

# ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO VISCOELÁSTICO NO LINEAL DE LA MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO

## ON STUDY OF NONLINEAR VISCOELASTIC BEHAVIOUR OF RED BLOOD CELL MEMBRANE

**Horacio Castellini<sup>\*1</sup>, Bibiana Riquelme<sup>2</sup>, Patricia Foresto<sup>2</sup> y Juana Valverde<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Física, F.C.E.I.A. Pellegrini 250, 2000 Rosario  
e-mail: horacio9573@yahoo.com.ar

<sup>2</sup>Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) - Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, I.F.I.R. (CONICET-UNR)  
Bv. 27 de Febrero 210 bis, 2000 Rosario  
e-mail: bibiana\_riquelme@yahoo.com.ar

El comportamiento viscoelástico lineal de la membrana del glóbulo rojo de especies animales y de seres humanos fue estudiado en trabajos previos, proponiéndose diversos métodos experimentales para determinar los parámetros asociados con el mismo. En el presente trabajo se analiza la componente no lineal de la viscosidad dinámica de la membrana del glóbulo rojo mediante análisis no lineal de series temporales. Para tal fin, se estudian series temporales obtenidas de ensayos *in vitro* de muestras de glóbulos rojos humanos y de ratas utilizando el Eritrodeformetro de régimen oscilante. Por filtrado de señal se suprime cualquier comportamiento lineal, es decir, representable por un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias lineales. Los ensayos muestran, tanto en humanos como en ratas, frecuencias de resonancia asociadas a un atractor de naturaleza desconocida independientemente de la excitación en el rango fisiológico. Los estudios preliminares muestran que dicho atractor puede corresponder a un toro de forma compleja. Estos resultados permiten ampliar el conocimiento actual sobre la respuesta dinámica de la membrana celular a un estímulo similar al que ocurre en la circulación sanguínea, lo cual permitirá realizar mejores modelos de la misma.

**Palabras Claves:** Viscoelasticidad no lineal, gráficos recurrentes, membrana eritrocitaria, viscoelasticidad dinámica, Eritrodeformetro, glóbulos rojos.

The linear viscoelastic behavior of the red blood cell membrane of mammal and human was studied in previous works proposing different experimental methods to determine their viscoelastic parameters. In the present work the nonlinear component of dynamic viscosity of the red blood cell membrane by nonlinear time series analysis is used. For such aim, it obtained time series of test *in vitro* of samples of humans and rats red blood cells using the Erythrodeformeter in oscillating regime. The signal filtrate suppresses any linear behavior as well as representable by a system of linear ordinary differential equations. The test shown as much in humans as in rats resonance frequencies associated to an attractor of unknown nature independently of excitation in the physiological range. The preliminary studies shown that attractor could be correspond to a complex form bull. These results allow to extend the present knowledge on dynamic of the cellular membrane to similar stimulus which happens in the blood circulation and it will allows to make better models of the same one.

**Key Word:** Nonlinear viscoelasticity, recurrence plots, erythrocyte membrane, dynamic viscoelasticity, Erythrodeformeter.

### I. INTRODUCCIÓN

En trabajos previos<sup>1</sup>, se ha demostrado que el método difractométrico es adecuado para realizar el análisis viscoelástico complejo de los glóbulos rojos humanos, y resulta ser una herramienta muy útil para investigar las propiedades reológicas de estas células. Los parámetros viscoelásticos complejos de los glóbulos rojos humanos, determinados por difractometría láser, han sido y siguen siendo de gran utilidad para la detección de alteraciones producidas en distintos niveles de la membrana eritrocitaria ya sea por enfermedades tales como la diabetes, algunas anemias o la hipertensión arterial, así también como las inducidas *in vitro* por lectinas, glicosilación o policaciones sintéticos<sup>2,3</sup>.

