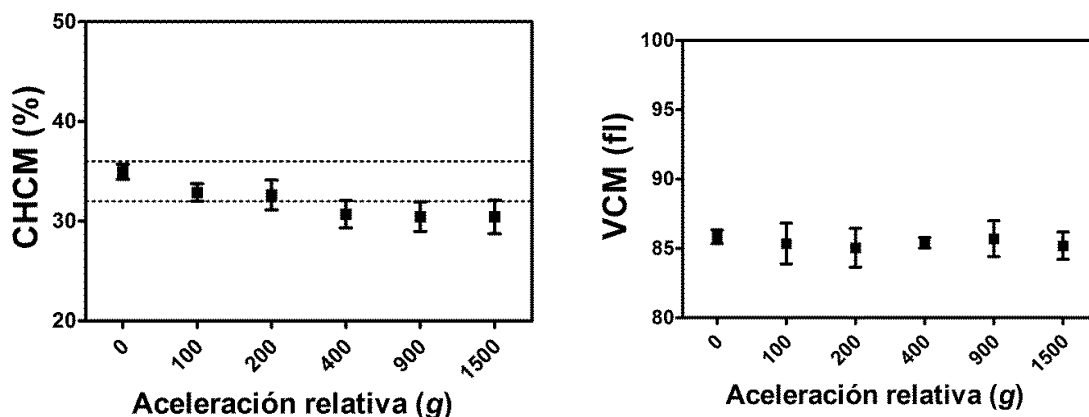
5.3.2 Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media en glóbulos rojos

En glóbulos rojos en la fracción de entrada, la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fue $35,6 \pm 0,3$ % y disminuyó a $35,0 \pm 0,8$ % después de separación SPLITT con flujo de 1,5 ml/min. Por encima de este flujo se observó disminución ulterior y sostenida hasta $30,2 \pm 4,3$ % con flujo de 10 ml/min ($p = 0,001$; ilustración 24). Después de centrifugación la CHCM disminuyó a $32,9 \pm 1,6$ % después de 100 g, y a $30,7 \pm 2,4$ % con aceleraciones de 400-1500 g ($p = 0,01$). Por su parte, el volumen corpuscular medio (VCM) fue $83,8 \pm 0,1$ fl en la fracción de entrada, y no mostró cambios después de separación SPLITT ni de centrifugación.

Previamente se ha informado que como consecuencia de estrés mecánico ocurre disminución de la CHCM (Sakota et al., 2008). En el presenta estudio, la disminución de la CHCM en ausencia de cambios en el VCM, sugiere que ocurrió pérdida del contenido celular de hemoglobina después de la separación, la cual sólo se puede explicar parcialmente por muerte celular, cuantificada como hemoglobina libre en el sobrenadante (capítulo 3, ilustración 3). Por lo que se piensa que pudo haber ocurrido pérdida de hemoglobina a través de vesículas de membrana (Willekens et al., 2003) como parte del proceso de respuesta al estrés mecánico y la formación de equinocitos (Allan et al., 1976).

Ilustración 24. Índices eritrocitarios medidos antes y después de utilizar dos técnicas de separación celular.





- A) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM%) antes y después de separación SPLITT; las líneas punteadas señalan los valores de referencia en adultos sanos.
- B) Volumen corpuscular medio (VCM) antes y después de separación SPLITT; los límites del eje corresponden a los valores de referencia en adultos sanos.
- C) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM%) antes y después de centrifugación.
- D) Volumen corpuscular medio (VCM) antes y después de separación SPLITT. Los resultados se presentan como medias y las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95% a partir de 14 experimentos independientes (n=14).

5.3.3 Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización en macrófagos

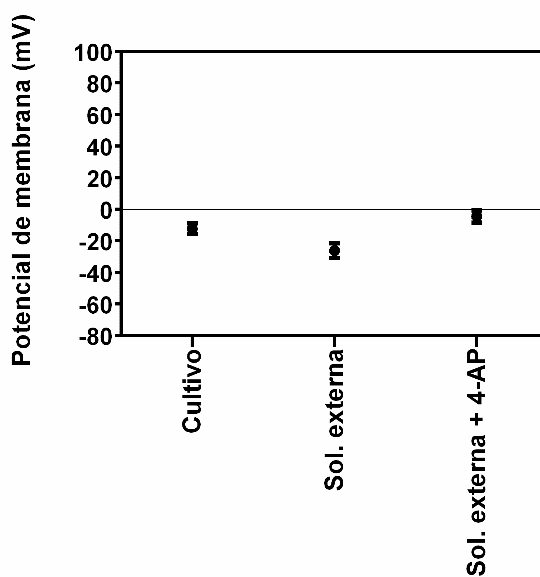
Siendo los macrófagos células normalmente adherentes, su potencial de membrana fisiológico cambia de acuerdo con el tiempo de adherencia por aumento de corrientes de potasio (Gallin and Sheehy, 1985; McKinney and Gallin, 1990). Por lo tanto, es esperable que el potencial de membrana se encuentre despolarizado en células en suspensión. El potencial de membrana de macrófagos cultivados en suspensión por 12 horas fue $-12,4 \pm 4,1$ mV, el cual es similar al informado previamente en células J774.A1 (Young et al., 1983; McKinney and Gallin, 1990) pero despolarizado con respecto al reportado por nuestro grupo para células adheridas por 24 horas (Forero et al. 1999). El hecho de que el potencial aquí medido en células en suspensión sea similar al reportado previamente sugiere que, en estas condiciones experimentales, la manipulación a través del citómetro de flujo por sí misma no estaría afectando significativamente el valor basal de potencial de membrana.

