

9. Centrifugación. Estudio del hematocrito

Isaac Túnez Fiñana, María del Carmen Muñoz, Pedro Montilla López

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n,
14004 -Córdoba

RESUMEN

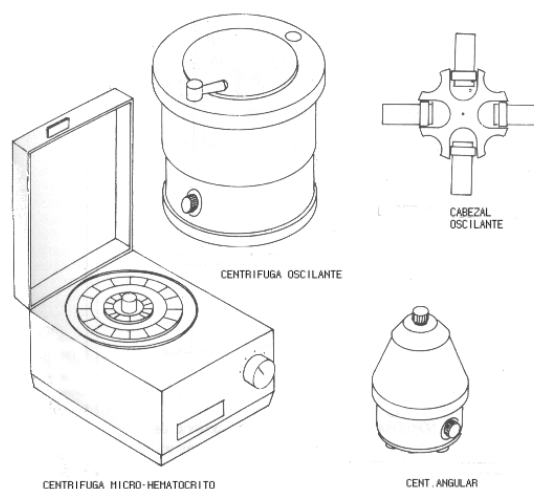
Las partículas en disolución pueden sufrir alteración espacial, es decir, pueden cambiar de posición con el tiempo. Esto puede ser debido a procesos de *difusión* (en un gradiente de concentración, las partículas tienden a ir de la zona de mayor concentración a la de menor concentración) o bien a procesos de *sedimentación*. En las siguientes páginas se exponen los principales conceptos teóricos y matemáticos sobre la centrifugación, así como su aplicación y uso, teniendo como objetivo principal el conocimiento básico de esta técnica.

Palabras Clave: Centrífuga, plasma, sangre, sedimentación

Abreviaturas. rpm: revoluciones por minuto

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La centrífuga es una máquina diseñada para separar partículas de una disolución sea cual sea la naturaleza de las mismas. Básicamente consiste en un motor eléctrico que lleva unido un vástago, que a su vez soporta un cabezal o rotor donde se colocan los recipientes con las muestras. Existen dos tipos fundamentales de cabezales o rotores, basculantes o de ángulo fijo.



La centrifugación es una técnica de transporte basada en el movimiento de las partículas, suspendidas en un medio líquido específico, impulsadas por una fuerza denominada centrífuga, que tiende a desplazarlas hacia fuera del centro de rotación. Tanto la viscosidad de la disolución-muestra (esto es de gran interés para las aplicaciones analíticas) como las propiedades físicas de las partículas afectarán a la sedimentación individual de las mismas.

Este procedimiento separa fundamentalmente las partículas de acuerdo con su masa y su forma. La fuerza centrífuga depende además, de la velocidad y radio de giro. El radio de giro (x) es la distancia desde el centro de rotación hasta el extremo del recipiente donde está contenida la muestra. El valor de la aceleración centrífuga, en función de la velocidad de giro ω , viene dado por la ecuación:

$$G = \omega^2 x = \frac{4\pi^2 (rpm)^2}{3600} x = 0,01966 (rpm)^2 x$$

donde x es el radio de giro y rpm la velocidad en revoluciones por minuto.

El objetivo principal será el conocimiento correcto de los conceptos básicos sobre centrifugación, así como de los diferentes tipos, utilidades y aplicaciones de este procedimiento.

1.1 Ultracentrifugación

La ultracentrifugación fue ideada en 1923 por el bioquímico sueco Svedberg, puede alcanzar velocidades tan elevadas como 80.000 rpm, de modo que genera campos centrífugos que superan 600.000 g . La ultracentrifugación se ha convertido en una herramienta indispensable para el aislamiento de proteínas, ácidos nucleicos y partículas subcelulares.

1.1.1. Sedimentación

La velocidad a la que una partícula sedimenta en la ultracentrifugación está relacionada con su masa. La fuerza, F (sedimentación), que actúa para sedimentar una partícula de masa m , que está situada a una distancia r del centro alrededor del cual se halla girando con velocidad angular ω (en $\text{rad} \cdot \text{s}$), es la fuerza centrífuga ($m\omega^2 r$) sobre la partícula menos la fuerza de flotación ($V\omega r$) ejercida por la disolución:

$$F = m\omega^2 r - V\omega r$$

V es el volumen de la partícula y la densidad de la disolución.

