

Efectos hemorreológicos de los glóbulos rojos y sus implicancias en la salud

► Leonardo Julio Feldman^{1a,b*}, Javier Alberto Diez^{2c}, Roberto Najle^{3d}, Alejandro Guillermo González^{4c}

¹ Médico Hematólogo.

² Lic. en Ciencias Físicas, Dr. en Física.

³ Lic. en Química Biológica, Dr. en Ciencia Animal.

⁴ Lic. en Ciencias Físicas, Dr. en Ciencias Físicas.

^a Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

^b Servicio de Hematología, Clínica Modelo, Tandil.

^c Grupo de Física de Fluidos, Instituto de Física Arroyo Seco, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

^d Laboratorio de Ecotoxicología y Biología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

* Autor para correspondencia.

Resumen

La reología es una disciplina científica que se dedica al estudio de la deformación y flujo de la materia o, más precisamente, de los fluidos. En particular, la hemorreología se ocupa del comportamiento del flujo de la sangre completa, además de la deformabilidad de los elementos individuales que la componen (es decir, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas). Debido a su importancia fisiopatológica, la medición de la deformabilidad de los glóbulos rojos ha sido el foco de numerosos estudios en las últimas décadas y en especial su rol en la regulación del suministro de O₂. El objetivo de esta revisión fue resumir la información actualmente disponible sobre la reología de la sangre, con especial énfasis en la influencia de la deformabilidad de los glóbulos rojos, destacando su relación con diversas enfermedades humanas tales como trastornos hereditarios de la membrana (esferocitosis, eliptocitosis, ovalocitosis y estomatocitosis), trastornos metabólicos (diabetes y cambios en la membrana inducidos por el estrés oxidativo) y los asociados a enfermedades críticas. Se exponen brevemente las técnicas microfluidicas que han sido identificadas como métodos de gran potencial en el desarrollo de modelos experimentales dinámicos de última generación. Su uso podría dilucidar la importancia de las alteraciones de la membrana de los eritrocitos en condiciones patológicas y las consecuencias de dichas alteraciones en la dinámica del flujo de la microcirculación.

Palabras clave: Hemorreología; Deformabilidad de glóbulos rojos; Membranopatías; Microcirculación; Métodos microfluidicos

Hemorheological effects of red blood cells and their implications in health

Abstract

Rheology is a scientific discipline dealing with the flow and deformation behavior of materials, with the materials under consideration being solids or more precisely, fluids. In particular, hemorrheology is concerned with the behaviour of the flow of whole blood and also the deformability of the individual elements that make it up (i.e. red blood cells, white blood cells and platelets). Due to its pathophysiological importance, the measurement of red blood cell deformability has been the focus of numerous studies in recent decades and in particular the role of red blood cells in the regulation of O₂ supply. The aim of this review was to summarise the currently available information on blood rheology with special emphasis on the influence of red blood cell deformability, highlighting its relationship with

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

various human diseases such as hereditary membrane disorders (e.g. spherocytosis, elliptocytosis, ovalocytosis and stomatocytosis), metabolic disorders (e.g. diabetes and membrane changes induced by oxidative stress) and those associated with critical illnesses. The microfluidic techniques that have been identified are briefly presented here as key methods to develop the state-of-the-art in dynamic experimental models to elucidate the importance of erythrocyte membrane alterations in pathological conditions as well as the role that such alterations play in the dynamics of microcirculation flow.

Keywords: Hemorrheology; Red blood cell deformability; Membranopathies; Microcirculation; Microfluidic methods

Efeitos hemorreológicos das hemácias e suas implicações na saúde

Resumo

Reologia é uma disciplina científica que se dedica ao estudo da deformação e fluxo da matéria ou, mais especificamente, dos fluidos. A hemorreologia trata, em particular, do comportamento do fluxo do sangue total, além da deformabilidade dos elementos individuais que o compõem (ou seja, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas). Devido à sua importância fisiopatológica, a mensuração da deformabilidade das hemácias tem sido foco de inúmeros estudos nas últimas décadas e, principalmente, o papel das hemácias na regulação do suprimento de O_2 . O objetivo desta revisão era resumir as informações atualmente disponíveis sobre a reologia do sangue com ênfase especial na influência da deformabilidade dos glóbulos vermelhos, destacando sua relação com várias doenças humanas, como distúrbios hereditários da membrana (esferocitose, eliptocitose, ovalocitose e estomatocitose), distúrbios metabólicos (diabetes e alterações na membrana induzidas por estresse oxidativo) e aqueles associados a doenças críticas. Técnicas microfluídicas são brevemente discutidas, as quais têm sido identificadas como métodos de grande potencial no desenvolvimento de modelos experimentais dinâmicos de última geração. Seu uso poderia elucidar a importância das alterações da membrana eritrocitária nas condições patológicas e as consequências de tais alterações na dinâmica do fluxo da microcirculação.

Palavras-chave: Hemorreologia; Deformabilidade dos glóbulos vermelhos; Membranopatias; Microcirculação; Métodos microfluídicos

Hemorreologia

La reología es una disciplina científica que se dedica al estudio de las leyes que rigen la deformación y el flujo de la materia o, más precisamente, de los fluidos complejos. Un fluido es capaz de deformarse continuamente cuando está sujeto a esfuerzos y carece de fuerzas restitutivas internas que lo vuelvan a su forma original, a diferencia de los sólidos que no se deforman o sólo lo hacen hasta cierto punto. En un sólido elástico hay fuerzas restitutivas que tienden a recuperar la forma original.

Los materiales se deforman y/o fluyen debido a la suma de las fuerzas aplicadas a los mismos. Entre dichas fuerzas importan las llamadas superficiales que son debidas a la interacción entre las moléculas cercanas a una superficie (que no es necesariamente una frontera del material, sino también una superficie interna en él). En el estudio del grado de deformación (o flujo) de un material deben considerarse los esfuerzos (1), los cuales poseen dos componentes: (i) esfuerzo de corte, de cizalladura o tangencial, que es la fuerza por unidad de área

que actúa paralelamente a la superficie y (ii) la presión o esfuerzo normal que es la fuerza por unidad de área que actúa perpendicularmente a la superficie. Se acostumbra medir ambos tipos de esfuerzos en mPa (milipascales).

En el estudio de los flujos es importante considerar la tasa de deformación; esto es la variación espacial de la velocidad. Esta da una idea de la rapidez con la que se deforma una porción infinitesimal del material, y se mide en 1/s. Finalmente, la viscosidad se define como el cociente entre el esfuerzo tangencial y la tasa de deformación y suele medirse en milipascales por segundo (mPa/s) que es equivalente al centipoise (cP).

Desde el punto de vista reológico, los líquidos pueden dividirse en dos grupos principales:

1. Los líquidos newtonianos son aquellos en los que los esfuerzos tangenciales varían linealmente con la tasa de deformación. La viscosidad, por lo tanto, resulta ser una constante independiente de la tasa de deformación en estos líquidos. Puede depender, sin embargo, de otros parámetros como la temperatura.

2. En los líquidos no newtonianos, en cambio, la relación entre las tasas de deformación y los esfuerzos no está dada por una constante y, por lo tanto, su viscosidad depende de la tasa de deformación a la que está fluyendo.

Además de dividir a los fluidos en newtonianos y no newtonianos es importante clasificar a los flujos resultantes en laminares y turbulentos. Para entender estos conceptos es útil recordar que en un tubo de diámetro y longitud constante la resistencia al flujo depende del tipo de fluido y de las condiciones de flujo dentro del tubo. Para un flujo lento, la diferencia de presión entre dos puntos a lo largo del tubo es proporcional a la velocidad de dicho flujo, y las partículas líquidas pueden moverse suavemente en planos adyacentes o láminas paralelas a la pared del tubo. Este tipo de flujo se denomina laminar (2). Con el aumento de la velocidad aparece una tendencia a que el flujo se desplace en patrones irregulares, haciendo que el movimiento de las partículas se vuelva caótico. Este flujo se denomina turbulento y su grado de turbulencia aumenta con el caudal (3).