El procedimiento de dilución en la solución electrolítica resultó en hiperpolarización leve, pero estadísticamente significativa ($-26,3 \pm 6,4$ mV; $p=0,01$; ilustración 25A). Hallazgo concordante con lo observado por Randriamampita, quien determinó que el flujo genera deformaciones de membrana que producen hiperpolarización a través de corrientes de potasio (Randriamampita and Trautmann, 1987). Por su parte, las técnicas de separación SPLITT y centrifugación resultaron en hiperpolarización aún más intensa ($-53,8 \pm 4,1$ mV con flujo de 10 ml/min; $-49,5 \pm 5,8$ mV después de centrifugación a 1500 g durante 10 minutos; $p=0,0000$), la cual fue inhibida por 4-amino-piridina (4-AP), un inhibidor de canales de potasio (Ilustración 25B-C) (Grissmer et al., 1994). Las células

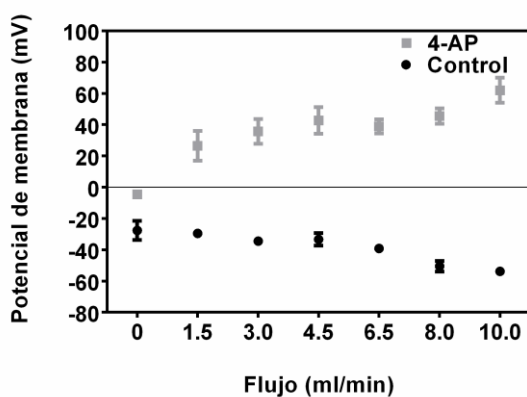
tratadas con 4-AP tampoco mostraron cambios significativos de volumen celular después de ser sometidos a estas técnicas de separación ($3364 \pm 1128 \mu\text{m}^3$ en la fracción de entrada y $3397 \pm 1210 \mu\text{m}^3$ con flujo de 10 ml/min), lo que lleva a pensar que la hiperpolarización de la membrana es condición necesaria para la disminución del volumen en estas condiciones.

Ilustración 25. Potencial de membrana de macrófagos de ratón J774.A2 antes y después de ser expuestos a dos técnicas de separación celular.

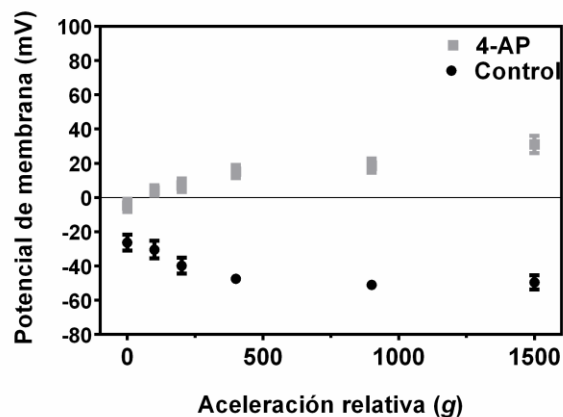
A Macrófagos control en cultivo, en solución externa y en presencia del inhibidor de canales de potasio 4-amino-piridina (4-AP).



B Separación hidrodinámica SPLITT.



C Centrifugación.

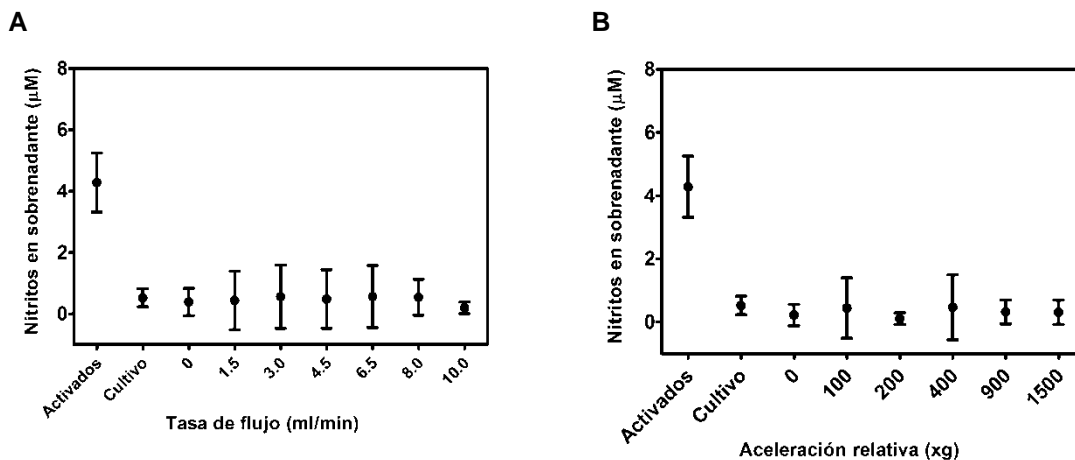


Las barras de error corresponden a intervalos de confianza al 95%, a partir de 10 experimentos independientes.

5.3.4 La separación celular no resulta en activación de macrófagos

Teniendo en cuenta que las corrientes mediadas por canales de potasio han sido implicadas en activación celular y producción de óxido nítrico por parte de macrófagos activados por LPS (Vicente et al., 2003, 2005), se quiso determinar la concentración de nitritos en el sobrenadante después de ser sometidos a SPLITT y a centrifugación. Como controles positivos se utilizaron células estimuladas con bajas cantidades de LPS e IFN- γ durante 12 horas (Niño A and Camacho M, 2003), en las cuales la concentración de nitritos en el sobrenadante fue $4,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$. La producción de nitritos por parte de las células en cultivo, en reposo (no activadas) fue mínima ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$) y no se observaron cambios en células expuestas a separación hidrodinámica SPLITT ni a centrifugación (Ilustración 26), es decir que la separación no desencadena activación de macrófagos J774.A2. Lo anterior sugiere que la cascada de señalización que se pone en marcha tras la activación de los canales de potasio, en respuesta al LPS es específica de tal estímulo y que la apertura de estos canales no es condición suficiente para la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos (Young et al., 1983; McKinney and Gallin, 1990; Luo et al., 2006). Los hallazgos del presente trabajo son consistentes con los informados en leucocitos humanos separados en un dispositivo microfluido y evaluados por expresión de antígenos de superficie mediante citometría de flujo (Sethu et al., 2006). Se concluye entonces que para esta línea celular específica J774.A2 la exposición a fuerzas hidrodinámicas de hasta $4,9 \times 10^7 \text{ kW/m}^3$ no resulta en activación celular y producción de óxido nítrico.