Las mediciones realizadas con el Eritrodeformetro en régimen oscilante han permitido verificar que, para frecuencias y velocidades de corte dentro del rango fisiológico, la elongación eritrocitaria varía sinusoidalmente como lo hace la tensión de corte, con un desfase  $\delta$  que es función de la frecuencia de oscilación, es decir que los glóbulos rojos, para ese rango de tensiones de corte, pueden ser en la práctica descritos como materiales viscoelásticos lineales. Sin embargo, los resultados muestran la existencia de una componente viscoelástica no lineal subyacente<sup>1</sup>.

El método de los gráficos recurrentes (GR) permite visualizar patrones recurrentes en una serie temporal de datos. Esta técnica fue propuesta por primera vez por Eckman et al.<sup>4</sup> en 1987 para estudiar series temporales, y hallar correlaciones complejas y ocultas entre los datos. Actualmente se aplica en los más diversos

---

Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

campos tanto de la física<sup>5</sup>, la química<sup>6</sup>, la economía<sup>7</sup> etc.

### I.1 Bases Teóricas

Una serie temporal puede considerarse como una concatenación secuenciada de  $n$  medidas de un observable.

$$S = \{s_1, s_2, \dots, s_n\} \quad (1)$$

desde la cual se puede construir otra secuencia de  $N$  vectores de dimensión  $d$ ,

$$A_k = \{s_k, s_{k+\tau}, s_{k+2\tau}, \dots, s_{k+(d-1)\tau}\} \quad (2)$$

siendo  $\tau$  el retardo y  $d$  la dimensión del vector. A esta operación se la conoce como *embedding* de la serie temporal y a  $d$  se la denomina dimensión de *embedding*. Estos parámetros se eligen independientemente de la técnica GR, pues se debe apelar a otras técnicas. Por ejemplo, usando un mínimo de la información mutua<sup>8</sup> se puede obtener el valor de  $\tau$ , y con el algoritmo de *false-neighbours* se puede hallar la dimensión de *embedding*<sup>9</sup>.

Luego para cada par de vectores, se calcula la norma del máximo para generar la matriz de recurrencia booleana simétrica siguiente:

$$R_{(i,j)} = \Theta(\delta_h - \|A_i - A_j\|_\infty) - \Theta(\delta_l - \|A_i - A_j\|_\infty) \quad (3)$$

donde  $\Theta$  es la función de Heaviside. Es decir, cuando  $\delta_l < \|A_i - A_j\|_\infty < \delta_h$  a  $R(i, j)$  se le asigna el valor "1" de otra manera se le asigna el valor "0". Al intervalo  $[\delta_l, \delta_h]$  se lo conoce como pasadizo umbral. La elección de dicho pasadizo es crítica, pues si es muy estrecho se pierde información y si es muy ancho puede incluir puntos irrelevantes. Un buen criterio es el sugerido por Zbilut<sup>5</sup>, en el cual se utiliza la zona de escala fractal para elegir los posibles valores de dicho pasadizo. Dicho criterio es el usado en este trabajo para hallar los valores mas convenientes de  $\delta_l$  y  $\delta_h$ .

Para poder caracterizar los GR, Webber<sup>10</sup> introdujo una serie de cuantificadores conocidos como análisis cuantificado recurrente (ACR).

a) El primero de ellos es el *porcentaje de recurrencia* (REC), definido como:

$$REC = 100 \frac{N_r}{N_t} \quad (4)$$

donde  $N_t = \dim(R)$  y  $N_r$  es el número de puntos recursivos dados por:

$$N_r = 2\Gamma \{(i, j) / R_{(i,j)} > 0 \wedge i < j\} \quad (5)$$

siendo  $\Gamma$  la cardinalidad del conjunto. La pendiente de la región lineal del gráfico  $\log(REC)$  versus  $\log(\delta_h - \delta_l)$  es la dimensión de correlación [r11].