Cuando un material, bajo la acción de estos esfuerzos, sufre una deformación finita y pequeña (en vez de fluir), se dice que presenta propiedades elásticas. En estos casos, la magnitud de la deformación es proporcional al esfuerzo aplicado y la constante de proporcionalidad es el coeficiente de rigidez, el cual se mide en mPa. En general, un material presenta una combinación de comportamientos viscosos y elásticos que dependen de la rapidez de la deformación. Todos estos factores contribuyen a la complejidad reológica de la sangre.

Desde un punto de vista biológico, la sangre puede considerarse como un tejido que comprende varios tipos de células y un material líquido intercelular (plasma). Aunque la viscosidad de la sangre total depende de muchos factores, como la viscosidad del plasma, la concentración y calidad de los glóbulos blancos y plaquetas, esta revisión se enfoca principalmente en la participación de los glóbulos rojos (GRs). Los GRs son los elementos más importantes desde el punto de vista reológico debido a su abundancia (4) (5). Por otra parte, las propiedades reológicas de la sangre completa tienen relevancia clínica ya que se ha demostrado que éstas pueden alterarse en diversos estados patológicos. La sangre puede estudiarse como un líquido de dos fases; esto es, como una suspensión sólido-líquido en la que las células serían la fase sólida. Sin embargo, también puede ser considerada como una emulsión en la que el líquido del interior de los GRs formaría las micelas.

La sangre, al estar compuesta de células que poseen diferentes propiedades elásticas, no solamente presenta efectos ligados a la viscosidad, sino también otros relacionados a la elasticidad. En suma, este líquido complejo manifiesta propiedades viscoelásticas en ciertos casos y, por lo tanto, la hemorreología debe ocuparse tanto del

comportamiento del flujo de la sangre completa como de la deformabilidad de los elementos que la componen.

El plasma es un fluido newtoniano y su viscosidad está estrechamente relacionada con el contenido de proteínas. Cambios fisiológicamente significativos en el plasma pueden alterar su viscosidad, por ejemplo, al variar la concentración de los reactantes de fase aguda.

En cambio, la sangre entera se considera una suspensión no newtoniana y su fluidez depende de las propiedades reológicas combinadas del plasma y los componentes celulares. La sangre normal muestra un comportamiento de adelgazamiento ante esfuerzos de corte (*shear thinning*). Este tipo de comportamiento asegura que a bajas velocidades de corte o esfuerzo de corte, la viscosidad de la sangre es alta y disminuye a un valor mínimo bajo fuerzas de corte elevadas (6). Además, en éstasis, la sangre normal tiene un esfuerzo mínimo de fluencia (o esfuerzo umbral) de aproximadamente 2 a 4 mPa (5), es decir, la sangre sólo puede fluir ante esfuerzos aplicados mayores a este valor. Las variaciones de la fluidez de la sangre influyen en gran medida en la perfusión de los tejidos (4).

Como se dijo previamente, los GRs afectan la viscosidad. En efecto, se observa una relación de crecimiento exponencial de ésta con el hematocrito (Hto). Para valores del Hto menores del 60%, la viscosidad depende además de la tasa de deformación y su crecimiento es más significativo cuanto más alta es dicha tasa (Fig. 1). Cuando el Hto supera el 60%, se produce una disminución significativa de la perfusión tisular (7).

La deformabilidad de los GRs, es decir, su comportamiento bajo esfuerzos de corte, influye fuertemente en la fluidez de la sangre. Los GRs normales son altamente deformables bajo cizallamiento y se orientan con las líneas de flujo. Sin embargo, durante el estrés inflamatorio, los GRs tienden a agregarse en conjuntos lineales como pilas de monedas (*rouleaux*). El fibrinógeno y otros reactantes de fase aguda en el plasma estabilizan estos agregados, aumentando significativamente la viscosidad de la sangre (8).

Debido a su deformabilidad, los GRs poseen la capacidad de atravesar capilares más pequeños que su diámetro y así desempeñar su papel como portadores de gases entre la sangre y los tejidos (9). Diversas patologías afectan la deformabilidad de los eritrocitos, entre ellas las alteraciones de la hemoglobina, como la anemia de células falciformes (10) o la talasemia (11) y los trastornos hereditarios de la membrana de los GRs (12). Además, se han reportado alteraciones de la deformabilidad de los eritrocitos en diferentes enfermedades infecciosas, metabólicas y cardiovasculares, entre otras: malaria (13), diabetes (14), infarto de miocardio (15) o enfermedades críticas (por ejemplo, sepsis) (16). Debido a su importancia fisiopatológica, la medición de la deformabilidad de los glóbulos rojos ha sido el foco de numerosos estudios en las últimas décadas (17).

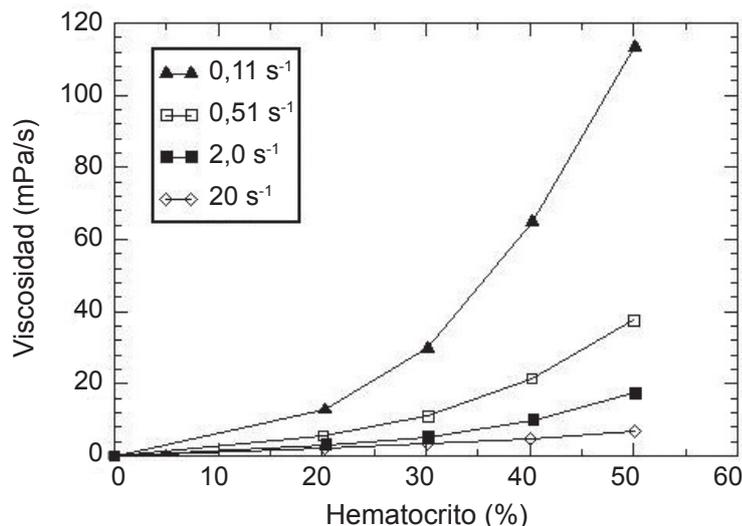


Figura 1. Viscosidad de la sangre en función del hematocrito para distintos valores de la tasa de deformación para GR normales suspendidos en plasma (7).

Propiedades biomecánicas de los glóbulos rojos normales

En condiciones fisiológicas, los GRs adoptan la forma de un disco bicóncavo, con dimensiones de aproximadamente 8 μm de diámetro y 2 μm de grosor. Su deformabilidad permite que atraviesen capilares con diámetros de no más de 3–5 μm . Cuando los GRs circulan a través del bazo, que actúa como un filtro altamente efectivo, estas células traspasan poros en las paredes endoteliales extremadamente estrechas con un diámetro de 0,5 a 1,0 μm . En caso de alteración de la capacidad de deformación, debida a factores patológicos (por ejemplo en la esferocitosis hereditaria, EsH) o envejecimiento fisiológico, se produce el secuestro esplénico y la eliminación de los GRs de la circulación (18).

La deformabilidad de un eritrocito depende principalmente de los siguientes tres factores:

1. El exceso de área de superficie respecto a la que tendría una esfera del mismo volumen. En efecto, considerando que el volumen celular medio (VCM) de un GR es de ~ 90 fL, si fuera una esfera tendría una superficie de $97 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, debido a su forma bicóncava presenta un área de superficie media (MSA) de $\sim 135 \mu\text{m}^2$, que es notablemente mayor.
2. La viscosidad del fluido intracelular dominada por el tipo y la concentración de hemoglobina.
3. Las propiedades viscoelásticas de la membrana celular, que es un material compuesto que consta de tres capas: un glicocálix rico en hidratos de carbono en la superficie exterior, una bicapa

lipídica capaz de resistir la flexión y una red de proteínas subyacentes que sirve como esqueleto de membrana y es responsable de facilitar la deformabilidad, flexibilidad y recuperación de la forma discoide (12). La extensibilidad lineal de esta malla proteica define los límites de la deformabilidad de los glóbulos rojos (12).

