



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

ELASTICIDAD DEL SISTEMA MEMBRANA-  
CITOESQUELETO DEL ERITROCITO EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

JUANA GABRIELA CALVILLO VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: DRA. KAREN VOLKE SEPÚLVEDA

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: DR. FIDEL RAMÓN ROMERO



posgrado en ciencias físicas

u n a m

MÉXICO, D. F. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi padre (qpd)*  
*y a mi madre.*

*Para ser grande, sé entero: nada  
Tuyo exageres o excluyas.  
Sé todo en cada cosa. Pon cuanto eres  
En lo mínimo que hagas,  
Por eso la luna brilla toda  
En cada lago, porque alta vive.*

*Ricardo Reis*

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Alicia Ortega por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 1 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por haberme escuchado, discutido y aconsejado durante los seminarios: Rocío Álvarez, Joel Medina, Erandeni Rodríguez, Pável Vázquez, Francisco Pérez, Ricardo Ramírez, Aura Jiménez, Aldo Tirado, Luis Cruz y Jesús Vega. En particular agradezco al Med. Cir. Aldo Alejandro Tirado Cortés y al Biol. Luis Alberto Cruz Silva, quienes con su experiencia y tiempo colaboraron entusiastamente conmigo a lo largo de la fase experimental de este proyecto.

Al Dr. Fidel Ramón y Dra. Karen Volke por aceptar ser parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Enrique Díaz por aceptar ser parte de mis sinodales de la maestría y ser mi profesor durante la licenciatura.

A la M. En C. Paola Ballesteros Zebadúa y al Dr. Fidel Ramón por ser parte de mis sinodales y por su apoyo durante la realización de este proyecto.

Al Dr. José Álvarez Chávez por aceptar ser parte de mi jurado.

A todos los profesores de la maestría con quienes tuve la gran fortuna de tomar clases y aprender mucho de ellos.

Al Dr. Manuel Torres y Yanalté Herrero, por su interés y apoyo durante la estancia en el Posgrado de Física.

Agradezco a las diferentes Dependencias de la UNAM, Instituciones del Sector Salud y al CONACyT por permitirme el uso de sus instalaciones y recursos a lo largo de este proceso:

Al Posgrado del Instituto de Física de UNAM que me abrió sus puertas para poder realizar la Maestría en Ciencias Física Médica. A la UNAM por sus Programas de Posgrado de alta calidad.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por permitirme realizar gran parte de los experimentos en sus instalaciones.

A la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Investigación Biomédica de la UNAM.

Al Dr. David García Díaz, Dr. Froylán Gómez Laguna y a la Biól. Isabel Arenas Reyes del Laboratorio de Biofísica de Membranas del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en donde se hicieron las micropipetas utilizadas en este estudio.

A las distintas instituciones hospitalarias visitadas en la residencia médica por darme un panorama amplio de la utilidad del físico médico en un hospital.

Al Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, por otorgarme las muestras de sangre.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, donde laboro, en particular al Dr. Célis, Dr. Sergio Moreno, M. en C. José Manuel Lárraga, M. en C. Paola Ballesteros, M. en C. Mariana Hernández, M. en C. Amanda García y M. en C. Olga Olinca Galván, por haberme apoyado a la realización de mi tesis de maestría.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo a través de la beca (#55199) otorgada durante el primer año y medio de mi programa de maestría y por su apoyo a través del donativo (CONACYT-24792) otorgado a la Dra. Alicia Ortega para la realización del proyecto.

A la Dirección General del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA- IN227809) de la UNAM por apoyar el proyecto durante el tiempo de la terminación de mi trabajo de tesis.

A mis amigos de la maestría Erandeni Rodríguez, Joel Medina, Dante Nava, Jaime Rodríguez por su amistad y los momentos gratos que compartimos.

A mis amigos: Gabriela García, Mario Monroy, Paulina Arellano, Eugenia López y Brenda Esquivel por su amistad, cariño y apoyo durante mi vida.

A mi familia: mi madre María Teresa Vázquez, mis hermanas: Teresa, María de Jesús, Marina Enriqueta, Ana Luisa y María del Refugio, y mis sobrinos: Luisito, Víctor y el bebé, por su cariño y apoyo para la realización de mi vida profesional. A mi padre, que ya no alcanzó a ver terminado este proyecto, le agradezco el tiempo y la dedicación para mostrarme la vida desde otra perspectiva.

A Jorge Álvarez, con quien comparto mi vida, por su amor y apoyo en todo momento.

A todas aquellas personas que forman parte de las experiencias de mi vida, muchas gracias.

# ÍNDICE GENERAL

---

Resumen .....	2
Agradecimientos .....	5
CAPÍTULO 1	
Antecedentes .....	10
1.1 Diabetes Mellitus (DM) .....	10
1.1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus .....	11
1.1.2 Consecuencias vasculares de la DM .....	12
1.1.3 Epidemiología de la DM en el mundo .....	17
1.1.4 Estadísticas en México .....	19
1.2 Origen del eritrocito .....	22
1.2.1 Hematopoyesis .....	22
1.2.2 Eritropoyesis .....	23
1.2.3 Composición del plasma sanguíneo .....	25
1.3 Forma del glóbulo rojo .....	27
1.3.1 Anormalidades morfológicas del eritrocito .....	29
1.4 Estructura de la membrana eritrocitaria .....	34
1.4.1 Proteínas integrales y periféricas .....	34
1.4.2 Citoesqueleto .....	39
1.4.3 Hemoglobina (Hb) .....	42
1.5 Glucosilación de las proteínas .....	44
1.5.1 Características de las Especies Reactivas .....	45
1.5.2 Etapas Reversibles del Proceso de Glucosilación .....	46
1.5.3 Glucosilación de Proteínas en la Diabetes Mellitus y el Envejecimiento del Eritrocito .....	46
1.6 Función del eritrocito .....	48
1.7 Reología .....	49
1.7.1 Estrés y Esfuerzo .....	49
1.7.2 Elasticidad ( $\mu$ ) .....	50
1.8 Elasticidad del sistema Membrana-Citoesqueleto .....	52

