

UN MATERIAL VISCOELÁSTICO DE INTERÉS ESPECIAL: EL GLÓBULO ROJO HUMANO

B. D. Riquelme* y R. J. Rasia

Área Física - Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario
Grupo de Óptica Aplicada - Instituto de Física de Rosario (IFIR) - CONICET
Suipacha 535 - (2000) - Rosario - Argentina
e-mail: Riquelme@ifir. ifir.edu.ar

En este trabajo se presentan los parámetros viscoelásticos complejos de la membrana del glóbulo rojo humano, calculados a partir de mediciones realizadas con el Eritrodeformetro funcionando en régimen oscilante. Este instrumento permite analizar por difracción láser las variaciones en el diámetro de los eritrocitos sometidos a una tensión de corte oscilante. Las frecuencias de oscilación y el valor máximo de la velocidad de deformación fueron seleccionados de tal forma que coincidieran con los valores, a los que está sometido el eritrocito en la circulación sanguínea. Se comparan los resultados obtenidos con los publicados por otros autores para sangre entera y suspensiones de glóbulos rojos. A diferencia de lo que ocurre en los materiales viscoelásticos convencionales se encuentra disminución de la elasticidad dinámica (parte real del módulo elástico complejo) y un aumento de la pérdida dinámica (parte imaginaria del módulo elástico complejo) con la frecuencia de oscilación. Además del interés que puede presentar para la Física el estudio de un material de estas características, también resulta de innegable importancia en Hemorreología Clínica, ya que permite analizar la influencia de diversas alteraciones patológicas y producidas por medicamentos, relacionadas con las propiedades reológicas de los eritrocitos en circulación sanguínea.

In this paper the complex viscoelastic parameters of the human red blood cell membrane (erythrocyte) are presented. These parameters were measured with Erythrodeformeter functioning in oscillating regime. This instrument permits to analyze by laser diffraction the variations in the erythrocyte diameter under oscillating shear stress. The oscillation frequencies and the maximum shear stress value were selected of such manner that might coincide with the values to that is subjected the erythrocyte in the blood flow. The obtained results are compared with the obtained by other authors for whole blood and red blood cell suspensions. To difference of what occurs in the conventional viscoelastic materials was found decrease of the dynamic elasticity (real part of the elastic complex module) and an increase of the dynamic loss (imaginary part of the elastic complex module) with the oscillation frequency. Furthermore of the interest that can present for Physical the study of a material of these characteristics, also results of undeniable importance in Clinical Hemorheology, for to permit to analyze the influence of diverse pathological alterations and produced by drugs, related with the rheological properties of the erythrocyte membrane in blood flow.

I. INTRODUCCIÓN

Dada la facilidad de obtención de los eritrocitos (glóbulos rojos, GR) en la práctica, y por el amplio conocimiento existente de su organización molecular, la membrana eritrocitaria es frecuentemente usada como base para el estudio del comportamiento biofísico de otras membranas celulares (biomembranas). Más aún, las propiedades viscoelásticas de la membrana eritrocitaria motivan un interés especial por su influencia en el flujo sanguíneo⁽¹⁾.

La capacidad de los GR para deformarse, cuando son impulsados en el flujo vascular, ha sido universalmente reconocida como factor fundamental en la eficiencia de la circulación sanguínea y en las características viscosimétricas de la sangre. En la medida que los glóbulos rojos, con un diámetro de 8 μm , deben circular a lo largo de capilares de 3 y 4 μm de diámetro, o atravesar los portales esplénicos con secciones aun menores, tendrán que aceptar deformaciones considerables y en tiempos muy

reducidos pues de lo contrario serían detenidos y eliminados por lisis o fagocitosis, o incluso producirían la obturación capilar y la consecuente necrosis del tejido circundante. Más allá de estas consideraciones, la sangre es una suspensión de partículas, cuya deformabilidad influye fuertemente sobre la viscosidad y la circulación general. Analizada la importancia de la deformabilidad eritrocitaria no resulta extraño que las propiedades reológicas de estas células, o de sus componentes estructurales sigan siendo objeto de intensas investigaciones.