El aumento anormal en la rigidez de los GRs se ha asociado con alguna alteración de estos factores. El comportamiento mecánico de la membrana de los GRs se expresa en términos de tres módulos fundamentales: (a) el módulo elástico de corte, (b) el módulo de compresibilidad del área y (c) el módulo de flexión. El primero se asocia con una deformación de área constante. El módulo de compresibilidad del área caracteriza su resistencia a la compresión o la expansión. El módulo de flexión que presenta la curvatura de la membrana es importante para impulsar los cambios en la forma de reposo (17) (19). Otro parámetro elástico que resulta de mediciones en microscopía de fuerza atómica (20) es el módulo de Young, que es la medida de la rigidez del material elástico según la dirección en la que se aplica la fuerza.

En bifurcaciones vasculares y cambios en la sección transversal de los vasos se producen deformaciones transitorias en los GRs. El parámetro característico de estos fenómenos es el tiempo de relajación, definido como el tiempo que tarda un GR deformado en recuperar su forma bicóncava original (21). Se han hecho algunos avances prometedores que muestran la interacción entre la forma de los vasos y la deformabilidad de los GRs (22).

Los GRs maduros se deforman de manera reversible bajo tensiones de corte que se presentan durante el tránsito circulatorio (8). Las proteínas integrales de transmembrana como AE-1 (también llamada B3) y las glicoforinas están ancladas de manera reversible a una malla de proteínas filamentosas del citoesqueleto (Fig. 2). El mantenimiento de las interacciones entre la membrana lipídica y la malla proteica y el robusto comportamiento mecánico de los GRs dependen de las bombas de iones asociadas al ATP, así como del apoyo de los sistemas antioxidantes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) (23).

Técnicas para medir las propiedades biomecánicas de los glóbulos rojos

Los métodos experimentales disponibles se pueden dividir en dos categorías: 1) instrumentos que miden la sangre total o suspensiones de GRs diluidos y 2) técnicas de célula única.

Los primeros, que incluyen el viscosímetro rotacional y el ectacitómetro, se consideran métodos de alto rendimiento. Sin embargo, éstos no tienen en cuenta la heterogeneidad o las diferencias de tamaño dentro de la población de células. El ectacitómetro (24) emplea una técnica de difracción láser y mide la deformabili-

dad de los GRs en función de la osmolalidad del medio en la que están suspendidos (a una dada tasa de deformación). Las curvas de índice de deformabilidad (ID) brindan información sobre el área de la superficie de los glóbulos rojos, la relación entre la superficie y el volumen y la viscosidad interna. El ID (a menudo llamado índice de elongación) se define como la relación $(L-W)/(L+W)$, donde L y W son respectivamente los ejes mayor y menor de una elipse que representa un GR deformado promedio. La curva para muestras de sangre normal alcanza un ID máximo (ID_{max}) a los 290 mOsm/kg, lo que indica que los GRs normales tienen una capacidad de deformación óptima cuando se exponen a la osmolalidad (o tonicidad) normal. Cuando la osmolalidad del medio de suspensión disminuye, la ID también disminuye y la ID mínima (ID_{min}) indica el volumen máximo posible que una célula puede alcanzar antes de la hemólisis.

Como se dijo previamente, la deformabilidad de los eritrocitos está gobernada por tres factores: la relación superficie/volumen, la viscosidad citoplasmática y la rigidez intrínseca de la membrana. Con el ectacitómetro se obtiene una curva de deformabilidad osmótica, cuyos puntos característicos son los siguientes (Fig. 3):

- El índice de deformabilidad máximo, ID_{max} . Se alcanza en un medio isotónico y depende del área de membrana disponible del eritrocito.

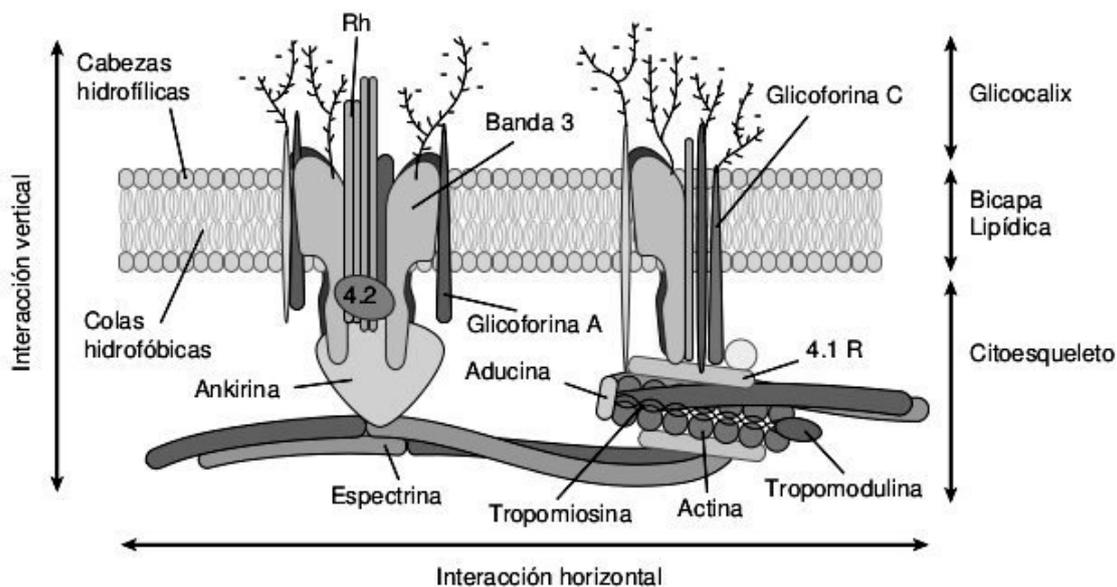


Figura 2. Esquema de la estructura bidimensional de la membrana: es una estructura compuesta por una bicapa lipídica anclada a una red bidimensional elástica de proteínas del citoesqueleto a través de anquirina y proteína 4.1. La deficiencia o alteración de alguna de las proteínas de la unión vertical involucrando el complejo anquirina conduce a la pérdida de cohesión entre la bicapa lipídica y el esqueleto de la membrana, como así también a la pérdida de área de superficie. Las uniones horizontales entre dímeros espectrina-espectrina y entre espectrina-actina-proteína 4.1R en el complejo de unión determinan la integridad mecánica de la membrana. Las uniones horizontales defectuosas disminuyen esta integridad y favorecen la fragmentación de la célula.