1.8.1 Análisis teórico de la succión con micropipetas .....	52
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Planteamiento del Problema .....	57
Hipótesis .....	57
Objetivo.....	57
Objetivos Particulares .....	58
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Metodología Experimental .....	59
3.1 Separación de los eritrocitos.....	59
3.1.1 Centrifugación Diferencial.....	59
3.1.2 Homogeneidad de la muestra .....	60
3.1.3 Citometría de flujo .....	61
3.2 Micropipetas .....	67
3.2.1 Micropipetas .....	67
3.2.2 Sistema para micromanipulación.....	69
3.2.3 Succión del eritrocito .....	70
3.2.4 Aplicación del Teorema de Bernoulli al sistema de succión.....	71
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Análisis de Resultados.....	73
4.1 Citómetro de Flujo .....	73
4.1.1 Casos Control .....	73
4.1.2 Casos de pacientes con DMT2 sin tratamiento médico .....	75
4.1.3 Caso tratado con glibencamida.....	77
4.1.4 Caso de pacientes insulino dependientes.....	78
4.1.5 Caso con hiperglucemia .....	79
4.2 Aspiración con Micropipetas.....	81
4.2.1 Caso Control .....	81
4.2.2 Caso con Diabetes Mellitus .....	87
4.2.3 Comparación entre el caso control y el diabético.....	91
<b>CAPÍTULO 5</b>	
Discusión .....	93
Citometría de Flujo.....	93

Aspiración con Micropipetas.....	95
Índice de Figuras .....	98

## RESUMEN

La deformabilidad del eritrocito (cuyo tamaño es del orden del diámetro de los vasos sanguíneos más pequeños), juega un papel muy importante en la microcirculación, ya que tiene que deformarse lo suficiente para pasar por las arteriolas y capilares, para luego regresar a su estado inicial en las vénulas, y así llevar a cabo el transporte de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) hacia y desde los tejidos a la ventilación pulmonar. La alteración en esta propiedad está asociada a un cambio reológico del mismo cuando se encuentra inmerso en altas concentraciones de glucosa, como sucede en la Diabetes Mellitus. Esto tiene como consecuencia la disminución en la perfusión sanguínea e hipoxia celular, disfunción del endotelio vascular y agregación celular, resultando en una disminución de la vida media del eritrocito. Es por ello que en este trabajo se evaluó la elasticidad asociada a la deformabilidad del eritrocito en pacientes diabéticos y sujetos control, con el propósito de implementar un parámetro que indique el riesgo vascular al que se encuentran sometidos los pacientes.

Los resultados citométricos muestran un aumento de tamaño y alteraciones en la forma del eritrocito de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, comparados con los sujetos control. Incluso hay diferencias significativas entre eritrocitos de pacientes diabéticos tratados con insulina, glibencamida y aquellos sin tratamiento médico.

La elasticidad, asociada con la deformabilidad de los eritrocitos (discocitos) de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 insulino dependientes estudiados en este trabajo es aproximadamente el doble del caso control, lo que indica que el sistema membrana-citoesqueleto de los eritrocitos de pacientes con este padecimiento es más elástico que el caso control durante la deformación, ya que posteriormente pierden sus propiedades elásticas porque se rebasa su límite elástico, comportándose de forma plástica hasta lograr su ruptura. En cambio, los eritrocitos de sujetos control siguen siendo elásticos antes y después de la deformación.

# CAPÍTULO 1

---

## ANTECEDENTES

### 1.1 DIABETES MELLITUS (DM)

La Diabetes Mellitus (DM) es un síndrome caracterizado por alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos que surge como consecuencia de diversos factores como predisposiciones genéticas y/o ambientales, dependiendo del medio en el que se desarrolle el individuo. Esto resulta en una variación excesiva de los niveles de glucosa, ya sea hiper o hipoglucemia, lo que ocasiona la aparición y progresión de las complicaciones vasculares en la diabetes mellitus [1]. La presencia de genes anormales o polimorfismos que ocasionen el deterioro de la sensibilidad a la insulina, como la obesidad y otros factores genéticos predisponentes, no necesariamente son determinantes para este padecimiento; sin embargo, está reportado que incrementan el riesgo [2].

La insulina es una hormona que se produce en las células beta del páncreas. Inicia, a través del receptor para insulina presente en la mayoría de las células (como el hígado, músculo, adipocito, incluyendo al eritrocito), una cascada intracelular de señalización para expresar al transportador de glucosa (GLUT) en la membrana, y, a través, de esta proteína se internaliza la glucosa, ya sea para ser utilizada como fuente energética en la glucólisis o para almacenarla como glucógeno (que es un polisacárido de reserva energética, formado por cadenas de glucosa), en el hígado y en el músculo. Este mecanismo mantiene los niveles de glucosa en plasma entre  $70 - 105 \text{ mg/dL}$  ( $3.89 - 5.83 \text{ mmol/L}$ ) [3]. Cuando no hay insulina, hay en menor cantidad o no se expresa el receptor para la misma o los GLUT, la glucosa no se asimila; por lo tanto, las concentraciones de glucosa plasmáticas aumentan provocándose un desequilibrio metabólico generalizado dando lugar a las primeras manifestaciones de la DM. En pacientes diabéticos los niveles de glucosa se mantienen por encima de los  $130 \text{ mg/dL}$  ( $20 \text{ mmol/L}$ ) [4]; incluso, un nivel de glucosa por arriba de los  $100 \text{ mg/dL}$  en un adulto joven (tomando en cuenta el índice de masa corporal,  $< 25$ , y los triglicéridos,  $150 \text{ mg/dL}$ ), puede ser un factor determinante para el riesgo de padecer DMT2 [5].

La diabetes se desarrolla debido a una disminución de la producción de insulina (Tipo 1) o resistencia a sus efectos (Tipo 2 y gestacional). Ambas llevan a la hiperglucemia que causa los siguientes síntomas debido a un aumento en la osmolaridad de la sangre: polidipsia (incremento de la sed), poliuria (aumento en la producción de orina), polifagia (necesidad en la ingesta de alimentos por la deprivación celular de glucosa), pérdida de peso (por el consumo secundario del tejido graso) y letargo [6].

### **1.1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus**

#### ***Diabetes Mellitus Tipo I (DMT1)***

El sistema inmunológico ataca las células beta del páncreas, encargadas de producir la insulina, por una susceptibilidad o predisposición genética, además de existir la posibilidad de un factor desencadenante ambiental (infección viral, estrés, toxinas, etc.), tras el cual aparece el proceso inmunológico frente a las propias células beta, que son destruidas.