b) El segundo cuantificador es el *porcentaje de determinismo* (DET), definido como:

$$DET = 100 \frac{N_l}{N_r} \quad (6)$$

donde  $N_l$  es el número de puntos periódicos dados por

$$N_l = 2\Gamma \{(i, j) / (i, j) \in d_c(k, b), i < j, \forall c, k, b > 0\} \quad (7)$$

Una línea periódica de longitud  $b$ , origen  $k$  y zona  $c > 0$  se define como:

$$d_c(k, b) = \{(i, i+c) / \prod_{i=k}^{k+b} R(i, i+c) > 0\} \quad (8)$$

El DET permite caracterizar la organización del GR.

c) El tercero es llamado entropía ( $S$ ) y es definido como el cumulante de primera especie de la estadística de líneas periódicas de longitud  $b$ , es decir:

$$S = -\sum_{b=1}^H P_b \log_2(P_b) \quad (9)$$

donde  $H$  es la longitud de la línea de período máximo y  $P_b > 0$  es la frecuencia relativa de líneas periódicas con longitud  $b$ . A diferencia de la entropía definida por Shannon, éste cuantificador mide cuan alejado está el comportamiento de una señal respecto del comportamiento armónico. El máximo valor se obtiene para funciones sinusoidales y vale  $S_{max} \approx \log(H)$ . Según Webber,  $S$  representa la entropía sólo cuando se sabe de ante mano que el sistema es caótico.

d) El cuarto y último cuantificador es  $H$ . Eckman<sup>4</sup> mostró que la longitud de esta línea está relacionada con la inversa del máximo exponente de Lyapunov.

Recientemente Castellini y Romanelli<sup>11</sup> han desarrollado un eficaz algoritmo para evaluar ACR aplicado al estudio de transiciones en reacciones químicas caóticas. El objetivo del presente trabajo es extender esa metodología al estudio de la viscoelasticidad no lineal de la membrana del glóbulo rojo, tanto para glóbulos rojos de seres humanos como de ratas. La elección de dicho animal se debe a que la respuesta lineal del glóbulo rojo es similar al del glóbulo rojo humano y es utilizado habitualmente para estudios de enfermedades inducidas *in vivo*. En este trabajo se pretende determinar si hay diferencias significativas entre ambas especies cuando se estudia el comportamiento no lineal tanto por medio del ACR como por el espectro de potencias, dentro del rango fisiológico.

## II MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Glóbulos rojos humanos

Obtenidos a partir de sangre entera de donadores sanos y anticoagulada con EDTA. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su utilización, la cual se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la Internacional Society of Clinical Hemorheology y dentro de las 48 horas posteriores a su extracción.

### II.2 Glóbulos rojos de rata

La sangre, proveniente de 10 ratas macho de la línea "m" fue extraída post mortem del corazón y anticoagulada con heparina. Previamente, 6 de las ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal con aloxano, el cual induce una diabetes, y las cuatro restantes fueron consideradas como controles. La glicemia de las ratas

tratadas con aloxano fue de  $2.90 \pm 0.80$  a las 48 horas de la inyección y se mantuvo dentro de ese rango durante las dos semanas del trabajo.

### II.3 Preparación de la suspensión

La muestra de sangre entera fue suspendida en un medio viscoso isotónico, constituido por una solución al 5% w/v de polivinil-pirrolidona (PVP 360 Sigma, PM 360 kDa) en buffer fosfato salino (PBS: 0.150 M NaCl, y 0.005 M; pH  $7.4 \pm 0.05$ ;  $295 \pm 8$  mOsmol/kg). La viscosidad del medio fue ajustada a  $22 \pm 0.5$  cp a  $25^\circ\text{C}$ .