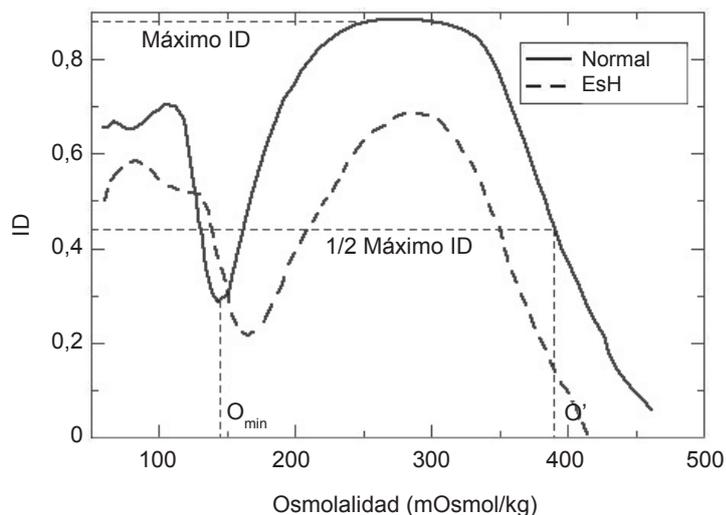


Figura 3. Ectacitometría de gradiente osmótico. **Línea gruesa (normal):** perfil de deformabilidad osmótica de los GRs humanos normales que muestra el índice de deformabilidad (ID) como una función continua de la osmolalidad del medio en suspensión. El ID máximo, que se alcanza en la osmolalidad isotónica es una medida del área de superficie de la membrana. El ID mínimo en la región hipotónica (O_{min}) corresponde a la osmolalidad en la que el 50% de los glóbulos rojos se lisan en la prueba de fragilidad osmótica y el O' en la región hipertónica corresponde al estado de hidratación de las células y por lo tanto a la CHCM. **Línea de puntos (EsH):** perfil de deformabilidad osmótica de un paciente con EsH. La disminución del ID máximo es consecuencia de la reducción del área de superficie de la membrana, el aumento del ID en O_{min} es el resultado del incremento de la fragilidad osmótica y la disminución del ID en la mayor osmolalidad refleja la deshidratación celular. Adaptado de (36).

- La O_{min} es la osmolalidad para la cual el ID es mínimo y corresponde al 50% de hemólisis en una prueba de fragilidad osmótica. Se produce en un medio hipotónico y depende de la relación superficie/volumen.
- O' es la osmolalidad a la cual el ID es igual a la mitad del ID_{max} . Este parámetro depende de la viscosidad intracelular y, por lo tanto, se relaciona con la concentración hemoglobínica corpuscular media (CHCM).

Las muestras de sangre patológicas se caracterizan por diferencias en la forma de la curva de ID frente a la osmolalidad en comparación con un control normal. La ectacitometría de gradiente osmótico es extremadamente útil para el diagnóstico en la mayoría de las patologías hereditarias de la membrana eritrocitaria (25).

Existen varios métodos experimentales unicelulares, que incluyen la aspiración con micropipeta, las pinzas ópticas, el análisis de parpadeo, la microscopía de fuerza atómica y las técnicas de microfluídica y ultrasonido (26). Además, la interferometría láser de campo completo, una técnica óptica no invasiva, se ha utilizado para cuantificar las características materiales de las células vivas en escalas del nanómetro y del milisegundo. Los métodos anteriores basados en células individuales permiten la estimación de las propiedades de la mem-

brana que afectan la capacidad de deformación de los GRs. En general, estos métodos tienen más interés teórico y básico que clínico ya que pueden no representar completamente las condiciones reales que ocurren en la microcirculación.

En los últimos años, se han desarrollado técnicas basadas en el flujo en microcapilares y en dispositivos microfluídicos (27) (28). El análisis automatizado de imágenes en estos dispositivos permite estudiar un gran número de células mediante el uso de patrones que imitan la microcirculación (29) en sustratos transparentes, como polidimetilsiloxano y vidrio, haciendo uso de videomicroscopía. Los métodos incluyen: (i) visualizaciones de la deformación celular en función de la caída de presión, en la cual la forma clásica de paracaídas observada *in vivo* también se obtuvo en experimentos *in vitro* (30), (ii) estimaciones de las propiedades viscoelásticas de la membrana celular mediante el uso de canales divergentes (31) y (iii) arreglos de cámaras micrométricas que contienen una sola célula (SiCMA, del inglés: *single-cell microchamber array chip*) (21) (32) en las que se aplica una fuerza dielectroforética para deformar los GRs y se utiliza el análisis de imágenes para evaluar la deformabilidad de los eritrocitos individuales en términos del porcentaje del índice de elongación (33).

Un parámetro geométrico de un conjunto de GRs es el ancho característico de distribución eritrocitaria

(RDW, del inglés: *red distribution width*) que es una medida de la variación de tamaño y un índice de la heterogeneidad celular. Éste se puede utilizar como una herramienta de diagnóstico y pronóstico en afecciones cardiovasculares y trastornos trombóticos (34). Recientes investigaciones han estudiado el patrón de secado de gotas de sangre completa en busca de pistas para correlacionar dichos patrones con diversas condiciones que afecten la salud humana. La morfología de los patrones de gotas secas sobre un sustrato presenta regiones denominadas corona, placas y grietas radiales, los cuales difieren en pacientes con patologías de diferente etiología (35). Los patrones de secado de gotas se ven afectados por numerosos efectos físicos que dependen de la reología de la sangre. En efecto, en estos problemas hay flujos de Marangoni acoplados con la evaporación que dependen, entre otros factores, de la composición de la sangre, la concentración de solutos (que puede alterarse con la lisis o crenación de los GRs), la viscosidad del plasma y los fenómenos de gelación que alteran la reología del sistema. Por ello, no es igual el patrón resultante del secado de sangre normal, uno con 50% de GRs y 50% de solución fisiológica y uno

de sangre hemolizada como se muestra en la Figura 4. Aunque aún es prematuro sacar conclusiones definitivas, en nuestro laboratorio se está trabajando en esta metodología tratando de obtener información cuantificable de dicha morfología con el objetivo de que resulte útil para presumir u orientar hacia el diagnóstico de ciertas patologías.

Patologías que afectan las propiedades reológicas de los glóbulos rojos

Trastornos hereditarios de la membrana

Los trastornos hereditarios que afectan a la membrana eritrocítica incluyen, entre otros, la esferocitosis hereditaria (EsH), la eliptocitosis hereditaria (ElH) y la estomatocitosis. Estos son causados por una deficiencia o disfunción de alguna de las proteínas esqueléticas de la membrana y constituyen un grupo importante de las anemias hemolíticas hereditarias (36) (37). Las dos primeras son las más frecuentes en caucásicos, con una prevalencia aproximada de 1 en 5000. Dos tercios