Los anticuerpos que están presentes en la reacción inmunológica pueden ser detectados en el plasma sanguíneo durante meses, incluso años antes del desarrollo de esta enfermedad; por lo tanto se consideran marcadores de un estado *prediabético*.

Debido a que la DMT1 se desarrolla más comúnmente en niños y jóvenes se le ha denominado *Diabetes Juvenil*. Además, ya que estos individuos no pueden producir la insulina, requieren de un suministro externo de ésta para regular los niveles de azúcar, por esta razón también se le ha denominado *Diabetes Insulinodependiente*.

#### ***Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)***

En esta clasificación la DM es producida por una disminución de la producción de insulina o de la interacción con su receptor. Generalmente inicia en la edad adulta y se considera un síndrome progresivo caracterizado por tres componentes: resistencia a la acción de la insulina en el músculo; déficit no autoinmune de la secreción de insulina por la célula beta, es decir, poca producción de la hormona; y aumento agudo de la producción hepática de glucosa (secundaria a estimulación adrenérgica).

En la DMT2 la deficiente producción de insulina y, por ende, la baja funcionalidad de ésta, hace que se vea afectado gravemente el metabolismo celular, debido a que no hay glucosa disponible para utilizar como energía en los procesos celulares; esto resulta en un aumento de ácidos grasos para ese fin, originando cuerpos cetónicos, que son productos de desecho que causan una elevación excesiva del nivel de ácido en la sangre, ocasionando cetoacidosis diabética y triglicéridos; además de un descenso en la concentración de lipoproteínas de alta densidad (LDH por debajo de 35mg/dL), contribuyendo esto al riesgo de daño vascular.

#### ***Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)***

Ésta se desarrolla durante el embarazo. Aunque no se conoce la causa específica, se sabe que las hormonas producidas en la etapa gestacional reducen la capacidad que tiene el cuerpo de utilizar y responder a la acción de la insulina.

La DMG afecta del 3 al 10% de mujeres embarazadas; sus bebés nacen con niveles muy altos o muy bajos de glucosa también, que hacen que aumenten de peso (síndrome de bebé macrosómico), además de que pueden nacer con ictericia, enfermedad producida por los altos niveles de bilirrubina en la sangre (subproducto de la degradación de la hemoglobina por muerte de los eritrocitos) (Figura 1).



Figura 1. Diabetes gestacional [7].

### 1.1.2 Consecuencias vasculares de la DM.

La duración de la diabetes se ha considerado la causa por la que se desarrollan problemas cardiovasculares como la retinopatía, nefropatía, neuropatía diabética, pie diabético, entre otras. Ya que durante las primeras dos décadas del desarrollo de la DM, casi todos los pacientes con DMT1 y más del 80% de la DMT2 cursan con complicaciones microvasculares. El sistema vascular es una extensa e intrincada red de vasos de diferentes calibres, en donde la mayor extensión se encuentra en el lecho arteriolar y capilar, como se puede observar en la siguiente figura [8].

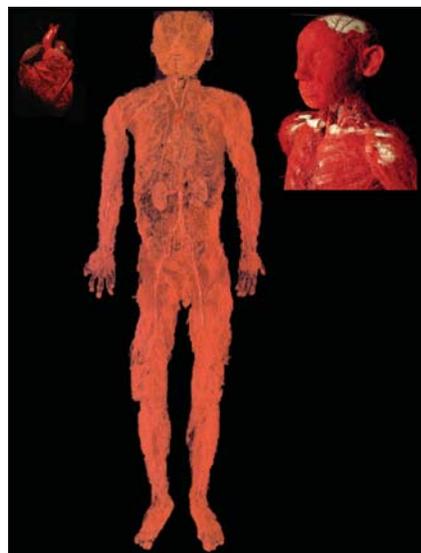


Figura 2. Disecciones anatómicas de Gunter Von Hagen [9].

## Retinopatía Diabética (RD)

La RD es una microangiopatía progresiva, consecuencia de la DM en etapa crónica, caracterizada por lesiones y oclusión de vasos retinales pequeños [10].

La retina recibe la sangre de dos fuentes independientes: los vasos sanguíneos localizados en el centro de la misma y la base vascular coroidal (Figura 3a). La última estructura suministra un tercio de la parte externa de la retina, el epitelio pigmentario y la capa fotoreceptora y plexiforme. Los otros dos tercios de la retina son alimentados por los vasos centrales de la misma, que entran y salen del globo ocular mediante el nervio óptico (Figura 3b).

Los capilares retinales tienen un diámetro que varía entre  $5 - 10\mu m$ , y su pared endotelial de  $0.1 - 0.3\mu m$  de espesor [11]. Durante la diabetes estas estructuras se ven severamente afectadas, ya que se engrosa la membrana basal del endotelio capilar, disminuyendo la luz de los mismos produciendo aneurismas (Figura 4) y ruptura de los capilares; además hay pérdida de células epiteliales de la retina que ocasiona la filtración de lípidos y líquidos.

El deterioro en los capilares que van más allá de la retina corresponde a la llamada RD no proliferativa, que se caracteriza por la presencia de isquemia retinal, debido a la oclusión de capilares, lo que desencadena la formación de nuevas vascularizaciones alrededor del nervio óptico, extendiéndose en el cuerpo vítreo. Estos neovasos son histológicamente diferentes a los retinales, son más frágiles y, en consecuencia, tienden a romperse, ocasionando filtración extravascular, hemorragias y desprendimiento de la retina. La RD proliferativa persiste sólo en la retina y no pasa más allá de la membrana interna que la limita [12].