### II.4 Sistema de medición

Una capa delgada de la suspensión de eritrocitos es colocada entre los dos discos horizontales y concéntricos del Eritrodefómetro. El disco superior es fijo y el inferior es móvil. Una fuente de alimentación ajustable provee al motor de un voltaje estacionario o de un voltaje sinusoidal oscilatorio. En régimen estacionario el disco inferior rota a velocidad constante. En régimen dinámico el disco inferior rota a velocidades que puede variar sinusoidalmente con seis frecuencias preestablecidas: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, y 3 Hz. Un haz láser atraviesa la muestra perpendicularmente a la suspensión de eritrocitos produciendo un patrón de difracción que es circular para los glóbulos rojos en reposo y elíptico para los glóbulos rojos deformados bajo la tensión de corte.

### II.5 Análisis de la Serie Temporal

La serie temporal obtenida del adquisidor de datos se filtró para eliminar toda respuesta en frecuencia sinusoidal conocida. Para ello se utilizó una ranura de frecuencia<sup>12</sup>. Al residuo resultante  $r(t)$  se lo filtró nuevamente con un filtro Savitzky-Golay<sup>13</sup> de sexto

orden, lo cual permite eliminar fenómenos de ruido blanco en los datos. Cabe destacar que este es un filtro F.I.R. (Finite Impulse Response) y no un I.I.R. (Infinite Impulse Response) por lo que el comportamiento del atractor no es afectado por este tipo de filtrado<sup>14</sup>. Luego se normalizaron los datos a media nula ( $\mu = 0$ ) y varianza unidad ( $\sigma^2 = 1$ ). La serie temporal filtrada contiene el comportamiento no lineal buscado con una óptima relación señal ruido.

TABLA 1: FRECUENCIAS DOMINANTES

Excitación (Hz)	$f_1$ (Hz)	$f_2$ (Hz)	$f_3$ (Hz)	$f_4$ (Hz)
0,5	0,92	<b>1,04</b>	1,09	1,14
1	1,23	1,32	1,82	<b>2,09</b>
1,5	1,11	1,17	<b>1,23</b>	2,86

Como puede verse en la figura 1 para distintas frecuencias de excitación fisiológicas aparecen una serie de picos de resonancia. En la tabla 1 se muestra el valor numérico de la frecuencia para dichos picos en glóbulos rojos humanos, sólo se tabulan los valores de frecuencias más dominantes. Los valores resaltados en negrita corresponden a los picos de mayor amplitud. Con distintos valores de frecuencia se encontraron análogos resultados en los glóbulos rojos de ratas sanas y aloxanizadas. Esto sugiere la presencia de un atractor que es sensible a pequeños cambios de su entorno y de la especie a la cual se investiga. El ACR permite cuantificar el comportamiento topológico del atractor encontrado.