La sangre entera y las suspensiones de glóbulos rojos pueden clasificarse como materiales viscoelásticos^(2,3,4,5). Cuando están sometidas a tensiones de corte oscilatorias, su comportamiento puede ser correctamente descrito por la viscoelasticidad compleja (VC). Tal comportamiento dinámico es de gran importancia fisiológica dado que el flujo *in vivo* es pulsante y no estacionario debido al ciclo cardíaco y a los continuos cambios en el tamaño de los vasos y en las condiciones de flujo.

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

En 1972, Thurston⁽²⁾ trató de obtener la viscosidad intrínseca del GR promedio por mediciones, en flujo oscilatorio en tubos circulares, de GR suspendidos en plasma. Realizó las experiencias a una frecuencia de 10 Hz, la cual es muy alta en comparación con la frecuencia cardíaca humana (de 0.33 a 3.3 Hz)⁽⁶⁾.

Tran-Son-Tay *et al.*⁽⁴⁾ en 1986, establecieron la necesidad de conocer las relaciones generales entre el comportamiento viscoelástico de las suspensiones de GR y las propiedades de los GR individuales. Para ello midieron las componentes de la viscosidad compleja (η' y η'') de GR suspendidos en "buffer" al 80% de hematocrito, usando un viscosímetro Couette en modo oscilatorio. Aunque la deformación celular es el mecanismo elástico dominante para tal hematocrito, no puede ignorarse que las interacciones entre células afectan de forma significativa los resultados^(7,8).

Si bien la viscoelasticidad de la sangre entera y de las suspensiones de GR ha sido ampliamente estudiada, y la importancia de la viscoelasticidad de la membrana eritrocitaria ha sido resaltada como un factor preponderante, no existen hasta el momento investigaciones concretas que den valores confiables de los parámetros viscoelásticos complejos de los GR y/o de su membrana.

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Consideremos un material viscoelástico expuesto a una tensión oscilante del tipo:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t) \quad (1)$$

donde σ_0 es la amplitud de la tensión y ω es la frecuencia de la oscilación.

La respuesta del material γ está desfasada por algún valor δ ($0 < \delta < \pi/2$) con la tensión σ ⁽⁹⁾, es decir:

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t - \delta) \quad (2)$$

El módulo de elasticidad G y la viscosidad η influyen en la respuesta del material. Es usual en los experimentos oscilatorios resolver estas cantidades en la componente elástica, en fase con la tensión, y la componente viscosa, desfasada 90°. Una forma conveniente para realizar esto es emplear la notación compleja expresando las ecuaciones (1) y (2) en la forma siguiente:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t) = \Re\{\sigma_0 e^{i\omega t}\} \quad (3)$$

y

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t - \delta) = \Re\{\gamma_0 e^{i(\omega t - \delta)}\} \quad (4)$$

donde \Re es la parte real del número complejo.

Se define el **módulo de elasticidad complejo** G^* como el cociente entre la tensión compleja y la deformación compleja del material:

$$G^* = \frac{\sigma_0 e^{i\omega t}}{\gamma_0 e^{i(\omega t - \delta)}} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} e^{i\delta}$$

Expresando el número complejo en la forma trigonométrica podemos escribir:

$$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} [\cos \delta + i \operatorname{sen} \delta] \quad (5)$$

es decir:

$$G^* = G' + i G''$$

donde:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos(\delta)$$

es llamado módulo dinámico o elasticidad dinámica, y

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \operatorname{sen}(\delta)$$

es llamado pérdida dinámica.

De manera similar se puede introducir el concepto de **viscosidad compleja**:

$$\eta^* = \frac{\sigma_0 e^{i\omega t}}{\gamma_0 i \omega e^{i(\omega t - \delta)}}$$

donde el numerador es la tensión y el denominador es la velocidad de deformación compleja. Es decir:

$$\eta^* = \eta' - i \eta''$$

donde:

$$\eta' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0 \omega} \operatorname{sen}(\delta) = \frac{G''}{\omega}$$

es la componente viscosa, y

$$\eta'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0 \omega} \cos(\delta) = \frac{G'}{\omega}$$

es la componente elástica.

III. MATERIALES

Se utilizaron muestras de sangre de donadores normales, las que fueron analizadas dentro de las 48 horas de extraídas, a una temperatura de $(25,0 \pm 0,5)$ °C, de acuerdo a las recomendaciones del ICSH⁽¹⁰⁾.