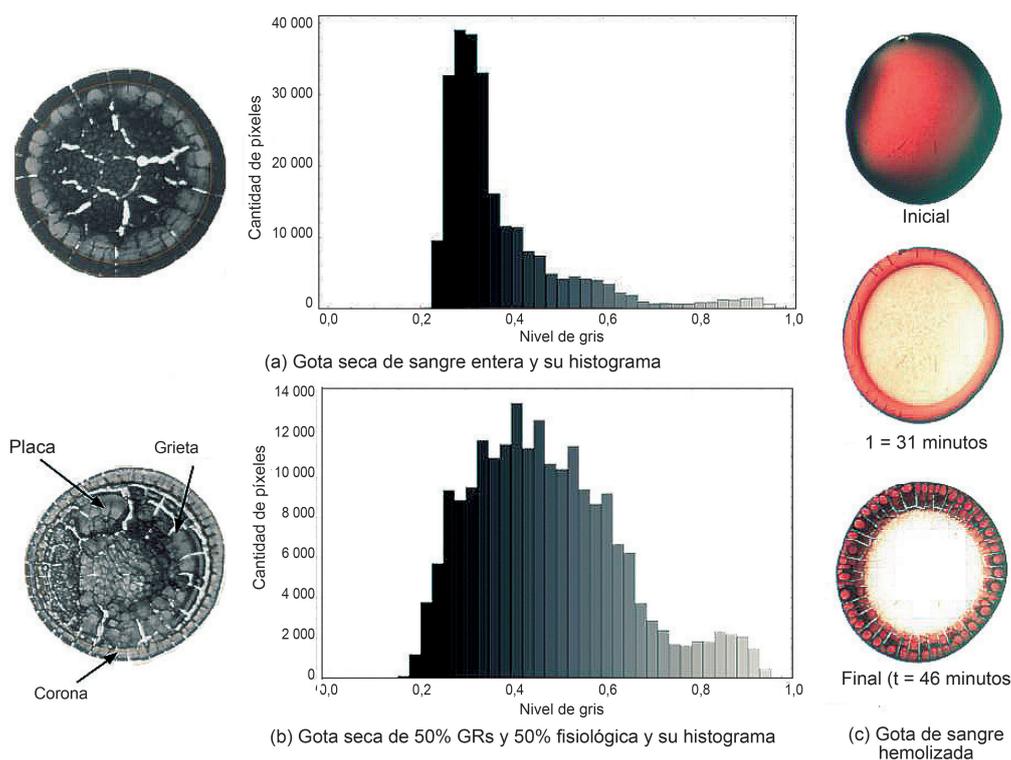


Figura 4. (a) Gota de sangre entera seca y su histograma de grises (1 es blanco). La zona de corona es distintiva y está indicada por círculos. (b) Lo mismo pero para una gota con 50% de GRs y 50% de solución fisiológica. (c) La columna de la derecha muestra la evolución del patrón de secado de una gota de sangre hemolizada. Se ve que el patrón de las coronas y de la zona central difiere para una misma gota y que el secado no da el mismo resultado según la composición y las características de la gota. (Experimentos propios realizados en el laboratorio del IFAS-UNCPBA).

se presentan de forma autosómica dominante; el resto podrían ser de herencia recesiva o mutaciones *de novo*. Estas enfermedades son el resultado de mutaciones en los genes que codifican las diferentes proteínas ancladas a la bicapa lipídica de la membrana de los eritrocitos. Algunas de estas mutaciones pueden afectar a las proteínas integrales de transmembrana que representan las interacciones verticales (ankirina o proteína 2.1, proteína Banda 3, proteínas 4.1 y 4.2 y glicoforina C) y conducen a la pérdida de cohesión entre la bicapa lipídica y el esqueleto de la membrana (Fig. 2). Por consiguiente, éstas conllevan a la reducción del área de la superficie de la membrana que es típica de la EsH. Otras mutaciones afectan los enlaces horizontales entre los dímeros de espectrina-espectrina y entre la espectrina-actina-proteína 4.1R en el complejo de unión que determinan la integridad mecánica de la membrana. Estos enlaces horizontales defectuosos conducen a una disminución de dicha integridad y a la fragmentación celular que se observa en algunos tipos de EIH (36) (38).

Las propiedades biomecánicas de la membrana de los GRs en trastornos hereditarios han sido evaluadas principalmente por ectacitometría (39) (40). En la EsH los resultados muestran una disminución en la deformabilidad de la membrana eritrocitaria, la que se comprueba por el cambio en el ID y la forma atípica de la curva de deformabilidad respecto al control (36) (Fig. 3). La disminución del ID máximo es consecuencia de la reducción del área de superficie de la membrana. El aumento del ID en osmolalidad mínima es el resultado del aumento de la fragilidad osmótica. Se ha demostrado que el valor de ID_{max} disminuye con la reducción del contenido de espectrina de los GRs (41). Ésta es considerada como la principal molécula de almacenamiento de energía de la membrana y determina su capacidad de deformación elástica por cizallamiento. En efecto, el módulo de corte de la membrana de los GRs depende en gran medida de la densidad de la espectrina.

Otro método utilizado es la microscopía de fuerza atómica que permite el estudio de las propiedades mecánicas de los eritrocitos de pacientes con EsH en términos del módulo de Young. Este parámetro fue mayor en los eritrocitos de la EsH en comparación con las células normales (20).

Los criterios básicos usados para el diagnóstico de la EsH son: signos clínicos, morfología eritrocitaria, bajo VCM, elevado CHCM, aumento de reticulocitos, prueba de Coombs directa negativa, bilirrubina indirecta elevada. Cuando estos son insuficientes, se considera la realización de pruebas adicionales de baja complejidad, diferente sensibilidad y especificidad como los de fragilidad osmótica incubada, de lisis en glicerol acidificado, que son de utilidad aún cuando sus resultados pueden ser modificados por factores no

relacionados con defectos propios de la membrana. La prueba de criohemólisis hipertónica es más específica que las otras mencionadas, ya que no depende de la relación superficie/volumen sino de la integridad de las proteínas de membrana. Esta prueba presenta la ventaja de arrojar resultados normales cuando la presencia de esferocitos se relaciona con anemias hemolíticas autoinmunes (42) (43). También se ha utilizado la citometría de flujo, que evalúa la intensidad de fluorescencia emitida por el reactivo 5'-eosina maleimida el cual interacciona covalentemente con las proteínas Banda 3 principalmente y con antígenos del Grupo Kell, CD47 y Grupo Rh de la membrana eritrocitaria. En la EsH, cualquiera sea la proteína deficiente primaria, se obtiene una disminución de la fluorescencia debido a la pérdida de la membrana que contiene las proteínas que reaccionan con el reactivo fluorescente. Este método tiene una sensibilidad de 92,7% a 96,1% y una especificidad mayor de 99,1%, según distintos autores (44) (45).

La ectacitometría de gradiente osmótico y el análisis genético basado en el estudio del ADN son técnicas más específicas para determinar con precisión los trastornos hereditarios. Aunque actualmente en la Argentina no se encuentran disponibles para el diagnóstico, en otros países, mayormente europeos, se utilizan para dicho fin. Asimismo, la electroforesis de las proteínas de membrana, el estudio de la digestión triptica y la cuantificación de dímeros y tetrámeros de espectrina son métodos que pueden contribuir al diagnóstico tanto de la EsH como de la EIH. Sin embargo, existen algunas alteraciones patológicas que aún no se pueden diagnosticar con exactitud mediante estos métodos.

Recientemente, la determinación de la proteómica mediante la espectrometría de masa podría caracterizar un número de proteínas de escasa abundancia en la membrana, enzimas que regulan las interacciones del citoesqueleto y los mecanismos de transporte celular, obteniendo datos de nuevas modificaciones postraduccionales con la combinación de la bioinformática. Este método tendría la potencialidad de reconocer patologías eritrocitarias de compleja identificación (46).

El análisis microscópico mediante dispositivos microfluídicos que están en pleno desarrollo sería un paso importante en el diagnóstico de los trastornos hereditarios de la membrana. Estos dispositivos combinan el análisis de imágenes de GRs con la cuantificación de las propiedades de la membrana, es decir, los tres módulos biomecánicos fundamentales (el módulo elástico de corte, el módulo de expansión de área y el módulo de flexión) y la constante de tiempo de relajación. Por ejemplo, la tecnología SiCMA es capaz de medir el índice de alargamiento de células individuales en una población heterogénea. Con este método, se ha observado una reducción del 30% en la capacidad de deformación del GR en la EsH (32).

Diabetes

La diabetes *mellitus* tipo II es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Se ha observado que la viscosidad citoplasmática de los GRs depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de la hemoglobina, como la glicación aumentada debido a la hiperglucemia relacionada con la diabetes y eso afectaría sus propiedades viscoelásticas (47).

La membrana de los eritrocitos se torna rígida ante un nivel de glucosa elevado y esto afecta adversamente su comportamiento natural, particularmente en la microcirculación, contribuyendo a la microangiopatía (48). Experimentos de filtración con micropipeta mostraron que los GRs diabéticos presentan un defecto en la deformabilidad y toman más tiempo para recuperar su forma discoidal (49). Con la utilización de un dispositivo microfluídico de vidrio como modelo de los microvasos, el ID de los GRs de pacientes diabéticos resultó más bajo que el de los controles sanos, lo que indicaría una deformabilidad deteriorada (50). Resultados similares fueron hallados en suspensiones de GRs de estos pacientes estudiando la tasa de filtración a través de membranas (51). Mediante un ectacitómetro combinado con un reómetro de hendidura, se observó una disminución de la deformabilidad de los eritrocitos en pacientes diabéticos en comparación con los controles no diabéticos (52).