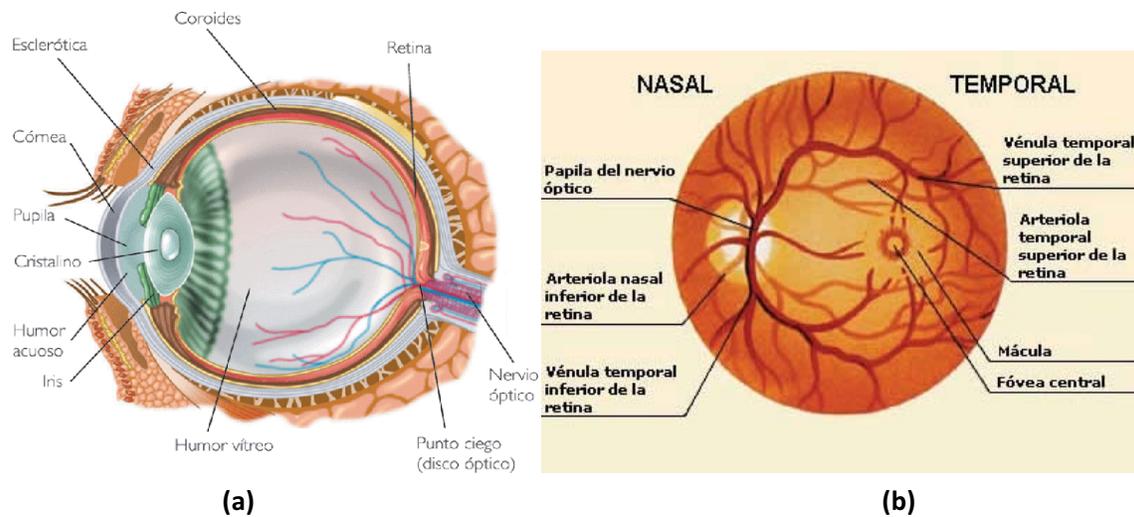


Figura 3. (a) Estructura ocular. (b) Arterias y venas de la retina [13].

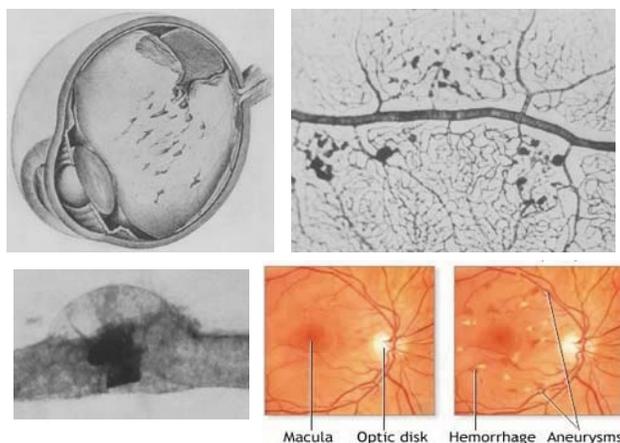


Figura 4. Ejemplo de aneurismas y ruptura de los capilares [11, 14].

En general, la retinopatía diabética es la más evidente manifestación microvascular de la DM, principal causa de morbilidad en los pacientes diabéticos, y de ceguera, en adultos mayores, lo cual disminuye la calidad de vida.

Esta enfermedad transcurre de forma silente y se manifiesta cuando ya está avanzada, limitando la visión o desprendiendo la retina. Su incidencia, como ya se mencionó anteriormente, aumenta con la duración del síndrome de la DM, alcanzando del 80 – 99% de los casos en los primeros 20 años. La alta frecuencia de la retinopatía diabética al diagnóstico de la DMT2, se debe a que este padecimiento se inició de 4 a 7 años antes del diagnóstico clínico. A los 10 años de enfermedad se calcula que del 20 al 30% de los pacientes diabéticos presentan RD, creciendo al 80% cuando se llega a la segunda década.

En el caso de la DMT1, a los 5 años de diagnóstico de este padecimiento se ha encontrado que el 25% de los pacientes padece RD, y crece hasta el 100% al llegar a los 20 años de evolución.

### ***Nefropatía Diabética (ND)***

Esta complicación aparece en cualquiera de las clasificaciones de la DM y está acompañada de RD e hipertensión arterial. La presencia de la ND se asocia con un riesgo de muerte cardiovascular de 20 a 40 veces mayor que si no se tuviera nefropatía. La incidencia, como la RD, aparece con la duración de la diabetes. En el caso de la DMT1, la ND corresponde al 30% de los casos, oscilando entre el 10 y el 40% en la DMT2 [15].

La ND es una insuficiencia renal crónica (Figura 5). Sin embargo, en el caso de la DMT1, la ND viene acompañada de: hiperfiltración, nefromegalia, nefropatía incipiente, nefropatía manifiesta e insuficiencia renal. La duración de cada estadio varía entre 3 y 6 años. Durante los tres primeros se puede detectar un aumento en la albúmina: 30-300mg/día, o 20-200µg/min, a esto se le llama microalbuminuria y va incrementándose hasta que se presenta la proteinuria, y con ello la fase de nefropatía manifiesta. Los pacientes diabéticos con evidencia de nefropatía tienen de 5 a 10 veces más alta incidencia de retinopatía. Por lo tanto, la albuminuria en la sangre no sólo se asocia con el daño renal, sino con el cardiovascular, como sucede en la DMT2.

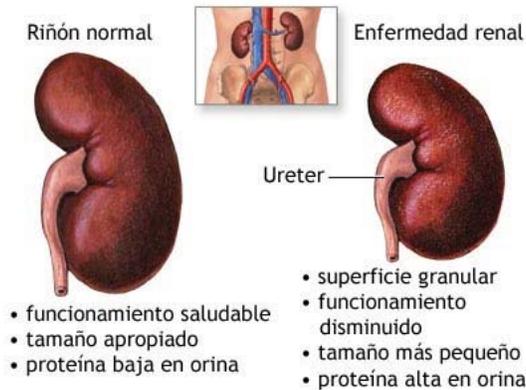


Figura 5. Comparación entre riñón sano y con enfermedad renal [16].

Un indicativo de fallo renal es la presencia de albúmina en la orina, lo que indica una pérdida de la capacidad de filtración en donde moléculas de alto peso como la albúmina, son eliminadas en condiciones normales. Ésta es la proteína principal de la sangre y la más abundante en el ser humano. Durante el daño renal se producen anomalías tanto metabólicas como vasculares, ya que existe la presencia de óxido nítrico (NO) que indica reactividad endotelial. Conforme el padecimiento progresa, comienza la macroalbuminuria o proteinuria: la cantidad de albúmina aumenta, la función eficaz de filtración comienza a caer, resultando en la retención de varios desechos y el incremento de la presión arterial para compensar el proceso de daño.