Las muestras fueron preparadas para su utilización en el Eritrodefórmetro, suspendiendo 100 μ l de sangre entera (45% de hematocrito), anticoagulada con heparina, en 3,8 cm³ de una solución de polivinilpirrolidona (PVP-360 de SIGMA Chem. Co.) al 5% (P/V) en PBS (solución salina tampón fosfato): viscosidad = $(20,0 \pm 0,5)$ mPa.s, pH = $(7,40 \pm 0,05)$ y Osmolaridad = (295 ± 8) mOsmol/kg.

IV. MÉTODO

El Eritrodefórmetro, utilizado en estas experiencias, fue diseñado y construido en 1984 por R. Rasia y P. Porta⁽¹¹⁾, y se basa en el fenómeno de difracción (fig. 1). Dado que el diámetro medio del eritrocito ($\sim 7 \mu$ m) es del orden de la longitud de onda del haz láser incidente de HeNe ($\lambda \sim 600$ nm), los GR se comportan como partículas difractantes. El dispositivo óptico condiciona el proceso de difracción para generar un patrón de difracción de Fraunhofer. El patrón de difracción es elíptico cuando los GR deformados por la tensión de corte adoptan la forma de un elipsoide orientado.

Funcionando en régimen estacionario, permite obtener directamente la deformabilidad eritrocitaria, y calcular el módulo elástico y la viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria⁽¹²⁾

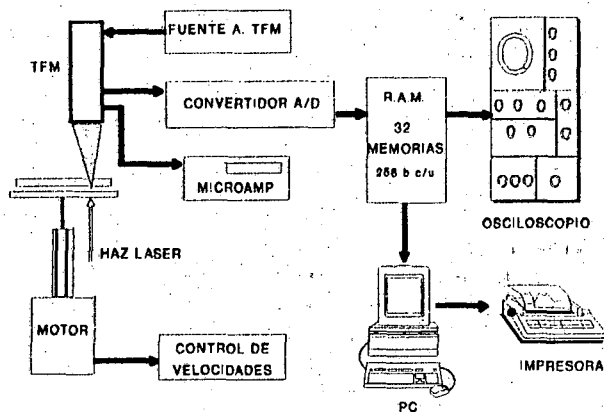


Figura 1. Esquema del eritrodeformetro

Para realizar las experiencias en régimen oscilante, se incorporó una fuente regulable de alimentación del motor. La tensión varía periódicamente produciendo una rotación permanente del disco móvil con velocidad sinusoidalmente variable. La frecuencia de la senoide puede ser seleccionada entre 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 Hz. El sistema envía una señal de sincronismo que indica el instante de aplicación de la mínima tensión de corte.

Cada muestra fue testada bajo tensiones de corte sinusoidales, donde el valor mínimo de la velocidad de deformación era $\dot{\gamma}_{\min} = (380 \pm 50) \text{ s}^{-1}$, y el valor máximo fue seleccionado en $\dot{\gamma}_{\max} = (1100 \pm 100) \text{ s}^{-1}$, del orden de la máxima velocidad de deformación en circulación sanguínea (en los capilares).

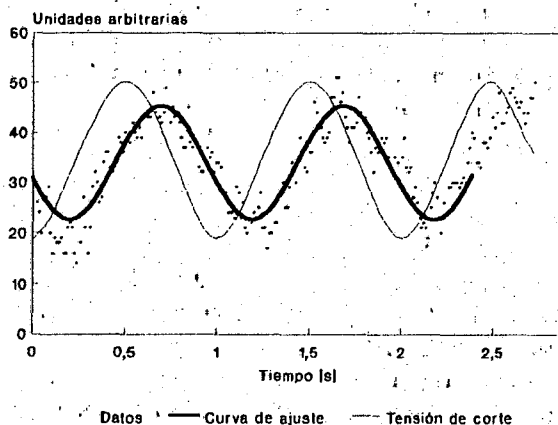


Figura 2. Respuesta de los glóbulos rojos humanos a una tensión de corte oscilante