Obtener datos cuantitativos sobre las propiedades viscoelásticas de la membrana resulta importante para correlacionar la deformabilidad disminuida con las complicaciones de la diabetes, como la microangiopatía y la nefropatía, que no se conocen en su totalidad. Además, permitiría evaluar la reducción de la viscosidad de la sangre total a nivel de la microcirculación por efecto de medicamentos (48).

Agregación, adhesión y deformabilidad de los glóbulos rojos en enfermedades graves adquiridas

Entre los factores que afectan la agregación, adhesión y deformabilidad de los GRs interviene el estrés oxidativo. Este se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de especies de oxígeno y su eliminación. Bajo condiciones fisiológicas, los GRs pueden defenderse contra la exposición continua al estrés oxidativo mediante la intervención de moléculas antioxidantes y enzimas capaces de convertir los compuestos tóxicos en formas que pueden ser neutralizadas por las células (53) (54). Sin embargo, la respuesta anormal al estrés oxidativo puede causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres, lo que ocasiona daños que afectan la membrana de los GRs, alteran los mecanismos normales de señalización celular y, en consecuencia, pueden afectar el flujo a través de la red microcirculatoria. Estas alteraciones del flujo agravan algunas situaciones patológicas como la sepsis,

la diabetes, la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio, entre otras (55) (56). Se ha observado deformabilidad alterada de los GRs en presencia de estrés oxidativo mediante el uso de ectacitometría (57). El análisis del espectro de fluctuación térmica de la membrana permitió evaluar las propiedades mecánicas de los GRs así como los módulos elásticos y determinó un aumento de la rigidez al estar expuestos a estrés oxidativo *in vitro* (58).

Mediante experimentos de microfluídica (59) se puede observar la presencia de GRs dañados por el estrés oxidativo en términos de la rigidez de la membrana. Se ha propuesto este método como un posible acercamiento a un tema de potencial interés clínico que consiste en discriminar entre los GRs bien y mal almacenados para transfusión.

Como se ha señalado anteriormente, los GRs suspendidos en plasma autólogo tienden a formar grandes agregados, conocidos como *rouleaux*. Se ha demostrado que los reactantes de fase aguda, especialmente el fibrinógeno, la proteína C reactiva, el amiloide sérico A, la haptoglobina y la ceruloplasmina, aumentan la agregación de glóbulos rojos y estabilizan estos agregados, incrementando significativamente la viscosidad de la sangre. Este cambio de viscosidad afecta sobre todo a la administración de O₂ a los tejidos en los estados de bajo flujo en la microcirculación, como ocurre en las enfermedades críticas (por ejemplo, en la sepsis) (60) (61). Entre los factores que causan estos cambios reológicos se han mencionado el aumento de la concentración intracelular de 2,3-DPG (62), el Ca⁺² libre intracelular y la disminución del ATP intraeritrocitario que se ha relacionado con la disminución del contenido de ácido siálico en las membranas (16) (63). El contacto directo entre GRs y glóbulos blancos y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la sepsis pueden alterar aún más la funcionalidad de la membrana de los GRs. Este comportamiento hemorreológico de la membrana contribuye a la reducción de la provisión de oxígeno a los tejidos, un aspecto común en las enfermedades críticas (16).

Se ha demostrado que en condiciones patológicas como la sepsis y la lesión por isquemia-reperusión se alteran las proteínas de la superficie de los eritrocitos y aumentan su agregabilidad (64). También se observó que los glóbulos blancos activados causan un incremento de esta última por cambios estructurales en las glicoproteínas de membrana de los GRs (65). En condiciones normales, la adherencia de los GRs a las células endoteliales es insignificante y su deformabilidad permite el paso eficiente a través de la microcirculación. Sin embargo, durante un estado de enfermedad crítica como la sepsis, las interacciones entre los GRs y el endotelio se ven alteradas por lesiones asociadas al estrés oxidativo (66). Estas interacciones de endotelio y GRs crean un aumento fisiológicamente significativo de la

viscosidad aparente de la sangre. Además, la adherencia de los GRs daña directamente el endotelio y produce un reclutamiento de los leucocitos unidos a éste, lo que aumenta aún más la viscosidad aparente y perjudica el flujo microcirculatorio. Este fenómeno se aprecia comúnmente en la fisiopatología de las crisis vaso-occlusivas en pacientes con drepanocitosis, paludismo, vasculopatía diabética, policitemia vera y trombosis de la vena central de la retina, pero puede estar presente en otras situaciones patológicas (67) (68).

Alteraciones geométricas y mecánicas de los GRs secundarias al deterioro del metabolismo (que provoca deshidratación de los GRs, aumento del nivel de calcio intraeritrocitario y agotamiento del ATP/NADPH) son consecuencias bien descritas en la sangre almacenada durante períodos prolongados (69) y en los GRs sometidos a un importante estrés metabólico durante las enfermedades críticas (70) (71).

Otros mecanismos que alteran la deformabilidad de los GRs se relacionan con su senescencia. Se han propuesto dos mecanismos que afectan la elasticidad de la membrana: (i) la agrupación de la proteína de membrana B3 (72) y (ii) la externalización de la fosfatidilserina (PS) en la bicapa lipídica (73). Ambos procesos pueden acelerarse en caso de enfermedades severas, lo que altera la capacidad de transporte de O_2 (61). La agrupación posterior de los dominios exocelulares de B3 en situaciones de senescencia aumenta la afinidad de los autoanticuerpos naturales y activa la captación y destrucción de GRs por los macrófagos (74). La eliminación de los GRs normales senescentes parece relacionarse con su detección por los macrófagos al quedar atrapados en los sinusoides esplénicos debido a su mayor rigidez.

Los eritrocitos senescentes interactúan con las proteínas de la matriz extracelular que están expuestas dentro de la arquitectura esplénica. Esta exposición es impulsada por moléculas de adhesión en condiciones de bajo cizallamiento. Recientemente, se ha observado (75) que esta exposición resulta en una contracción constante de la célula y finalmente en hemólisis, produciendo fantasmas (*ghosts*) que, a diferencia de los GRs intactos envejecidos, son fácilmente reconocidos por los macrófagos de la pulpa roja esplénica. Estos hallazgos podrían demostrar que la hemólisis es un evento relevante en la remoción de GRs.

Alternativamente, los GRs pueden recibir una forma de estímulo (señalización) similar a la apoptosis (denominada eriptosis), que se caracteriza por la contracción celular y la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática por la traslocación del fosfolípido fosfatidilserina hacia la capa externa de la bicapa lipídica. La eriptosis se ha descrito en el contexto de intoxicación por etanol, neoplasia, insuficiencia hepática, diabetes, insuficiencia renal crónica, síndrome urémico hemolítico, deshidratación, agotamiento de

fosfato, fiebre, sepsis, infección por *Mycoplasma*, malaria, deficiencia de hierro, anemia falciforme, talasemia, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y enfermedad de Wilson (76).

Influencia de los glóbulos rojos en la coagulación

El principal impacto de los GRs en la formación de coágulos *in vivo* es reológico, debido a que un flujo laminar con cizalladura promueve la marginación de las plaquetas y la concentración de los GRs en el centro (77). La cizalladura ocurre cuando la velocidad del flujo varía en la dirección perpendicular al movimiento. La agregación y deformabilidad eritrocitaria favorece el soporte, ensamblado y retracción del coágulo. Además, durante la formación del trombo, los GRs interactúan con las células endoteliales y las plaquetas (78). La efectividad con la que la superficie procoagulante logra estimular la producción de trombina (mediante la exposición de la fosfatidilserina en la región externa de la bicapa lipídica) junto con la rigidez de los eritrocitos son dos factores importantes en la generación y maduración de un coágulo (79) (80). A su vez, las micropartículas liberadas de las membranas de los GRs durante los cuadros de hemólisis tienen un fuerte potencial procoagulante junto con los efectos protrombóticos de la hemoglobina y el hemo extracelular (61) (81). Por otro lado, los GRs interactúan directamente con la fibrina/fibrinógeno y afectan la estructura, las propiedades mecánicas y la resistencia lítica de los coágulos y los trombos (82). La visualización directa por microscopía confocal y *scanning* electrónico demuestra que las concentraciones bajas de GRs se incorporan heterogéneamente en la red de fibrina, mientras que las altas concentraciones se ordenan más uniformemente. El agregado de GRs conduce a la formación de fibrinas más gruesas y modifica la viscoelasticidad del coágulo incrementando el comportamiento viscoso respecto del elástico (83).