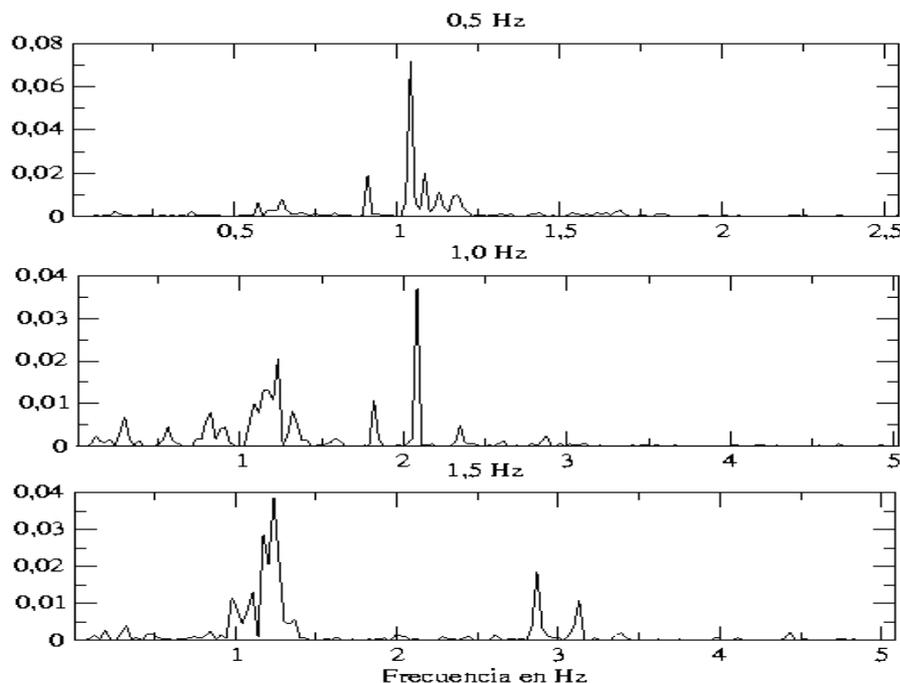


Figura 1: Espectro de potencias para el residuo no lineal,  $r(t)$ , para glóbulos rojos humanos sanos. Como se puede observar para las distintas frecuencias de excitación aparecen una serie de picos de frecuencias dominantes.

Antes de aplicar el algoritmo ACR, se determinó cual es el retardo promedio  $\tau$ , investigando el mínimo de la información mutua. El valor obtenido en paso de muestreo resultó ser  $\tau=10$ . El valor concreto en segundos depende de la frecuencia de muestreo del adquisidor y es de poca relevancia en este tipo de análisis. Previo a calcular la dimensión del *embedding* por el método de *false-neighbours* se estimó la ventana de Theiler<sup>15</sup> en paso de muestreo, cuyo valor fue  $\tau_{Th}=15$ . La dimensión de *embedding* calculada fue  $d=5$ . En función de estos datos se generó la serie de vectores retardados para aplicar el ACR.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se calculó la dimensión de correlación  $C_2$  por medio del algoritmo de Grassberger Procaccia (G-P)<sup>16</sup>. Los

ensayos realizados con glóbulos rojos de sangre humana dieron un valor de  $C_2 = 3,48 \pm 0,68$ .

Como se puede apreciar en la figura 2 la región en la cual la estimación de  $C_2$  se hace independiente de  $d$  y  $\epsilon$  es reducida, dando un resultado poco convincente.

En cambio cuando se usó el ACR, figura 3, para evaluar la dimensión de correlación y el ancho del pasadizo resultó ser independiente no sólo de la frecuencia de excitación sino también de la especie en particular en el caso de glóbulos rojos de individuos sanos. Esto sugiere que la topología del atractor es única con una dimensión calculada de  $C_2 = 3,50 \pm 0,29$  que concuerda en probabilidad con el valor antes obtenido. Un detalle interesante a tener en cuenta es que en el caso de ratas aloxanizadas esta dimensión se acerca a un valor  $C_2 = 4,00 \pm 0,31$ .