Dada la baja concentración de GR en la solución utilizada para las mediciones, la viscosidad de la suspensión es de $\eta_1 = 22.8 \pm 0.1 \text{ cp}$, entonces la

tensión de corte mínima y máxima entre las cuales se produce la oscilación resultan ser:

$$\tau_{\min} = (87 \pm 10) \text{ dinas/cm}^2$$

$$\tau_{\max} = (250 \pm 30) \text{ dinas/cm}^2$$

Debido al movimiento circular oscilante del sistema, los GR se deforman en elipsoides cuya longitud varía con la tensión de corte con un desfase δ . La variación en el patrón de difracción es captada por el tubo foto-multiplicador (TFM). Las intensidades correspondientes al diámetro menor de la clipse de difracción son registradas en función del tiempo, resultando ser proporcionales a la elongación de los GR y desfasadas en un valor δ con respecto a la tensión aplicada (fig. 2).

Procesamiento de los datos

Los valores de δ fueron obtenidos a partir de los datos experimentales mediante el programa de cálculo "Nelder-Mead Simplex algorithm"⁽¹³⁾ el que minimiza una función no lineal de varias variables. La función que se utilizó para aproximar los datos fue:

$$f(t) = C_1 + C_2 \text{ sen}(\omega t + \delta)$$

donde C_1 y C_2 son constantes de ajuste (error < 5 %).

Para obtener el valor de σ_0 / γ_0 se consideró que cuando $f \rightarrow 0 \Rightarrow G' \rightarrow G_0$ (módulo elástico obtenido en el caso estacionario). Los parámetros estacionarios promedio de los glóbulos rojos normales son:

$$G_0 = (6.3 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ dina/cm}$$

$$\eta_m = (3.4 \pm 0.7) \cdot 10^{-4} \text{ poise}$$

Los valores de δ y G_0 obtenidos para cada muestra fueron usados para calcular los cinco parámetros dinámicos (G' , G'' , η' , η'' y l).

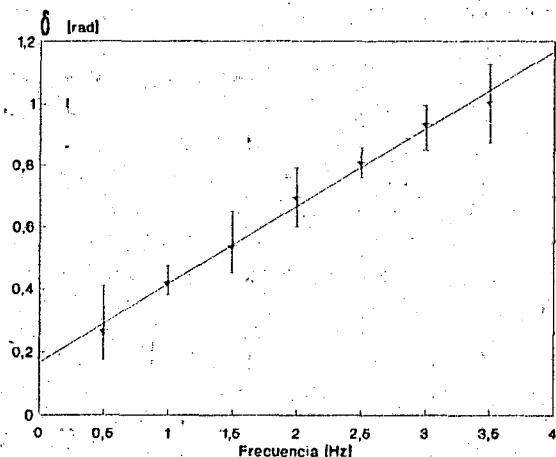


Figura 3. Desfase en función de la frecuencia de oscilación

V. RESULTADOS

En la fig. 3 se puede observar que el desfase δ resulta ser una función prácticamente lineal de la frecuencia de oscilación (coeficiente de correlación 0.992).

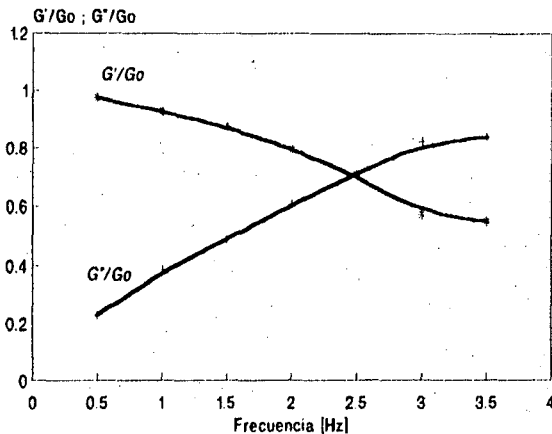


Figura 4. Módulo elástico complejo en función de la frecuencia de oscilación

En la fig. 4 se presentan las componentes del módulo elástico complejo G^* , las cuales muestran comportamientos opuestos al ser analizadas para distintas frecuencias de oscilación: el módulo dinámico G' disminuye con la frecuencia de oscilación y la pérdida dinámica G'' aumenta. Este resultado es diferente del mostrado por fluidos viscoelásticos convencionales, incluso por la sangre entera⁽⁹⁾.