La velocidad con que sedimenta una partícula, está en relación con su coeficiente de sedimentación (s). Este coeficiente es reflejo del tamaño y forma de la partícula o molécula y de él depende la velocidad con que ésta sedimenta.

1.2. Ultracentrifugación preparativa

Consiste en aislar los materiales biológicos para posteriores investigaciones bioquímicas. Los rotores preparativos contienen tubos cilíndricos para las muestras, cuyos ejes pueden ser paralelos, formar un cierto ángulo o ser perpendiculares al eje de rotación del rotor.

La sedimentación puede llevarse a cabo en una disolución de una sustancia inerte, tal como sacarosa o CsCl, en la que la concentración y por tanto la densidad de la disolución, aumentan desde la superficie hasta el fondo del tubo de centrífuga. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones, *el sedimento* y una disolución *sobrenadante* que puede separarse por decantación o aspiración. La utilización de este tipo de *gradientes de densidad*, aumenta en gran medida la capacidad de resolución de la ultracentrífuga. Según las determinaciones a realizar aplicaremos el tipo de gradiente de densidad más conveniente:

- Ultracentrifugación de zona
- Ultracentrifugación con gradiente de densidad en equilibrio

1.3. Ultracentrifugación con gradiente de densidad en equilibrio

Separa las partículas de acuerdo con sus densidades. *Este tipo de centrifugación separa mezclas cuyos componentes poseen un intervalo en sus densidades.* No solo permite la separación de varios o de todos los componentes de una mezcla en una sola vez, sino que también posibilita la realización de medidas de tipo analítico en cada uno de ellos.

El método consiste en una columna de fluido soporte cuya densidad se incrementa hacia el fondo del tubo. El fluido se confecciona con un soluto asequible de bajo peso molecular en un disolvente en el que las partículas de la mezcla puedan ser suspendidas. Existen dos técnicas basadas en este método: La centrifugación zonal y la isopícnica.

1.3.1. Ultracentrifugación zonal

Separa las partículas de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación.

La ultracentrifugación de zona separa las macromoléculas basándose ampliamente en sus masas moleculares.

1.3.2. Ultracentrifugación isopícnica

En esta técnica el gradiente de densidad de la columna viene determinado por el rango total de densidades de las partículas de la muestra. Cada partícula sedimentará en aquella posición del tubo de centrífuga en la que la densidad del gradiente sea igual a su propia densidad.

Centrifugación de una mezcla uniforme macromolecular disuelta en una disolución de un soluto denso que se difunde con rapidez, tal como CsCl.

1.4. Ultracentrifugación analítica

Difiere de la preparativa en que se utiliza fundamentalmente para el estudio de las características de sedimentación de macromoléculas y estructuras biológicas, de este modo se sacan conclusiones acerca de parámetros físico-químicos de dichos compuestos.

Se emplean rotores especiales. La aplicación más habitual en los laboratorios de bioquímica es la determinación de pesos moleculares de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos fundamentalmente), utilizándose tres métodos:

- El de velocidad de sedimentación
- El de equilibrio de sedimentación
- El de la aproximación al equilibrio de sedimentación

1.4.1. Método de velocidad de sedimentación.

Es el más habitual: la ultracentrífuga se hace funcionar a altas velocidades (70.000 rpm) lo que hace que las partículas del líquido emigren radialmente al disolvente, hacia fuera del centro de rotación, formándose así un frente de separación muy definido.

1.4.2. Método de equilibrios de sedimentación

La velocidad requerida es mucho menor (7.000-8.000 rpm). Cuando se establece un equilibrio entre la sedimentación (bajo la influencia de la fuerza centrífuga) y la difusión del material en la dirección contraria, cesa la migración neta. Así puede calcularse el peso molecular de un soluto a partir del gradiente producido en su concentración, según:

$$M = \frac{2RT \ln (c_2 / c_1)}{\omega^2 (1 - vp)(r_2^2 - r_1^2)}$$

donde: R= constante de los gases ; T = temperatura absoluta; ω = velocidad angular, p = densidad del disolvente; v = volumen específico parcial; c_1, c_2 = concentraciones del soluto a las distancias r_1, r_2 del centro de rotación).

El excesivo tiempo necesario para conseguir el equilibrio hace que se desestime este método.