Finalmente, los GRs adquieren en un coágulo una forma de teselado que es un patrón repetitivo de figuras geométricas poliédricas que encajan y cubren el plano sin superponerse y sin dejar huecos. Se los denomina poliedrocitos y se reconocen como un componente estructural importante de los coágulos contraídos, produciendo una barrera impermeable que es muy importante para la hemostasia y la curación de las heridas (84).

Observaciones finales

Esta reseña de los aspectos biofísicos de la reología de la sangre se ha concentrado en la importancia de los GRs en el comportamiento de este fluido no newto-

niano. Se han descripto algunos modelos experimentales *in vitro* que se pueden usar para medir la deformabilidad de los GRs, en especial las alteraciones de la membrana eritrocítica en las anemias hemolíticas hereditarias. La ectacitometría se considera actualmente como una técnica útil para estimar las propiedades de la membrana, ya que caracteriza fundamentalmente la deformabilidad de los GRs en términos de cambios en la curva ID. Se describieron las alteraciones de la deformabilidad de los GRs en trastornos metabólicos y su influencia en las complicaciones concomitantes. Aunque se ha logrado un enorme progreso, la comprensión del papel de la deformabilidad de los GRs en tales enfermedades está lejos aún de ser completa. Se han mencionado algunas pruebas que apoyan una relación causal entre la disfunción adquirida de los GRs y las morbilidades relacionadas con la perfusión que complican las enfermedades graves. Todas ellas están afectadas por la inflamación, el estrés oxidativo y el control vascular disfuncional.

Muchos ensayos bioquímicos y biológicos tradicionales, como la citometría de flujo, la extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa, que proporcionan información de parámetros múltiples de las células, ya se han transferido a dispositivos microfluídicos integrados (26). Se están diseñando nuevos sistemas microfluídicos que deberían permitir observaciones de alta velocidad y gran aumento del flujo que representen bien la microvasculatura humana. Trabajos recientes se han centrado en las células sanas y en algunas patologías, como la malaria y la anemia falciforme (85) (86).

El estudio de la hemorreología es un campo abierto que incluye otros aspectos que no han sido tratados en este trabajo, tales como la respuesta de la sangre a flujos pulsantes, su comportamiento viscoelástico y la interacción del flujo con la elasticidad de las paredes de los vasos. Es preciso desarrollar nuevas técnicas experimentales y mejorar las simulaciones numéricas de los problemas para mejorar la comprensión de estos efectos.

Fuentes de financiación

La Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) ha financiado estos estudios a través del Proyecto Estratégico de Investigación, Desarrollo y Transferencia (PEIDyT) denominado "Diseño de un dispositivo de bajo costo para determinar patologías eritrocitarias" dentro del Programa de Fortalecimiento de la Ciencia y la Tecnología en Universidades Nacionales de la Secretaría de Políticas Universitarias (Convocatoria 2018).

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la UNCPBA por apoyar estos estudios y al Dr. Mario Fainberg de la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto del Diagnóstico, La Plata.

Correspondencia

Dr. LEONARDO JULIO FELDMAN
Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de
Buenos Aires
Pinto 399, Tandil, Argentina.
Correo electrónico: leonardofeldman2009@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Matrai A, Whittington RB, Skalak R. Biophysics. En: Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A, editors. Clinical Hemorheology. Dordrecht: Martinus Nijhoff; 1987. p. 9–71.
2. Lowe GDO, Barbenel JC. Plasma and blood viscosity. En: Lowe GDO, editor. Clinical Blood Rheology, Vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 11–44.
3. Ross J, Schmid-Schönbein G. Dynamics of the peripheral circulation. En: West JB, editor. Physiological basis of medical practice. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1990. p. 138–58.
4. Copley AL. Fluid mechanics and biorheology. Clin Hemorheol 1990; 10: 3–19.
5. Merrill EW. Rheology of blood. Physiol Rev 1969; 49: 863–88.
6. Rand PW, Lacombe E, Hunt HE, Austin WH. Viscosity of normal human blood under normothermic and hypothermic conditions. J Appl Physiol 1964; 19: 117–22.
7. Cokelet GR, Meiselman HJ. Macro- and micro-rheological properties of blood. En: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, editors. Handbook of hemorheology and hemodynamics. IOS Press; 2007. p. 45.
8. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. Semin Thromb Hemost 2003; 29: 435–50.
9. Johnson PC. Overview of the microcirculation. En: Tuma RF, Duran WN, Ley K, editors. Microcirculation. Academic Press; 2008. p. xi-xxiv.
10. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sick cell biomechanics. Annu Rev Biomed Eng 2010; 12: 345–67.
11. Scott MD, Fessard PR, Ba MS, Lubin BH, Beuzard Y. Alpha- and beta-haemoglobin chain induced changes in normal erythrocyte deformability: comparison to beta thalassaemia intermedia and Hb H disease. Br J Haematol 1992; 80: 519–26.
12. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: Past, present, and future. Blood 2008; 112: 3939–48.
13. Wu T, Feng JJ. Simulation of malaria-infected red blood cells in microfluidic channels: passage and blockage. Biomicrofluidics 2013; 7: 044115.