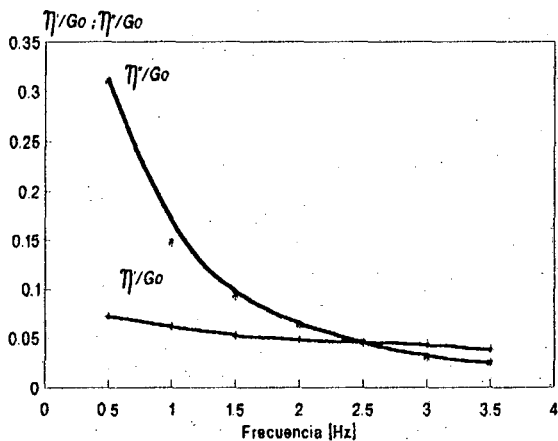


Figura 5. Viscosidad compleja en función de la frecuencia de oscilación

Las componentes de la viscosidad compleja η^* (fig. 5), disminuyen con la frecuencia de oscilación. Resultados similares fueron reportados por Tran-Son-Tay *et al.* en 1986⁽⁴⁾ para suspensiones altamente concentradas de GR. La disminución de η'' con la frecuencia, indicaría que la membrana del GR tiene características de *shear thinning*, como había sido señalado por Tran-Son-Tay *et al.* en 1988⁽¹⁴⁾. La componente elástica η'' disminuye más rápidamente que la componente viscosa η' , llegando ambos parámetros a coincidir para una frecuencia de 2.5 ± 0.2 Hz. La componente viscosa de la viscosidad compleja, η' , se mantiene por debajo del valor de la viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria η_m , tendiendo

a este a medida que la frecuencia de oscilación tiende a cero. Una tendencia similar fue señalada por Chmiel *et al.* en 1990⁽⁵⁾ para la componente viscosa de la viscosidad compleja de la sangre entera, la que tiende a la viscosidad estacionaria cuando la frecuencia tiende a cero.

El tiempo de relajación t disminuye con la frecuencia (fig. 6). Este resultado coincide también con los reportados por Tran-Son-Tay *et al.* en 1986⁽⁴⁾ para suspensiones altamente concentradas de GR.

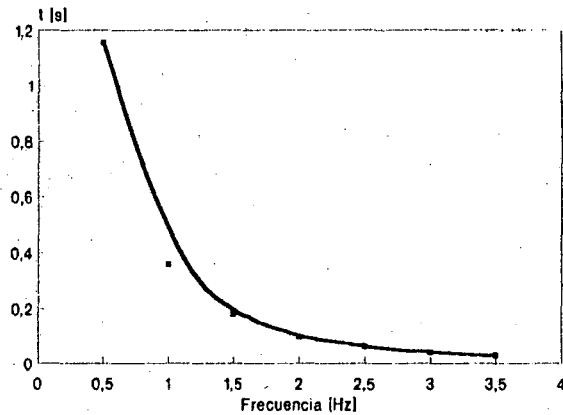


Figura 6. Tiempo de relajación en función de la frecuencia de oscilación

Ventajas del método desarrollado

- No existe manipulación previa de las muestras (como sucede en las técnicas estacionarias de micropipeta)
- No existe la interacción entre células (como en las técnicas que utilizan suspensiones altamente concentradas de GR)
- Es independiente de las propiedades viscoelásticas del plasma (se utiliza como medio de suspensión una solución de viscosidad, pH y osmolaridad controladas)
- Da resultados promedios sobre una población de GR

VI. CONCLUSIONES

Las mediciones realizadas con el Eritrodeformómetro en régimen oscilante permiten verificar que, para frecuencias y velocidades de corte dentro del rango fisiológico ($\dot{\gamma} < 1200 \text{ s}^{-1}$), la elongación eritrocitaria varía sinusoidalmente (dispersión $< 5\%$) como lo hace la tensión de corte, con un desfase δ que es función de la frecuencia de oscilación ($0 < \delta < \pi/2$), es decir, los GR, para ese rango de tensiones de corte, pueden ser correctamente descritos como materiales viscoelásticos (fig. 2).

Los parámetros viscoelásticos complejos de los GR humanos, determinados por difracción láser, son coherentes con los obtenidos por otros autores para sangre entera y suspensiones de GR.