Los marcadores de esta disfunción son, entre otros, la urea nitrogenada y creatinina, ya que son sustancias de desecho que normalmente se excretan por los riñones. La urea se produce a partir de la degradación de las proteínas, su nivel normal en la orina es de  $7 - 20 \text{ mg/dL}$ . La creatinina es un metabolito de la creatina que se encuentra en el músculo esquelético. El nivel normal va de  $0.8 - 1.4 \text{ mg/dL}$  (las mujeres tienen una creatinina más baja porque usualmente tienen menos músculo que los hombres). El descenso de la creatinina se asocia con el bajo volumen de músculo esquelético. Éste funciona principalmente a base de glucosa, si en la DM hay altas concentraciones de glucosa pero no hay insulina suficiente para asimilarla, el músculo disminuye su volumen y, por lo tanto, baja la cantidad de su producto de degradación: creatinina [17].

### **Neuropatía Diabética (NeD)**

Es el resultado de la isquemia debido al daño microvascular, que afecta directamente a los nervios, traduciéndose esto en la pérdida de la sensibilidad (disestesia). Esto conlleva a la poca percepción de las úlceras que se producen en cualquier parte de la piel dañada. El pie diabético es la lesión externa más observable y frecuente que cursa con infecciones muy severas [18].



Figura 6. Representación del daño vascular en el pie diabético [19, 20]

Las causas que la desarrollan son: factores metabólicos como alta glucosa en sangre y pérdida de la sensibilidad, lo que ocasiona que las lesiones resulten en infecciones bacterianas que se potencian por la alta glucosa y la pérdida de la oxigenación del tejido. La inflamación de los nervios produce daños mecánicos a los mismos, representándose como el síndrome de túnel carpiano, en donde el nervio que va del antebrazo hasta la mano se atrapa dentro del túnel carpiano, a nivel de la muñeca, y se presiona, disminuyendo la sensibilidad y movimiento de algunos dedos; factores hereditarios que aumentan la susceptibilidad al daño nervioso, y factores de vida como fumar o tomar alcohol.

La NeD puede ser periférica [21], que causa dolor y pérdida de la sensibilidad en las extremidades (pie diabético), además de pérdida de balance y coordinación; la neuropatía autonómica causa cambios en la digestión (constipación), disminución o deterioro de la función sexual, transpiración (no hay regulación de la temperatura corporal), afecta los nervios del corazón que ayudan al control de la presión y control de la glucosa, daña la sensibilidad de la pupila a la luz; la neuropatía proximal causa dolor en muslos, caderas o nalgas y debilita las piernas, causando incapacidad de pararse o sentarse sin ayuda; la neuropatía focal debilita un nervio o grupo de nervios causando debilidad muscular, doble visión, parálisis facial, dolor en la espalda, pelvis, pecho, estómago, pies, etc. Esta última es la más dolorosa e impredecible que ocurre en los pacientes con diabetes muy avanzada, sobre todo si son adultos [22].

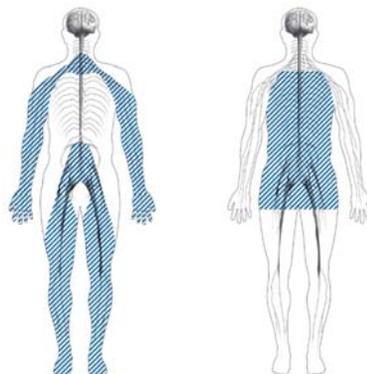


Figura 7. Neuropatía periférica (izquierda) y autonómica (derecha) [18].

### 1.1.3 Epidemiología de la DM en el mundo

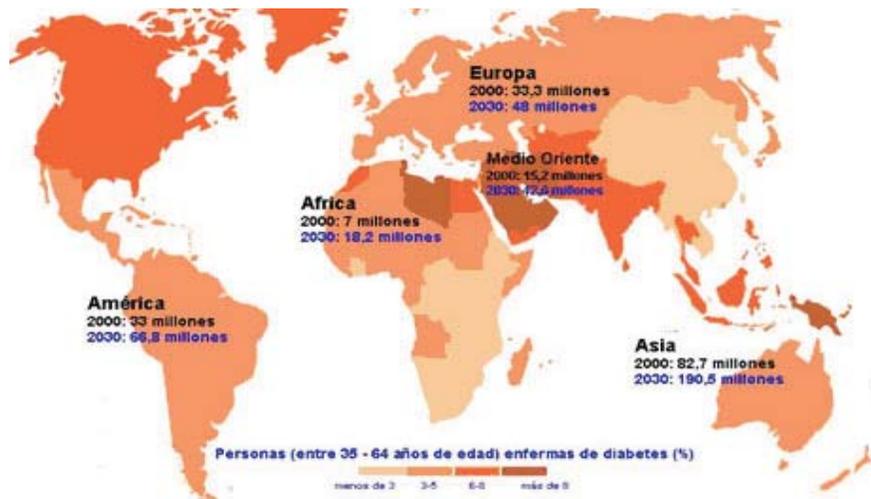


Figura 8. Personas entre 35 y 64 años con DM y proyección a 30 años [23].

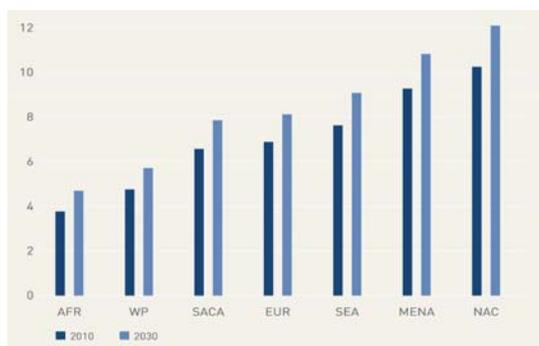


Figura 9. Prevalencia estimada de diabetes [%] en personas de 20-79 años por región mundial, comparativa entre 2010 y 2030 [9]\*.

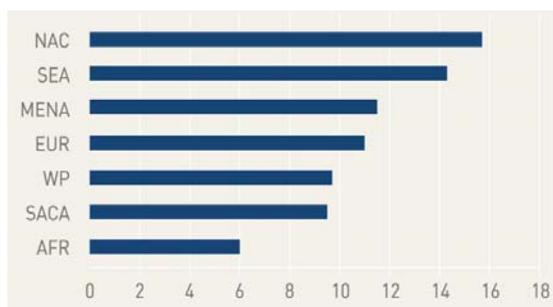


Figura 10. Muertes atribuidas a la DM respecto al porcentaje total de muertes en el mundo [9]\*.