Ilustración 26. Nitritos en sobrenadante de macrófagos de ratón J774.A2 sometidos a separación hidrodinámica SPLITT (A) y centrifugación (B).



Las barras de error corresponden a intervalos de confianza al 95% a partir de 12 experimentos independientes.

5.4 Conclusiones

- En glóbulos rojos, la utilización de solución salina isotónica resulta por sí misma en despolarización celular, por lo cual se recomienda que en ensayos de separación celular y mediciones de potencial de membrana, se empleen soluciones electrolíticas que además de sodio y cloruro contengan potasio.
- Las técnicas de separación celular SPLITT y centrifugación resultan en hiperpolarización en glóbulos rojos, la cual es inhibida en presencia del quelante de calcio EGTA, por lo cual se cree que este fenómeno depende de la concentración de calcio en el medio extracelular. Adicionalmente, las células tratadas con EGTA no mostraron reducción del volumen celular ni formación de equinocitos después de la separación. Por lo anterior, se sugiere considerar la adición de quelantes de calcio al medio extracelular como agente protector contra los cambios morfológicos (sub-letales) generados por el estrés mecánico de la separación celular.
- En glóbulos rojos, estas técnicas de separación celular resultaron también en disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media, lo que sugiere vesiculación de la membrana plasmática.
- En macrófagos, el potencial de membrana es un indicador altamente sensible de cambios inducidos por el estrés mecánico, toda vez que incluso el proceso de dilución de la muestra resulta en hiperpolarización leve, en tanto que las técnicas de separación SPLITT y centrifugación producen hiperpolarización intensa. Este fenómeno es inhibido en presencia de 4-AP, lo que indica que están involucrados canales de potasio. Además las

células tratadas con este inhibidor no mostraron reducción del volumen celular después de la separación. Lo anterior sugiere que los cambios en el potencial de membrana son condición necesaria para la reducción del volumen celular que se observa después de la separación celular.

- La medición de nitritos en el sobrenadante de macrófagos J774.A2 sometidos a separación SPLITT y centrifugación, permitió determinar que bajo las condiciones de operación utilizadas no ocurre activación de estas células.

6. Optimización de dispositivos micro-fluídicos de separación para minimizar el daño celular

Habitualmente, los dispositivos de separación del tipo campo-flujo FFF y SPLITT tienen entradas y salidas dispuestas con un ángulo de 90° con respecto al canal de separación, y utilizan conectores de diámetro reducido (Ilustración 2; tabla 4) (Giddings, 1985; Fuh et al., 1995; Chianéa et al., 2000). Las simulaciones de separación SPLITT, de un canal con este diseño mostraron que el diámetro reducido del conector de salida y su disposición en ángulo recto son responsables de las mayores fuerzas hidrodinámicas impuestas a las células. Estas fuerzas, cuantificadas mediante esfuerzo cortante y tasa máxima de disipación de energía, dan cuenta también del componente elongacional, que es el más lesivo para las células en suspensión (García-Briones and Chalmers, 1994). Además, los análisis de correlación indicaron que estas fuerzas hidrodinámicas producidas en el conector de salida predicen el daño celular sub-lethal tanto en glóbulos rojos como en macrófagos J774.A2. Por lo anterior, es necesario rediseñar estos componentes, de manera que su diámetro sea el mayor posible, de acuerdo con las dimensiones del canal en su zona de transporte y que su orientación con respecto al mismo sea en un ángulo mayor a 90° y cercano a 180°.

Por otro lado, comúnmente las separaciones en dispositivos micro-fluídicos utilizan soluciones salinas isotónicas para diluir la muestra (Merino-Dugay et al., 1992; Fuh and Giddings, 1995). Los resultados del presente estudio han mostrado que en esas condiciones, la viabilidad celular disminuye significativamente por encima de flujos de 4,5 ml/min, además de que ocurre formación de equinocitos, disminución del volumen celular e incremento del índice de esfericidad. Todos estos efectos fueron mitigados en presencia de plasma autólogo al 10%, por lo cual se recomienda la suplementación con plasma o suero; el uso de agentes como albúmina o Pluronic® F-68 no se aconseja si la separación celular se hace con fines terapéuticos en humanos. Además, el uso de soluciones de suspensión que carecen de potasio resulta por sí misma en despolarización celular. Lo anterior lleva a sugerir que las soluciones empleadas para diluir las células antes de ser manipuladas a través de dispositivos del tipo SPLITT incluyan además de sodio y cloruro, potasio y un amortiguador de pH. Con base en los resultados que muestran que la adición del quelante de calcio EGTA inhibió algunos de los efectos sub-letales observados tras la separación (formación de equinocitos, hiperpolarización y reducción del volumen celular), se sugiere considerar también la

utilización de este tipo de compuestos aunque con precaución en aplicaciones con fines terapéuticos debido a su toxicidad en humanos.