14. Buys AV, Van Rooy M-J, Soma P, Van Papendorp D, Lipinski B, Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12: 25.
15. Vayá A, Rivera L, de la Espriella R, Sanchez F, Suescun M, Hernandez JL, *et al.* Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015; 59: 107–14.
16. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1052–61.
17. Guido S, Tomaiuolo G. Microconfined flow behavior of red blood cells *in vitro*. *Compt Rend Phys* 2009; 10: 751–63.
18. McHedlishvili G, Maeda N. Blood flow structure related to red cell flow: determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *Jpn J Physiol* 2001; 51: 19–30.
19. Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest* 1980; 66: 563–73.
20. Dulińska I, Targosz M, Strojny W, Lekka M, Czuba P, Balwierz W, *et al.* Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods* 2006; 66: 1–11.
21. Tomaiuolo G, Guido S. Start-up shape dynamics of red blood cells in microcapillary flow. *Microvasc Res* 2011; 82: 35–41.
22. Gong X, Sugiyama K, Takagi S, Matsumoto Y. The deformation behavior of multiple red blood cells in a capillary vessel. *J Biochem Eng* 2009; 31: 074504.
23. Mohandas N, Shohet SB. The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Haematol* 1981; 10: 223–37.
24. Shin S, Ku YH, Park MS, Moon SY, Jang JH, Suh JS. Laser-diffraction slit rheometer to measure red blood cell deformability. *Rev Sci Instrum* 2004; 75: 559–61.
25. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnet A, Pascreau T, Couque N, *et al.* Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis* 2016; 56: 9–22.
26. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Bio-microfluidics* 2014; 8: 051501.
27. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 2014; 507 (7491): 181–9.
28. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006; 442 (7101): 368–73.
29. Sherwood JM, Dusting J, Kaliviotis E, Balabani S. The effect of red blood cell aggregation on velocity and cell-depleted layer characteristics of blood in a bifurcating microchannel. *Bio-microfluidics* 2012; 6: 024119.
30. Lanotte L, Tomaiuolo G, Misbah C, Bureau L, Guido S. Red blood cell dynamics in polymer brush-coated microcapillaries: a model of endothelial glycocalyx *in vitro*. *Bio-microfluidics* 2014; 8: 014104.
31. Tomaiuolo G, Barra M, Preziosi V, Cassinese A, Rotoli B, Guido S. Microfluidics analysis of red blood cell membrane viscoelasticity. *Lab Chip* 2011; 11: 449–54.
32. Doh I, Lee WC, Cho Y-H, Pisano AP, Kuypers FA. Deformation measurement of individual cells in large populations using a single-cell microchamber array chip. *Appl Phys Lett* 2012; 100: 173702.
33. Liao S-H, Chang C-Y, Chang H-C. A capillary dielectrophoretic chip for real-time blood cell separation from a drop of whole blood. *Bio-microfluidics* 2013; 7: 024110.
34. Montagnana M, Cervellin G, Meschi T, Lippi G. The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 635.
35. Chen R, Zhang L, Zang D, Shen W. Blood drop patterns: formation and applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2016; 231: 1–14.
36. Mohandas N. Inherited hemolytic anemia: a possessive beginner's guide *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018; 2018: 377–81.
37. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2013; 27: 167–78.
38. Feldman L, Marick T, Cerone S, Sansinanea A, Lecomte M, Dhermy D, *et al.* Estudio clínico y bioquímico de 9 pacientes con eliptocitosis hereditaria. *Medicina (B. Aires)* 1992; 52: 109–15.
39. Cynober T, Mohandas N, Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 259–69.
40. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2007; 21: 1–20.
41. Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis—Defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol* 2004; 41: 118–41.
42. Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ on behalf of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2004; 126: 455–74.
43. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ on behalf of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis - 2011 update. *Br J Haematol* 2012; 156: 37–49.
44. Kar R, Mishra P, Pati HP. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol* 2010 Feb; 32 (1 Pt 2): 8–16.
45. Crisp RL, Solari L, Vota D, García E, Míguez G, Chamorro ME, *et al.* A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE). on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. *Ann Hematol* 2011; 90: 625–34.

46. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O. The human red blood cell proteome and interactome. *Exp Biol Med* (Maywood) 2007; 232: 1391–408.
47. Watala C, Witas H, Olszowska L, Piasecki W. The association between erythrocyte internal viscosity, protein nonenzymatic glycosylation and erythrocyte-membrane dynamic properties in juvenile diabetes *mellitus*. *Int J Exp Pathol* 1992; 73: 655–63.
48. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes *mellitus*. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2, 1130–8.
49. Caimi G, Presti R. Techniques to evaluate erythrocyte deformability in diabetes *mellitus*. *Acta Diabetol* 2004; 41: 99–103.
50. Tsukada K, Sekizuka E, Oshio C, Minamitani H. Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes *mellitus* with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. *Microvasc Res* 2001; 61: 231–9.
51. Brown CD, Ghali HS, Zhao ZH, Thomas LL, Friedman EA. Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 295–300.
52. Shin S, Ku Y, Park M, Suh J. Slit-flow ektacytometry: laser diffraction in a slit rheometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2005 May; 65 (1): 6–13.
53. Chan JY, Kwong M, Lo M, Emerson R, Kuypers FA. Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45NFE2-deficient mice. *Blood* 2001; 97: 2151–8.
54. Bissinger R, Mamun Bhuyan AA, Qadri SM, Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal* 2019; 286: 826–54.
55. Kuo L, Hein TW. Vasomotor regulation of coronary microcirculation by oxidative stress: role of arginase. *Front Immunol* 2013; 4: 237.
56. Goette A, Bukowska A, Lillig CH, Lendeckel U. Oxidative stress and microcirculatory flow abnormalities in the ventricles during atrial fibrillation. *Front Physiol* 2012; 3: 236.
57. Schrier SL, Mohandas N. Globin-chain specificity of oxidation-induced changes in red blood cell membrane properties. *Blood* 1992; 79: 1586–92.
58. Hale JP, Winlove CP, Peter G, Petrov PG. Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties. *Biophys J* 2011; 10: 1921–9.
59. Kwan JM, Guo Q, Kylvik-Price DL, Ma H, Scott MD. Microfluidic analysis of cellular deformability of normal and oxidatively damaged red blood cells. *Am J Hematol* 2013; 88: 682–9.
60. McHedlishvili G, Varazashvili M, Gobejishvili L. Local RBC aggregation disturbing blood fluidity and causing stasis in microvessels. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002; 26: 99–106.
61. Rogers S, Doctor A. Red blood cell dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin* 2020; 36: 267–92.
62. Suzuki Y, Nakajima T, Shiga T, Maeda N. Influence of 2,3-diphosphoglycerate on the deformability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1029: 85–90.
63. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent JL, *et al.* Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med* 2003; 31: 2156–62.
64. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 102–10.
65. Baskurt OK, Meiselman HJ. Activated polymorphonuclear leukocytes affect red blood cell aggregability. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 89–93.
66. Goyette RE, Key NS, Ely EW. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25 (6): 645–59.
67. Migliorini C, Qian Y, Chen H, Brown EB, Jain RK, Munn LL. Red blood cells augment leukocyte rolling in a virtual blood vessel. *Biophys J* 2002; 83: 1834–41.
68. Zennadi R, Chien A, Xu K, Batchvarova M, Telen MJ. Sick red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood* 2008; 112: 3474–83.
69. Rendell M, Luu T, Quinlan E, Knox S, Fox M, Kelly S, *et al.* Red cell filterability determined using the cell transit time analyzer (CTTA): effects of ATP depletion and changes in calcium concentration. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1133: 293–300.
70. Kayar E, Mat F, Meiselman HJ, Baskurt OK. Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology* 2001; 38: 405–14.
71. Baskurt O. Activated granulocyte induced alterations in red blood cells and protection by antioxidant enzymes. *Clin Hemorheol Microcirc* 1996; 16: 49–56.
72. Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985; 227 (4686): 531–3.
73. Kuypers FA, de Jong K. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol* 2004; 50: 147–58.
74. Lutz HU. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 321–7.
75. Klei TRL, Dalimot J, Nota B, Veldhuis M, Mul FPJ, Rademakers T, *et al.* Hemolysis in the spleen drives erythrocyte turnover. *Blood* 2020; 136: 1579–89.
76. Lang F, Abed M, Lang E, Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 138–53.
77. Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kulken GD, Sixma JJ, Heethaar RMI. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 819–24.
78. Andrews DA, Low PS. Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 76–82.
79. Turitto VT, Weiss HJ. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 1980; 207 (4430): 541–3.
80. Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Mann KG. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte

- contribution to thrombin generation. *Blood* 2012; 120: 3837–45.
81. Du VX, Huskens D, Maas C, Dieri RA, de Groot PG, de Laat B. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 72–80.
82. van Gelder JM, Nair CH, Dhall DP. Erythrocyte aggregation and erythrocyte deformability modify the permeability of erythrocyte enriched fibrin network. *Thromb Res* 1996; 82: 33–42.
83. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1169–75.
84. Tutwiler V, Mukhitov AR, Peshkova AD, Minh GL, Khis-matullin RR, Vicksman J, *et al.* Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci Rep* 2018 Dec 17; 8 (1): 17907.
85. Guo Q, Reiling SJ, Rohrbach P, Ma H. Microfluidic biomechanical assay for red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Lab Chip* 2012; 12: 1143–50.
86. Tsai M, Kita A, Leach J, Rounsevel R, Huang JN, Moake J, *et al.* *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *J Clin Invest* 2012; 122: 408–18.

Recibido: 5 de octubre de 2020

Aceptado: 4 de diciembre de 2020