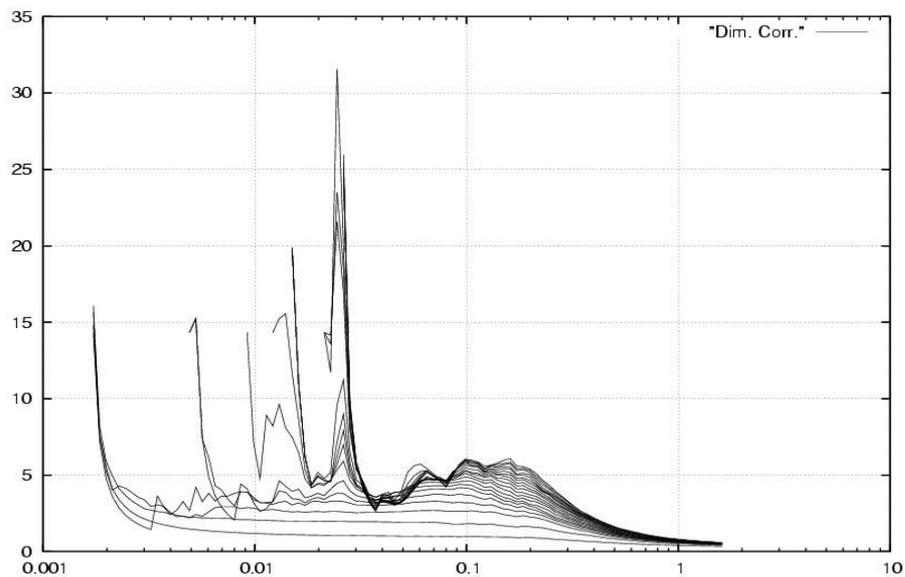


Figura 2: Gráfico de curvas de dimensión de correlación calculada por el método de G-P para diferentes dimensiones de embedding en función del radio del cubrimiento  $\epsilon$ .

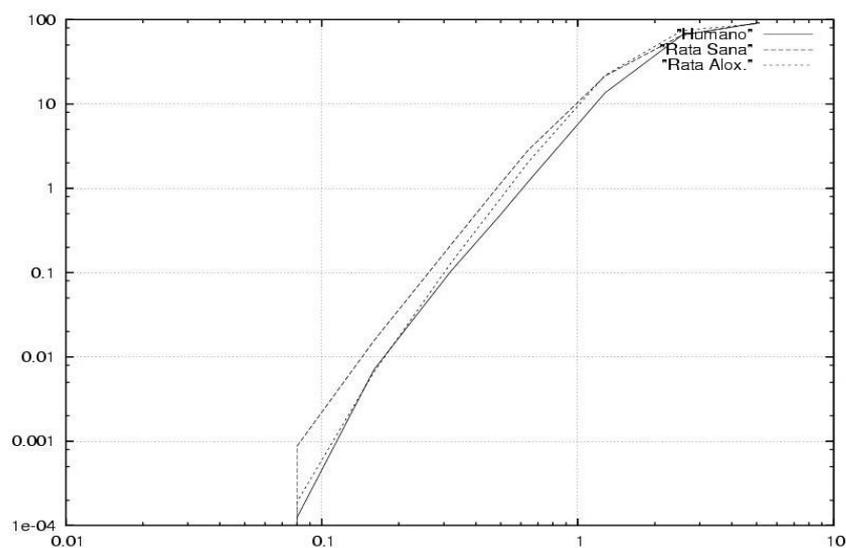


Figura 3: Gráfico log-log de REC versus ancho del pasadizo para glóbulos rojos humanos, glóbulos rojos de ratas sanas y ratas aloxanizadas.

En función de este resultado, el ancho del pasadizo calculado fue de  $\delta_h - \delta_l = 0,64$ . Luego, se utilizó el algoritmo ACR para calcular la longitud máxima H y la entropía S como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2: LONGITUD MÁXIMA Y ENTROPÍA DE LAS MUESTRAS

Muestra	H (Puntos)	S (bits/ut)
Humana a 0,5 Hz	285	1,82
Humana a 1,0 Hz	241	1,66
Humana a 1,5 Hz	165	1,66
Rata sana a 0,5 Hz	343	2,21
Rata sana a 1,0 Hz	845	2,51
Rata sana a 1,5 Hz	843	2,13
Rata alox. a 0,5 Hz	304	1,77
Rata alox. a 1,0 Hz	234	1,3
Rata alox. 1,5 Hz	319	1,62

#### IV. CONCLUSIONES

Resultados obtenidos previamente en muestras de ratas tratadas con aloxano, no mostraron alteraciones en los parámetros hemorreológicos lineales como la deformabilidad y la agregación eritrocitaria debido a la diabetes inducida por este tratamiento<sup>17</sup>. Sin embargo, en este trabajo encontramos que la dimensión de correlación  $C_2$ , medida con ACR, permitió observar diferencias con relación a los controles. Por otro lado, como se aprecia en la Tabla 2, la entropía muestra diferencias entre los glóbulos rojos humanos sanos y los glóbulos rojos de ratas sanas, indicando que estos últimos presentan una menor no linealidad como lo ratifica el parámetro H. En cambio es interesante destacar la sensibilidad del método cuando las ratas son afectadas por la diabetes inducida por el aloxano, pues la entropía se muestra mucho menor para estos glóbulos rojos de ratas alterados que para los controles. Igual resultado se observa en H. Los motivos de este comportamiento no han sido hasta ahora descifrados, planteándose estas inquietudes para estudios futuros.