7. Modelo general de efecto de la separación sobre la función celular

7.1 Células en suspensión (glóbulos rojos)

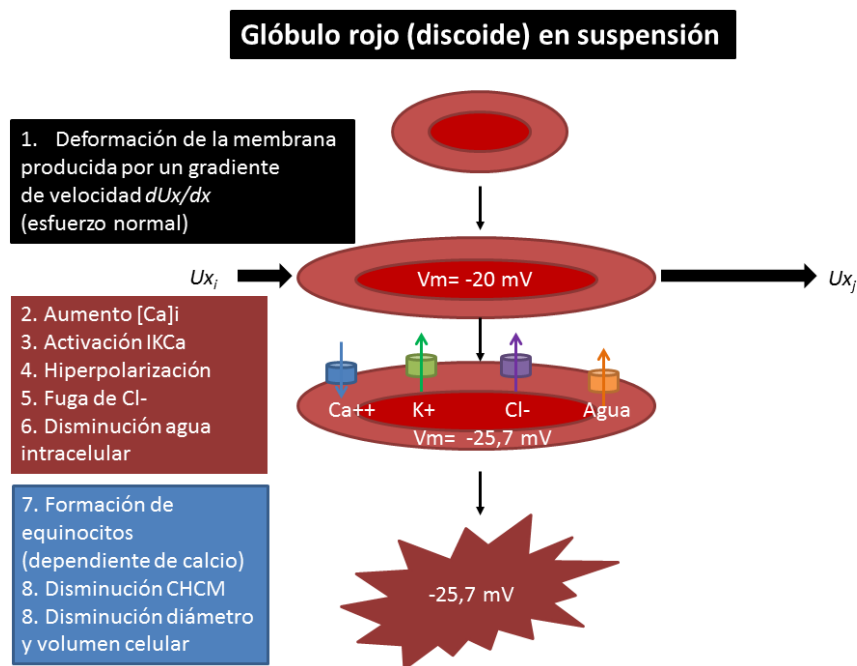
Normalmente, los glóbulos rojos son células en suspensión expuestas al estrés mecánico de la circulación. La separación hidrodinámica SPLIT y la centrifugación imponen fuerzas hidrodinámicas (esfuerzo cortante y normal) que, bajo los parámetros de operación habituales, (tasa de flujo y aceleración centrífuga), se cuantificaron en el intervalo de $7,9 \times 10^{-8}$ a $4,77 \text{ N/m}^2$ para esfuerzo cortante y $1,1$ a $79,1 \text{ kW/m}^3$ para máxima tasa de disipación de energía. Estas magnitudes se correlacionan de manera directa con el daño sub-lethal, medido como alteraciones morfológicas y funcionales.

Las células que se encuentran en suspensión pueden rotar cuando son expuestas a esfuerzo cortante, lo que disminuye la deformación de la membrana y cambia la superficie expuesta. En cambio, cuando son expuestas a esfuerzo normal la membrana experimenta elongación, que por encima de cierto valor produce daño celular (García-Briones and Chalmers, 1994). La magnitud del esfuerzo cortante puede descomponerse en varios componentes, uno de los cuales es el esfuerzo normal. Por su parte, la tasa de disipación de energía incluye en sí misma ambos tipos de esfuerzo (Bird et al., 2007).

La deformación de membrana generada por las fuerzas hidrodinámicas resulta en glóbulos rojos en entrada de calcio ionizado desde el medio extracelular (Soldati et al., 1997). El aumento en la concentración citosólica de calcio, a su vez activa corrientes de potasio dependientes de calcio que llevan a hiperpolarización de la membrana (Bennekou et al., 2003), a través del denominado canal Gardos (IK_{Ca}), fenómeno que puede ser inhibido mediante la adición de quelantes de calcio al medio extracelular (Dyrda et al., 2010). Establecida una carga neta más negativa del citosol, se favorece la fuga de cloruro y deshidratación celular (Gedde and Huestis, 1997), que se ve reflejada en menor volumen celular (Dyrda et al., 2010).

Por otro lado, el aumento del calcio citosólico también altera la distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática, consistente en externalización de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Lin et al., 1994). Este fenómeno, además de ser indicativo de procesos de muerte celular programada, resulta en formación de espículas y vesiculación de la membrana, que se refleja en formación de equinocitos (Daleke, DL and Huestis, WH, 1989). Los equinocitos son formas anómalas caracterizadas por menor volumen celular (células crenadas), con propiedades reológicas alteradas, comparadas con los discocitos normales (Reinhart and Chien, 1986) (Ilustración 27).

Ilustración 27. Modelo teórico propuesto sobre el efecto del estrés mecánico de la separación (SPLITT y centrifugación) sobre glóbulos rojos humanos.



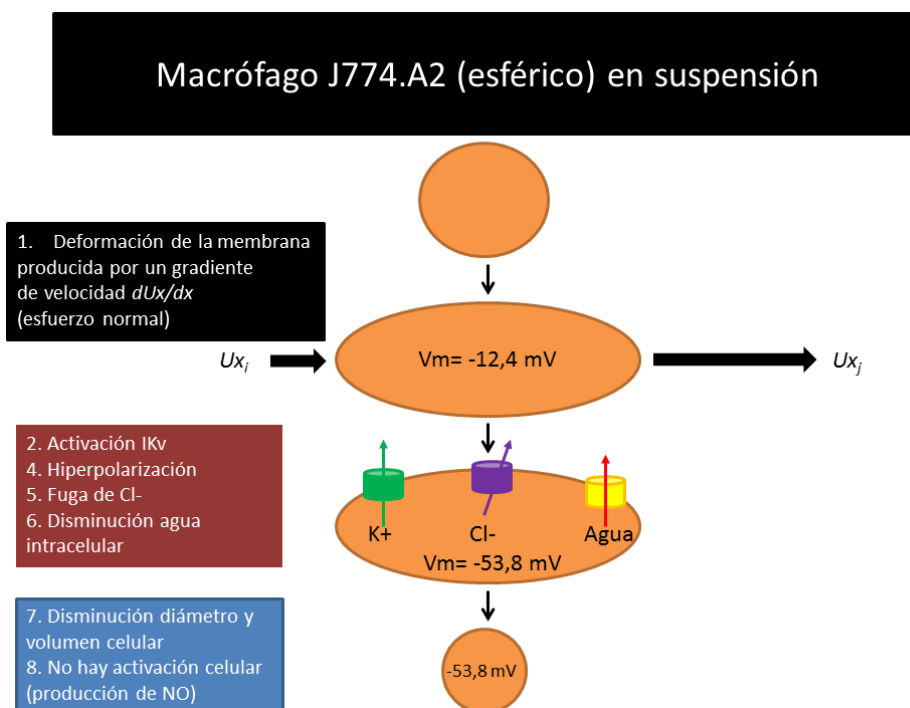
7.2 Células adherentes manipuladas en suspensión: macrófagos de ratón J774.A2

La respuesta de macrófagos antes las fuerzas hidrodinámicas de la separación difiere un poco en la medida que se trata de células adherentes para las cuales el proceso de disociación mecánica para ser mantenidas en suspensión y de ser diluidas son eventos estresantes que generan hiperpolarización leve. Además, por tratarse de células que estando suspendidas adoptan forma casi esférica no fue posible detectar cambios en la apariencia (cantidad de prolongaciones de membrana, por ejemplo) después de la separación mediante microscopía de luz, pero sí disminución de diámetro.