\* AFR (África), WP (Pacífico Occidental), SACA (Sur y Centro de América), EUR (Europa), SEA (Sureste de Asia), MENA (Medio Este y Norte de África), NAC (Norteamérica y Caribe).

Como se observa en las figuras anteriores, Norteamérica y el Caribe son las regiones con mayor prevalencia de DM y muertes asociadas a dicho padecimiento, ocupando un 11.7%. México se encuentra dentro de los primeros lugares de alta prevalencia en DM, sobre todo tratándose de la población mayor a 35 años.

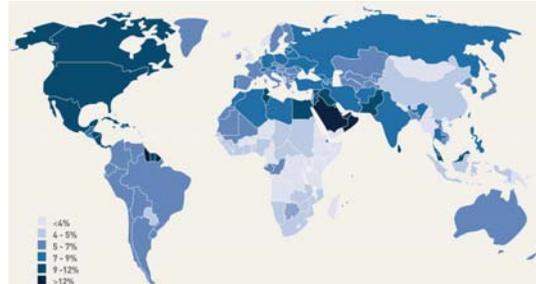


Figura 11. Prevalencia de DM en el mundo [%] (35 a 80 años de edad) [9].

### 1.1.4 Estadísticas en México

La DM es de las principales causas de mortandad y morbilidad en México en la población adulta, ocupando el noveno lugar en el número de enfermos con DMT2 a nivel mundial. Aproximadamente el 70% de los individuos que la padecen, mueren de complicaciones cardiovasculares ocasionando un mínimo de 70 mil de defunciones anuales en el país [24], es decir, 12 casos por hora; de continuar este ritmo, en 2012 morirán casi 100 mil mexicanos por esta causa.

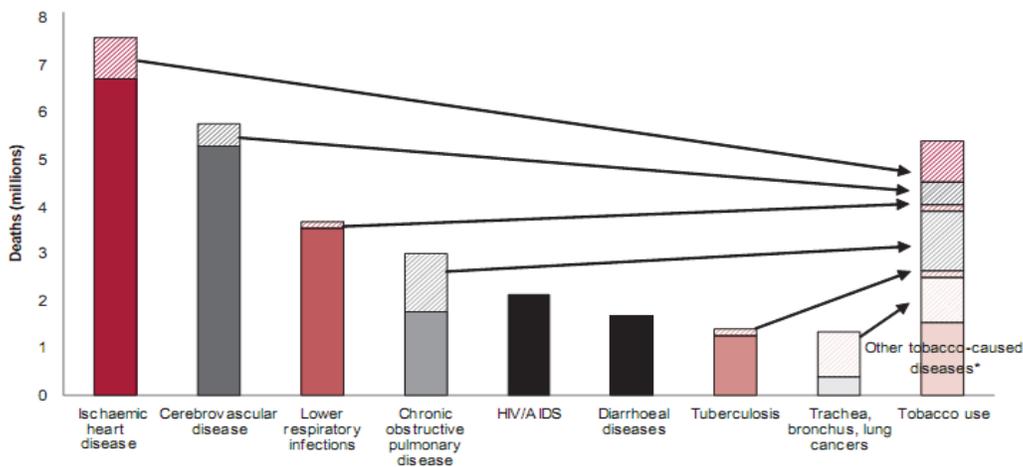


Figura 12. Las áreas con línea representan las proporciones de muertes que están relacionadas con la diabetes, enfermedades cardiovasculares, tabaco, etc. [24]

Hasta el 2007 se ha encontrado que en las poblaciones de personas mayores de 60 años en México, el 16.4% de las defunciones se debe a la DM, ocupando el segundo lugar después de las enfermedades del corazón.

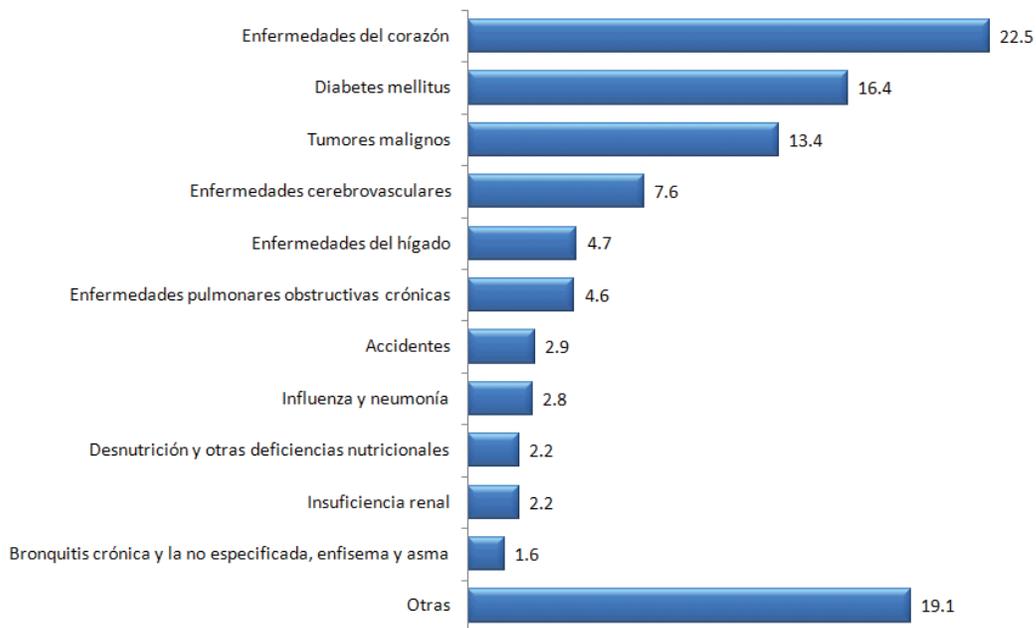


Figura 13. Distribución porcentual de las defunciones de la población de 60 años y más por causa. Estadísticas de Mortalidad en México, 2007 [24]. Fuente: INEGI.

En el caso de la morbilidad, la diabetes ocupa el tercer lugar, luego de las enfermedades del sistema circulatorio y las del urinario, con un porcentaje del 9.1% [24] .