En este estudio se concluye que los parámetros determinados mediante el uso del ACR son de gran sensibilidad para detectar alteraciones en la membrana del glóbulo rojo, no detectables por otras técnicas. En consecuencia, estos resultados serían de gran aplicabilidad en la investigación biomédica.

#### V. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Noriyuki Hisano y a sus colaboradores por la provisión de las muestras de sangre de ratas utilizadas así también como por el

proceso de inyección de aloxano realizado en las mismas.

#### REFERENCIAS

- Riquelme B., Rasia R. Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano. Anales AFA Vol. 9:255-259, (1997).
- Riquelme B., Foresto P., D'Arrigo M., Valverde J. A Dynamic and Stationary Rheological Study of Erythrocytes Incubated in a Glucose Medium, Journal Bioch. and Biophys. Methods 62:131-141 (2005).
- Riquelme B., Valverde J., Rasia R. Complex viscoelasticity of normal and lectin treated erythrocytes using laser diffractometry, Biorheology 35(4,5):325-334 (1998).
- Ekmann J., Kamphorst S. y Ruelle D., Recurrence plots of dynamical systems. Europhys. Lett. 4, 973 (1987).
- Zbilut J., Zaldívar J. y Strozzi F., Recurrence quantification based Liapunov exponents for monitoring divergences in experimental data. Phys. Lett. A, 297: 173-181 (2002).
- Rustici M., Caravati C., Petretto E., Branca M., y marchetti N., Transition scenario during the evolution of the Belusov-Zabotinsky reaction in an unstirred batch reactor. J. Phys. Chem. A 103, 6564-6570 (1999).
- Holyst J.A. y Zebrowska., Recurrence plots and hurst exponent for financial market and foreign exchange data. Int. Jour. Theoretical and Applied Finance 3, 419 (2000).
- Fraser A. y Swinney H., Independent coordinate for strange attractor from mutual information. Phys. Rev. A 33, 1134-1140 (1986).
- Kennel M, Brown R., y Abarbanel H., Determining embedding dimension for phase-space reconstruction using a geometrical construction, Phys. Rev. A 45, 3403-3411 (1992).
- Zbilut J. y Webber C., Embedding and delays as derived from quantification of recurrence plot, Phys. Lett. A 171 199-203 (1992).
- Castellini H. y Romanelli L., Applications of recurrence quantified analysis to study the dynamics of chaotic chemical reaction, Phys. A 342 (1-2), (2004).
- Vance Dickason, "The Loudspeaker Design Cookbook", ISBN: 1882580109.
- Flannery W., B. P.; Teukolsky, S. A.; and Vetterling, W. T. Numerical Recipes in FORTRAN: The Art of Scientific Computing, 2nd ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, pp. 183 and 644-645, 1992.
- Broomhead D., Huke J., y Muldoom M., Linear filters and nonlinear systems. J. Roy. Stat. Soc. B54, 373 (1992).
- Theiler J., Spurious dimension from correlation algorithm applied to limited time serie data, Phys Rev A 34, 2427 (1986).
- Grassberger P., y Procaccia I., Characterization of strange attractors. Phys. Rev. Lett. 50, 346 (1983).
- Camero G, Foresto P., Hisano N., Carrera L., D'Ottavio A., Riquelme B., Valverde, J. Estudio hemorreológico en ratas diabetizadas con aloxano. Sociedad de Biología de Rosario, diciembre de 2005.