En macrófagos J774, el potencial de membrana se hace cada vez más negativo de acuerdo con el tiempo de adherencia por aumento de corrientes de potasio K_v (Gallin and Sheehy, 1985; McKinney and Gallin, 1990). Por lo tanto, cuando son cultivadas en suspensión la densidad de estas corrientes es baja y se observa despolarización (-12,4 mV en promedio) (Young et al., 1983; McKinney and Gallin, 1990). En estas condiciones, el efecto de las fuerzas hidrodinámicas es hiperpolarizante y

proporcional. Con fuerzas de pequeña magnitud, como las generadas durante el proceso de dilución de la muestra, la hiperpolarización es leve. Con fuerzas de mayor magnitud como las generadas con separación SPLITT y con centrifugación, el efecto es más intenso (-53,8 mV). Es interesante que el potencial alcanzado durante las separaciones es similar al reportado por nuestro grupo para J774.A1 adherentes (Forero et al. 1999) y que se atribuye a la función de canales de potasio voltaje dependientes Kv1.3 (Vicente et al. 2003). Este fenómeno no se observa en presencia de 4-aminopiridina (4-AP), un fármaco inhibidor de canales de potasio Kv, así como tampoco reducción del diámetro y volumen celular. Con un potencial hiperpolarizado, queda establecida la fuerza electromotriz para la fuga de cloruro y posiblemente deshidratación celular, como lo sugiere la disminución del diámetro y volumen celular. Dado que la presencia de 4-AP también inhibe los cambios de diámetro y volumen, se puede pensar que la activación de canales de potasio y la hiperpolarización de la membrana son condiciones necesarias para que se produzcan tales cambios en las dimensiones celulares. Aunque se documentó que el estrés mecánico hiperpolariza la membrana, no se observó compromiso de la función celular específica de estos macrófagos en términos de activación celular, toda vez que no se detectó aumento de producción de óxido nítrico (NO) (Ilustración 28).

Ilustración 28. Modelo teórico propuesto sobre el efecto del estrés mecánico de la separación (SPLITT y centrifugación) sobre macrófagos de ratón J774.A2 (células normalmente adherentes, que han sido cultivadas en suspensión durante 12 horas).



8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

- La separación hidrodinámica SPLITT y la centrifugación resultan en cambios morfológicos en glóbulos rojos, dados por formación de equinocitos, disminución de diámetro y volumen celular, e incremento del índice de esfericidad.
- El daño sub-letal (medido como índice morfológico) desencadenado por la separación celular en glóbulos rojos se relaciona de manera directa con la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas y presión impuestas.
- El estrés mecánico impuesto por la separación celular resulta en glóbulos rojos en hiperpolarización de la membrana por procesos dependientes de la concentración extracelular de calcio ionizado y en consecuencia, se genera disminución de diámetro y volumen celular. Así mismo se observó disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media, lo que sugiere que ocurre vesiculación de la membrana.
- La separación hidrodinámica SPLITT y la centrifugación resultan en cambios morfológicos en macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2, dados por disminución de diámetro y volumen celular, los cuales se relacionan de manera directa con la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas y presión impuestas.
- La separación hidrodinámica SPLITT y la centrifugación resultan en hiperpolarización de la membrana de macrófagos de ratón de la línea celular J774.A2, mediada por canales potasio Kv, pero no resulta en activación celular (función celular específica) determinada mediante producción de óxido nítrico.

8.2 Recomendaciones

- El medio de suspensión utilizado para la dilución de muestras antes de un procedimiento de separación debe tener una composición iónica, pH y osmolaridad similares a las del líquido extracelular normal del tipo celular específico y deberían incluir también aditivos protectores contra el estrés hidrodinámico, tales como plasma, suero o albúmina.
- Aunque la separación hidrodinámica SPLITT se caracteriza por imponer menor estrés mecánico con respecto a la centrifugación, es necesario plantear cambios de diseño. Tanto los canales SPLITT como otros dispositivos para separación por campo y flujo (*field and flow-based separations*) utilizan conectores de entrada y de salida de diámetro reducido y dispuestos en ángulo recto, que de acuerdo con los resultados de dinámica de fluidos aquí presentados, son los de mayor estrés mecánico. Por lo tanto, para este tipo de dispositivos se recomienda disminuir el ángulo de orientación de estos conectores, con respecto a la zona de transporte (menor a 90°). Así mismo, se recomienda manipular el diámetro de los conectores (área transversal) y la tasa de flujo, con el fin de disminuir la máxima velocidad alcanzada y así el estrés mecánico impuesto.
- Teniendo en cuenta los efectos benéficos observados con la adición de EGTA al medio de suspensión de glóbulos rojos, se sugiere considerar la utilización de éste u otros quelantes de calcio durante los procedimientos de separación celular.
- En el presente estudio se analizaron las fuerzas hidrodinámicas impuestas por la separación SPLITT y la centrifugación en términos de velocidad máxima, tiempo de exposición a la misma, gradiente de cizalla, esfuerzo cortante y máxima EDR. Aunque también se calculó la presión generada por ambas técnicas de separación y se encontró correlación entre ésta y el daño sub-letal, debe tenerse en cuenta que durante separación SPLITT los valores reales de presión en el interior del sistema dependerá no sólo de la tasa de flujo sino también de las dimensiones de las jeringas y los conectores empleados. Por lo tanto, se recomienda realizar mediciones directas de presión durante separación hidrodinámica SPLITT con el fin de relacionar esta variable con el daño celular.