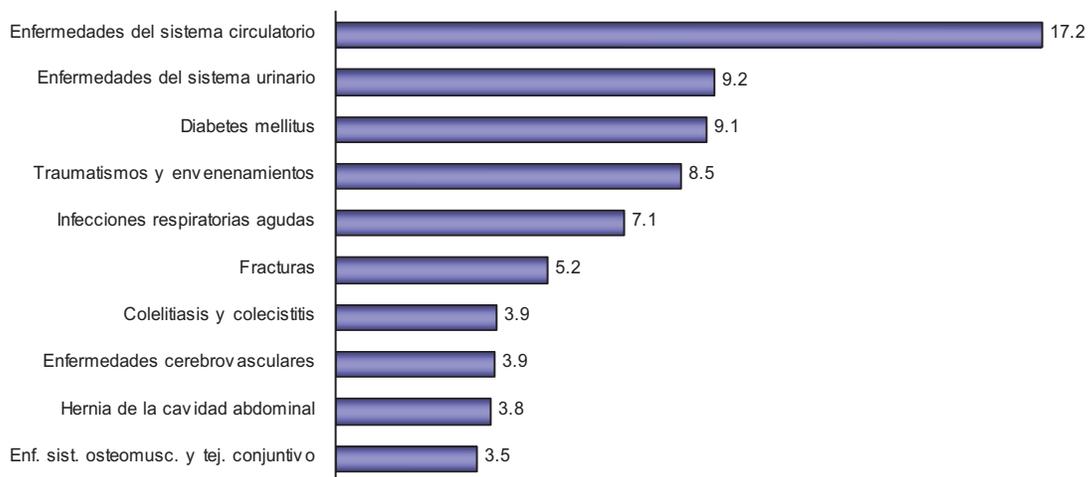


Figura 14. Porcentaje de las principales causas de morbilidad hospitalaria, población de 60 años y más, 2006. Fuente: SSA, DGIS. INEGI. [25]

De acuerdo al anexo estadístico del Segundo Informe de Gobierno, se presentaron entre 2005 y 2008 la cifra acumulada de un millón 559 mil 973 casos nuevos detectados, lo cual constituye un récord histórico en este tema a escala nacional. Estos números se ven reflejados en una tasa creciente de morbilidad, la cual pasó de 282.2 casos por cada 100 mil habitantes en el año 2000, a una de 382 en 2007. Para dimensionar esta epidemia, debe señalarse que por cáncer de mama mueren al día 12 mujeres, mientras que por DM la proporción es de 12 muertes por hora.

La DM afecta en mayor medida a las mujeres, pues del total de decesos, en 2005 representó más del 16% a causa de la diabetes. Para los hombres, el porcentaje fue de 11.3% [26].

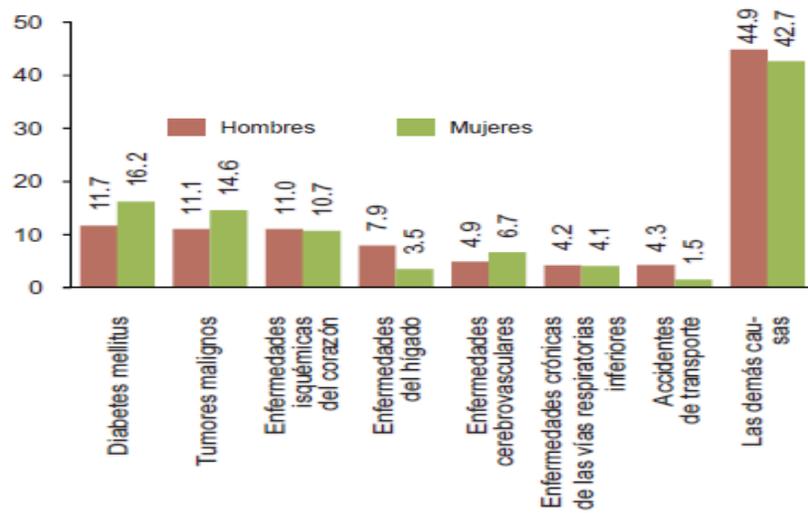


Figura 15. Fuente: INEGI. Estadísticas vitales, 2007. Base de datos [26].

## 1.2 ORIGEN DEL ERITROCITO

### 1.2.1 Hematopoyesis.

Es el proceso por el que se desarrollan todas las células sanguíneas maduras a partir de células precursoras (Figura 16). Se divide en: leucopoyesis, plaquetopoyesis y eritropoyesis.

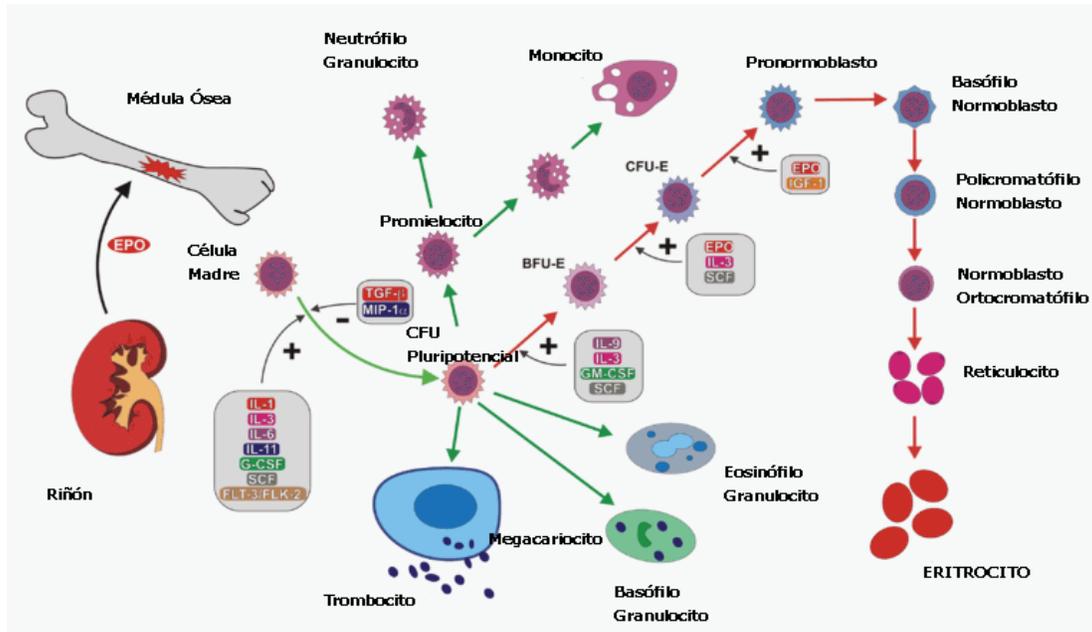


Figura 16. Hematopoyesis. Ocurre en la médula ósea, la velocidad de producción está regulada por la eritropoyetina que secreta el riñón. Comienza por la célula madre pluripotencial, que forma diversas colonias, las cuales posteriormente se diferencian hasta llegar a las células maduras [27].