Este método difractométrico es adecuado para realizar el análisis viscoelástico complejo de los GR

humanos, y resulta ser una herramienta muy útil para investigar las propiedades reológicas de estas células.

Se realizaron además, experiencias con GR alterados (envejecimiento⁽¹⁵⁾ y acción de lectinas⁽¹⁶⁾) las que indican que tanto la reología compleja como la estacionaria permiten detectar alteraciones en los GR con gran sensibilidad.

La comprensión de los factores que afectan el flujo sanguíneo "in vivo", en condiciones asociadas con alteraciones de las propiedades reológicas de la membrana eritrocitaria, muestran que este método puede ser aplicado con éxito en Hemorreología Clínica, para detectar, con suficiente sensibilidad, anomalías patológicas en los GR (membranopatías y hemoglobinopatías), y analizar el efecto de drogas o medicamentos.

Referencias

- 1 - Chien, S.; Sung, K.; Skalak, R.; Usami, S. and Tôzeren, A. "Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane". *Biophysical J.*, **24**, 463-487 (1978).
- 2 - Thurston, G. B. "Viscoelasticity of human blood". *Biophysical Journal*, **12**, 1205-1217 (1972).
- 3 - Thurston, G. B. "Rheological Parameters for the viscosity viscoelasticity and thixotropy of blood". *Biorheology*, **16**, 149-162 (1979).
- 4 - Tran-Son-Tay, R., Nash, G. and Meiselman, H. "Oscillatory Viscometry of Red Blood Cell Suspension: Relations to Cellular Viscoelastic Properties". *Journal of Rheology*, **30(1)**, 231-249 (1986).
- 5 - Chmiel, H., Anadere, I. and Walitza, E. "The determination of blood viscoelasticity in clinical hemorheology". *Biorheology*, **27**, 883-894 (1990).
- 6 - Cokelet, G. "Dynamics of red Blood Cell Deformation and Aggregation, and In Vivo Flow". in *Erythrocyte mechanics and blood flow*, 141-148, Alan R. Liss, Inc., New York (1980).
- 7 - Anadere, Y.; Walitza, E. and Witte, S. "Erythrocyte aggregation as derived from blood viscoelasticity - Clinical studies".
- 8 - Thurston, G. "Effects of hematocrit on blood viscoelasticity and in establishing normal values". *Biorheology*, Vol. 15, pp. 239-249 (1978).
- 9 - Ferguson, J. and Kembrowski, Z. *Applied Fluid Rheology*. Elsevier Science Publishers Ltd., London and New York (1991).
- 10 - International Committee For Standardization In Hematology. (Expert Panel of Blood Rheology): Guidelines for blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clinical Hemorheology* **6**, 563-573 (1980).
- 11 - Porta, P. y Rasia, R. "Eritrodeformetro: equipo de nuevo diseño para medir deformabilidad eritrocitaria". *Acta Bioquímica Latinoamericana*, **18**, 555-561, (1984).
- 12 - RASIA, R. Quantitative evaluation of erythrocyte viscoelastic properties from diffractometric data: applications to hereditary spherocytosis and hemoglobinopathies. *Clinical Hemorheology*, Vol. 15, No. 2, pp. 177-189 (1995).
- 13 - Jauffred, F. J. and Acosta, J. J. *Métodos de Optimización*. Atalaya Ed., México, 21-78 (1971).
- 14 - Tran-Son-Tay, R.; Coffey, B. and Hochmuth, R. "A rheological study of packed red blood cell suspensions with an oscillating ball microrheometer". *Biorheology*, Vol. 26, 143-151, (1988).
- 15 - Riquelme, B.; Foresto, P.; Valverde, J. y Rasia, R. "Alteraciones en las propiedades viscoelásticas de la sangre conservada para uso transfusional". Trabajo presentado en la 82a Reunión Nacional de Física, San Luis, pp. 16F, (1997).
- 16 - Riquelme, B.; Foresto, P.; Pla, L.; Valverde, J. y Rasia R. "Estudio de la interacción de lectinas con membranas biológicas mediante determinación de los parámetros reológicos". Trabajo presentado en la 81ª Reunión Nacional de Física, Tandil, pp. 208, (1996).