Referencias

Allan, D., Billah, M.M., Finean, J.B., and Michell, R.H. (1976). Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular Ca^{2+} . *Nature* 261, 58–60.

American Association of Blood Banks (2012). Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 28th edition (Bethesda, Md.: American Association of Blood Banks).

Arnadóttir, J., and Chalfie, M. (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 111–137.

Assidjo, N.E., Chianéa, T., Clarot, I., Dreyfuss, M.F., and Cardot, P.J. (1999). Osmolarity effects on red blood cell elution in sedimentation field-flow fractionation. *J. Chromatogr. Sci.* 37, 229–236.

Beckman Coulter: Technical Application Information COULTER® 3-D VCS Technology.

Benincasa, M.-A., Moore, L.R., Williams, P.S., Poptic, E., Carpino, F., and Zborowski, M. (2005). Cell sorting by one gravity SPLITT fractionation. *Anal. Chem.* 77, 5294–5301.

Bennekou, P., Kristensen, B.I., and Christophersen, P. (2003). The human red cell voltage-regulated cation channel. The interplay with the chloride conductance, the Ca^{2+} -activated K^{+} channel and the Ca^{2+} pump. *J. Membr. Biol.* 195, 1–8.

Bird, R.B., Stewart, W.E., and Lightfoot, E.N. (2007). *Transport Phenomena* (John Wiley & Sons).

Black, K.L., and Jones, R.D. (1976). The Discocyte-Echinocyte Transformation as an Index of Human Red Cell Trauma. *Ohio J Sci* 76, 225–230.

Bluestein, M., and Mockros, L. (1969). Hemolytic effects of energy dissipation in flowing blood. *Med. Biol. Eng. Comput.* 7, 1–16.

Brecher, G., and Bessis, M. (1972). Present Status of Spiculed Red Cells and Their Relationship to the Discocyte-Echinocyte Transformation: A Critical Review. *Blood* 40, 333–344.

Brodkey, R. (2004). *The Phenomena Of Fluid Motions* (Brodkey Publishing).

Brown, R.I. (1989). The Physics of Continuous Flow Centrifugal Cell Separation. *Artif. Organs* 13, 4–20.

Canham, P.B., and Burton, A.C. (1968). Distribution of Size and Shape in Populations of Normal Human Red Cells. *Circ. Res.* 22, 405–422.

-
- Chianéa, T., Cardot, P.J., Assidjo, E., Monteil, J., Clarot, I., and Krausz, P. (1999). Field- and flow-dependent trapping of red blood cells on polycarbonate accumulation wall in sedimentation field-flow fractionation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* *734*, 91–99.
- Chianéa, T., Assidjo, N.E., and Cardot, P.J.P. (2000). Sedimentation field-flow-fractionation: emergence of a new cell separation methodology. *Talanta* *51*, 835–847.
- Chisti, Y. (2001). Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit. Rev. Biotechnol.* *21*, 67–110.
- Croughan, M.S., Sayre, E.S., and Wang, D.I.C. (1989). Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* *33*, 862–872.
- Daleke, DL, and Huestis, WH (1989). Erythrocyte morphology reflects the transbilayer distribution of incorporated phospholipids. *J. Cell Biol.* *108*, 1375–1385.
- Dyrda, A., Cytlak, U., Ciuraszkiewicz, A., Lipinska, A., Cueff, A., Bouyer, G., Egee, S., Bennekou, P., Lew, V.L., and Thomas, S.L.Y. (2010). Local Membrane Deformations Activate Ca²⁺-Dependent K⁺ and Anionic Currents in Intact Human Red Blood Cells. *PLoS ONE* *5*, 1–14.
- Elias, C.B., Desai, R.B., Patole, M.S., Joshi, J.B., and Mashelkar, R.A. (1995). Turbulent shear stress—Effect on mammalian cell culture and measurement using laser Doppler anemometer. *Chem. Eng. Sci.* *50*, 2431–2440.
- Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., Vono, R., Turrini, F., and Low, P.S. (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* *117*, 5998–6006.
- Forero, M.E., Marín, M., Corrales, A., Llano, I., Moreno, H., and Camacho, M. (1999). Leishmania amazonensis Infection Induces Changes in the Electrophysiological Properties of Macrophage-like Cells. *J. Membr. Biol.* *170*, 173–180.
- Fuh (2000). Split-flow thin fractionation. *Anal. Chem.* *72*, 266A – 271A.
- Fuh, C.B., and Giddings, J.C. (1995). Isolation of human blood cells, platelets, and plasma proteins by centrifugal SPLITT fractionation. *Biotechnol. Prog.* *11*, 14–20.
- Fuh, C.B., Trujillo, E.M., and Giddings, J.C. (1995). Hydrodynamic Characterization of SPLITT Fractionation Cells. *Sep. Sci. Technol.* *30*, 3861–3876.
- Gallin, E.K., and Sheehy, P.A. (1985). Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line J774.1. *J. Physiol.* *369*, 475–499.
- Garcia-Briones, M.A., and Chalmers, J.J. (1994). Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnol. Bioeng.* *44*, 1089–1098.
- Gedde, M.M., and Huestis, W.H. (1997). Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophys. J.* *72*, 1220–1233.
- Giddings, J.C. (1985). A System Based on Split-Flow Lateral-Transport Thin (SPLITT) Separation Cells for Rapid and Continuous Particle Fractionation. *Sep. Sci. Technol.* *20*, 749–768.
- Glynn, I.M. (1956). Sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol.* *134*, 278–310.

Godoy, R. (2008). Lethal and sub-lethal effects of hydrodynamic forces on animal cell culture. The Ohio State University.