1.4.3. Método de aproximación al equilibrio de sedimentación.

Al comienzo del proceso, la macromolécula está distribuida por toda la célula de manera homogénea. Al ponerse en marcha la centrífuga, hay un descenso en la densidad de la disolución en el menisco al alejarse las moléculas de él. En el descenso influye el peso molecular del compuesto, por lo que este parámetro puede calcularse de los valores del descenso de la densidad. El cálculo resulta complejo por el gran número de variables experimentales que es preciso controlar.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- Centrifuga de alta velocidad (8.000 – 12.000 rpm)
- Plastilina
- Tubos capilares de 75 mm de largo y 2 mm de diámetro interior y heparina desecada
- Lector de hematocrito

3. PROTOCOLO A REALIZAR.

- Adquirir muestra sanguínea capilar del pulpejo del dedo o del talón con el tubo capilar hasta 1-2 cm del final
- Taponar parte seca del tubo con plastilina
- Colocar en el plato de la centrifuga
- Centrifugar entre 3 y 5 min
- Leer la altura del plasma y de los paquetes de hematíes (en la misma centrifuga si la posee o en escala aparte)

El índice hematocrito es el volumen que ocupan las diferentes porciones que se forman al centrifugar un tubo de sangre previamente hecha incoagulable por la adición de oxalato potásico o citrato sódico. La parte corpuscular por ser más densa queda en el fondo del tubo, mientras que sobrenada la fracción plasmática. *La cantidad y proporción relativa de cada una de estas partes se denomina valor o índice hematocrito.*

La medición del valor hematocrito se fundamenta en la simple centrifugación de una muestra de sangre incoagulable colocada en un tubo especial (tubo hematocrito) que lleva una escala de diez divisiones y que, tras la centrifugación, permite medir la altura del volumen que ocupan los glóbulos en el fondo del tubo y la del plasma que sobrenada.

Los tubos utilizados tienen distintas formas y tamaños, según los autores que los idearon (Hedin, Hamburger, Westergren, Wintrobe, etc.). Los que son capilares permiten recoger la sangre por punción digital.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos deberán encontrarse en caso de sujetos sanos entre los siguientes rangos según sexo:

- Varón: 40,7 – 50,3%
- Mujer: 36,1 – 44,3%

A partir del índice hematocrito se puede deducir la cifra de hematíes. Si los hematíes

son de forma, tamaño y contenido en hemoglobina normal o poco alterada, la relación entre número de hematíes (Heme) e índice hematocrito (Ht) es una constante, es decir:

$$\text{Ht} \cdot K = \text{Heme}$$

o sea, que el porcentaje del paquete hematológico multiplicado por una constante nos proporciona el número de hematíes por milímetro cúbico. Capdevila ha evaluado esta constante en 110.000; así, si suponemos que el valor hematocrito de un paciente es de 40 por 100 (paquete de hematíes), si se multiplica por 110.000 da 4.400.000, que representa el nº de hematíes por milímetro cúbico.

5. DISCUSIÓN

El hematocrito es la cantidad y proporción relativa entre los glóbulos y el plasma sanguíneo. Si bien este parámetro debe ser visto a la luz del resto de los parámetros presentes en la bioquímica sanguínea y en la hematimetría junto con la sintomatología del paciente, por sí sólo puede ser ya indicativo de variaciones en las características sanguíneas. Su aumento puede indicar una reducción en el número de hematíes (anemia) y su aumento la situación opuesta (policitemia).

6. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Galindo J (1988): Centrifugación. En Lozano JA, Tudelo J (eds): "Prácticas de Bioquímica. Experimentación y Simulación", 1ª ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 17 – 24.
- González de Buitrago JM (1985): Citometría hemática y otras técnicas hematológicas. En González de Buitrago JM (ed): "Técnicas de Laboratorio Clínico", 1ª ed. Editorial Alhambra (Madrid, España), pp. 36 – 51.
- Govantes J, de Lorenzo P, Martín JJ, Martín J (1990): Sangre-Hematopoyesis. En: "Manual Morton", 6ª ed. Editorial Laboratorios Morton (Madrid, España), pp. 31 – 35.
- Stroev EA, Makarova VG (1989): Introduction to laboratory manual in biochemistry. En Stroev EZ, Makarova VG (eds): "Laboratory Manual in Biochemistry", 1ª ed. Editorial MIR Publishers Moscow (Moscú, Rusia), pp. 15 – 30.