Godoy-Silva, R., Chalmers, J.J., Casnocha, S.A., Bass, L.A., and Ma, N. (2009). Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng.* *103*, 1103–1117.

Gossett, D.R., Weaver, W.M., Mach, A.J., Hur, S.C., Tse, H.T.K., Lee, W., Amini, H., and Carlo, D.D. (2010). Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* *397*, 3249–3267.

Graham, M. (2003). The Coulter Principle: Foundation of an Industry. *J. Assoc. Lab. Autom.* *8*, 72–81.

Grissmer, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Karmilowicz, M.J., Auperin, D.D., and Chandy, K.G. (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* *45*, 1227–1234.

Haswell, E.S., Phillips, R., and Rees, D.C. (2011). Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? *Structure* *19*, 1356–1369.

Hochmuth, R.M., Mohandas, N., Spaeth, E.E., Williamson, J.R., Blackshear, P.L., and Johnson, D.W. (1972). Surface adhesion, deformation and detachment at low shear of red cells and white cells. *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organs* *18*, 325–334.

Hoffman, J.F., and Laris, P.C. (1974). Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* *239*, 519–552.

Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., and Pedersen, S.F. (2009). Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiol. Rev.* *89*, 193–277.

Hoyos, M. (2003). Separación hidrodinámica de macromoléculas, partículas y células. *Acta Biológica Colomb.* *8*, 11–24.

Hoyos, M., Niño, A., Camargo, M., Díaz, J.C., León, S., and Camacho, M. (2009). Separation of *Leishmania*-infected macrophages by step-SPLITT fractionation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 3712–3718.

Hu, W., Berdugo, C., and Chalmers, J.J. (2011). The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology* *63*, 445–460.

Hülscher, M., Pauli, J., and Onken, U. (1990). Influence of protein concentration on mechanical cell damage and fluidodynamics in airlift reactors for mammalian cell culture. *Food Biotechnol.* *4*, 157–166.

Jay, A.W. (1975). Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys. J.* *15*, 205–222.

Jiménez, J.F., and Naranjo, J.A. (1993). Flujos Hele Shaw: un siglo de aplicaciones. *Av. En Recur. Hidraul.* *1*, 59–67.

Johnson, R.M. (1994). Membrane stress increases cation permeability in red cells. *Biophys. J.* *67*, 1876–1881.

Johnson, R.M., and Tang, K. (1992). Induction of a Ca(2+)-activated K⁺ channel in human erythrocytes by mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta* *1107*, 314–318.

Kameneva, M.V., Antaki, J.F., Yeleswarapu, K.K., Watach, M.J., Griffith, B.P., and Borovetz, H.S. (1997). Plasma protective effect on red blood cells exposed to mechanical stress. *ASAIO J.* *43*, M571–M575.

Kang, J., and Park, J.-K. (2005). Technical paper on Microfluidic devices – Cell separation technology. *Asia Pac. Biotech News* *9*, 1135–1146.

Klapperstück, T., Glanz, D., Klapperstück, M., and Wohlrab, J. (2011). Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytometry A* *79A*, 1023–1023.

Larsen, F.L., Katz, S., Roufogalis, B.D., and Brooks, D.E. (1981). Physiological shear stresses enhance the Ca²⁺ permeability of human erythrocytes. *Nature* *294*, 667–668.

Leverett, L.B., Hellums, J.D., Alfrey, C.P., and Lynch, E.C. (1972). Red Blood Cell Damage by Shear Stress. *Biophys. J.* *12*, 257–273.

Lin, S., Yang, E., and Huestis, W.H. (1994). Relationship of phospholipid distribution to shape change in Ca(2+)-crenated and recovered human erythrocytes. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 7337–7344.

Lu, P.C., Lai, H.C., and Liu, J.S. (2001). A reevaluation and discussion on the threshold limit for hemolysis in a turbulent shear flow. *J. Biomech.* *34*, 1361–1364.

Luo, Y., Cook, E., Fries, B.C., and Casadevall, A. (2006). Phagocytic efficacy of macrophage-like cells as a function of cell cycle and Fcγ receptors (FcγR) and complement receptor (CR)3 expression. *Clin. Exp. Immunol.* *145*, 380–387.

Ma, N., Koelling, K.W., and Chalmers, J.J. (2002). Fabrication and use of a transient contractional flow device to quantify the sensitivity of mammalian and insect cells to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* *80*, 428–437.

MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323–350.

Martin, D.K., Bootcov, M.R., Campbell, T.J., French, P.W., and Breit, S.N. (1995). Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines. *J. Membr. Biol.* *147*, 305–315.

McKinney, L.C., and Gallin, E.K. (1990). Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. *J. Membr. Biol.* *116*, 47–56.

McQueen, A., and Bailey, J.E. (1989). Influence of serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Lett.* *11*, 531–536.

Merino-Dugay, A., Cardot, P.J.P., Czok, M., Guernet, M., and Andreux, J.P. (1992). Monitoring of an experimental red blood cell pathology with gravitational field-flow fractionation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* *579*, 73–83.

Mollet, M., Godoy-Silva, R., Berdugo, C., and Chalmers, J.J. (2007). Acute hydrodynamic forces and apoptosis: a complex question. *Biotechnol. Bioeng.* *98*, 772–788.

Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1988). Considerations for Designing Bioreactors for Shear-Sensitive Culture. *Nat. Biotechnol.* *6*, 1291–1296.

Mosser, D., and Edwards, J. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.

Navarrete, I.C., Camacho, M.M., and Hoyos, M. (2013). Modelo físico de los parámetros y efectos hidrodinámicos involucrados en una separación óptima de células usando una técnica campo-flujo (S-SPLITT). Tesis de Maestría en Ciencias - Física. Universidad Nacional de Colombia.

Niño A, and Camacho M (2003). Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. Tesis de pregrado en Biología. Universidad Nacional de Colombia.

Nordon, R.E., and Schindhelm, K. (1999). 11 - Cell Separation. In *Ex Vivo Cell Therapy*, K. Schindhelm, and R. Nordon, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 215–243.

Radisic, M., Iyer, R.K., and Murthy, S.K. (2006). Micro- and nanotechnology in cell separation. *Int. J. Nanomedicine* *1*, 3–14.

Ramirez, O.T., and Mutharasan, R. (1992). Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism. *Biotechnol. Prog.* *8*, 40–50.

Randriamampita, C., and Trautmann, A. (1987). Ionic channels in murine macrophages. *J. Cell Biol.* *105*, 761–769.

Reinhart, W.H., and Chien, S. (1986). Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* *67*, 1110–1118.

Sakota, D., Sakamoto, R., Sobajima, H., Yokoyama, N., Waguri, S., Ohuchi, K., and Takatani, S. (2008). Mechanical Damage of Red Blood Cells by Rotary Blood Pumps: Selective Destruction of Aged Red Blood Cells and Subhemolytic Trauma. *Artif. Organs* *32*, 785–791.

Sakota, D., Sakamoto, R., Yokoyama, N., Kobayashi, M., and Takatani, S. (2009). Glucose Depletion Enhances Sensitivity to Shear Stress-induced Mechanical Damage in Red Blood Cells by Rotary Blood Pumps. *Artif. Organs* *33*, 733–739.

Sallam, A.M., and Hwang, N.H. (1984). Human red blood cell hemolysis in a turbulent shear flow: contribution of Reynolds shear stresses. *Biorheology* *21*, 783–797.

Seidl, J., Knuechel, R., and Kunz-Schughart, L. (1999). Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation. *Cytometry* *36*, 102–111.

Sethu, P., Moldawer, L.L., Mindrinos, M.N., Scumpia, P.O., Tannahill, C.L., Wilhelmy, J., Efron, P.A., Brownstein, B.H., Tompkins, R.G., and Toner, M. (2006). Microfluidic isolation of leukocytes from whole blood for phenotype and gene expression analysis. *Anal. Chem.* *78*, 5453–5461.

Shapiro, H.M. (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* *21*, 271–279.

Sharpe, P.T. (1988). *Methods of Cell Separation* (Elsevier).

Shivashankar, G.V. (2011). Mechanosignaling to the cell nucleus and gene regulation. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 361–378.

Shohet, S.B., and Haley, J.E. (1973). Red Cell Membrane Shape and Stability : Relation to Cell Lipid Renewal Pathways and Cell ATP. In *Red Cell Shape*, M. Bessis, R.I. Weed, and P.F. Leblond, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 41–50.

Soldati, L., Spaventa, R., Vezzoli, G., Zerbi, S., Adamo, D., Caumo, A., Rivera, R., and Bianchi, G. (1997). Characterization of Voltage-Dependent Calcium Influx in Human Erythrocytes by fura-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 549–554.

Sowemimo-Coker, S.O. (2002). Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus. Med. Rev.* 16, 46–60.

Sroka, J., Kordecka, A., Włosiak, P., Madeja, Z., and Korohoda, W. (2009). Separation methods for isolation of human polymorphonuclear leukocytes affect their motile activity. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 531–539.

Stanciu, L.A., Shute, J., Holgate, S.T., and Djukanović, R. (1996). Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *J. Immunol. Methods* 189, 107–115.

Tomlinson, M.J., Tomlinson, S., Yang, X.B., and Kirkham, J. (2012). Cell separation: Terminology and practical considerations. *J. Tissue Eng.* 4.

Urbina, A, and Palomino F (2008). Efecto del almacenamiento en banco de sangre sobre la capacidad madurativa de los reticulocitos in vitro. Tesis de Maestría en Fisiología. Universidad Nacional de Colombia.

Vachiéry, N., Totté, P., Balcer, V., Martinez, D., and Bensaid, A. (1999). Effect of isolation techniques, in vitro culture and IFN γ treatment on the constitutive expression of MHC Class I and Class II molecules on goat neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 19–32.

Velasco, K, and Cortés, G (2009). Características de solubilidad de proteínas reconocidas por anticuerpos monoclonales en un compartimiento exclusivo de Plasmodium falciparum. Tesis de pregrado en Biología. Universidad Nacional de Colombia.

Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sánchez-Tilló, E., López-Iglesias, C., Soler, C., Solsona, C., Celada, A., and Felipe, A. (2003). Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J. Biol. Chem.* 278, 46307–46320.

Vicente, R., Escalada, A., Soler, C., Grande, M., Celada, A., Tamkun, M.M., Solsona, C., and Felipe, A. (2005). Pattern of Kv beta subunit expression in macrophages depends upon proliferation and the mode of activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 4736–4744.

Waugh, R.E., Narla, M., Jackson, C.W., Mueller, T.J., Suzuki, T., and Dale, G.L. (1992). Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 79, 1351–1358.

White, C.R., and Frangos, J.A. (2007). The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1459–1467.

Willekens, F.A., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y., Bos, H., Bosman, I, Bos, A., Verkleij, A.J., and Werre, J.-M. (2003). Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* *101*, 747–751.

Wong, P. (1999). A Basis of Echinocytosis and Stomatocytosis in the Disc–Sphere Transformations of the Erythrocyte. *J. Theor. Biol.* *196*, 343–361.

Yang, X.-S., and Kamino, K. (1997). Photometric Assessment of Volume Changes Coupled with Membrane Potential in Valinomycin-Incorporated Red Blood Cells. *Jpn. J. Physiol.* *47*, 217–230.

Young, J.D., Unkeless, J.C., Kaback, H.R., and Cohn, Z.A. (1983). Macrophage membrane potential changes associated with gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 1357–1361.

Ypey, D.L., and Clapham, D.E. (1984). Development of a delayed outward-rectifying K⁺ conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 3083–3087.

Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B.F., and Gerlach, E. (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J. Immunol. Methods* *200*, 173–179.

Zhang, Z., Chisti, Y., and Moo-young, M. (1995). Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension. *J. Biotechnol.* *43*, 33–40.