En la edad adulta del ser humano, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, sobretodo del cráneo, costillas, esternón, columna vertebral, pelvis y los extremos proximales de los fémures. Sin embargo, antes de la madurez y durante las distintas etapas de desarrollo puede darse en otras localizaciones; por ejemplo, en el embrión, las células sanguíneas primitivas se producen en el saco vitelino y más tarde, en el hígado. Entre los 3 y 7 meses de la gestación, la mayor actividad hematopoyética tiene lugar en el bazo. A medida que se desarrollan los huesos durante los meses 4° y 5° se inicia la formación de granulocitos y plaquetas en las cavidades medulares, mientras que la *eritropoyesis* se inicia hacia el 7° mes. En el momento del nacimiento, la hematopoyesis es misión de la médula ósea, aunque el hígado y el bazo pueden reanudar esta actividad en caso necesario [28].

Se producen aproximadamente 150-450 mil plaquetas por cada  $\mu L$  de sangre al día. Éstas son muy importantes para la coagulación sanguínea por su capacidad de agregación unas con otras en respuesta a diversos estímulos.

Alrededor de 4 – 11mil leucocitos por cada  $\mu L$  de sangre, son producidos diariamente. Se dividen según su citoplasma y forma del núcleo en dos categorías: *granulocito*, que ataca y fagocita sustancias extrañas. Presenta gránulos en su citoplasma, tiene un núcleo redondeado y lobulado, y se

divide así mismo en: *neutrófilo* (más abundante y con un diámetro aproximado de  $12 - 18\mu m$ ), el cual destruye microbios y responde a estímulos inflamatorios; el *eosinófilo* (con un diámetro de  $10 - 12\mu m$ ), regula la respuesta alérgica y la reacción de hipersensibilidad; y el *basófilo* (tiene un diámetro de  $10\mu m$ ), participa en la respuesta inmunitaria segregando heparina (anticoagulante) e histamina (estimula el proceso de inflamación). Los *agranulocitos* son células con núcleo definido y sin gránulos. Se divide en: *monocito* (cuyo tamaño varía entre  $7$  y  $15\mu m$ , y representa entre  $4$  y  $8\%$  de la sangre), su función es fagocitar microorganismos o restos celulares; *linfocito* (con un diámetro entre  $7$  y  $15\mu m$ , representa entre el  $24$  y  $32\%$  de la sangre), es el encargado de la inmunidad específica o adquirida ya que posee receptores para antígenos específicos. Los *linfocitos B* son los responsables de la respuesta humoral: producción de anticuerpos, proteínas (inmunoglobulinas) que se adhieren al agente patógeno, permitiendo que los glóbulos blancos puedan localizarlo y destruirlo con mayor rapidez. Los *linfocitos T* ayudan a detectar los antígenos (Figura 17).

Y, finalmente, se producen de  $4.8 - 5.4 \times 10^6$  eritrocitos por  $\mu L$ , que son los encargados de la respiración pulmonar.

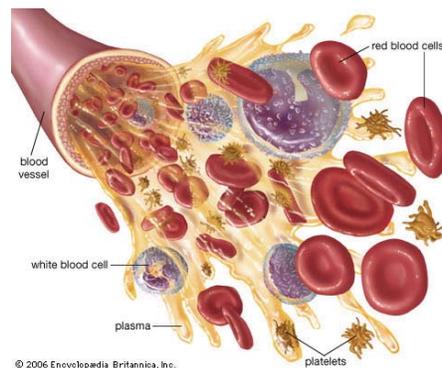


Figura 17. Elementos formes de la sangre [29]

## 1.2.2 Eritropoyesis

Comienza con la célula precursora llamada *proeritroblasto*, que contiene organelos citoplasmáticos: un núcleo redondo central que ocupa la mayor parte de la célula (siendo ésta de un tamaño aproximado de  $25\mu m$ ), uno o dos nucléolos y una cromatina reticulada; un aspecto importante es que carece de hemoglobina (Figura 18a). Enseguida, esta célula pasa por tres estadios diferentes: disminución del tamaño celular, pérdida de organelos y aumento del contenido de hemoglobina del citoplasma.

La división celular termina al llegar a la fase de *normoblasto precoz (eritroblasto basófilo)* (Figura 18b), momento en el que el núcleo comienza a condensarse progresivamente hasta ser expulsado durante la fase de *normoblasto tardío (eritroblasto policromático)* (Figura 18c), con  $12\mu m$  de diámetro, aproximadamente; tiene un núcleo redondo y central, así como una cromatina fuertemente condensada; además, en esta etapa se inicia la síntesis de hemoglobina. Posteriormente se convierte en *eritroblasto ortocromático* (Figura 18d), que es aún más pequeño  $10\mu m$ ; no posee capacidad mitótica, pero puede

sintetizar RNA, proteínas y hemoglobina, gracias a la persistencia de algunas mitocondrias, ribosomas y restos de retículo endoplásmico.

Enseguida se diferencia al reticulocito (Figura 18e), con un tamaño aproximado de  $9\mu m$ , conservando aún restos de ribosomas, RNA mensajero y otros organelos celulares; también tiene el núcleo que, al madurar, es expulsado y fagocitado por los macrófagos localizados en la médula ósea. Luego de unos días pasa a la sangre periférica, donde persiste 24 horas y finaliza su maduración. Este proceso de maduración desde el proeritroblasto hasta el reticulocito dura de 3 a 4 días, y es aquí donde se termina la síntesis de hemoglobina [30].

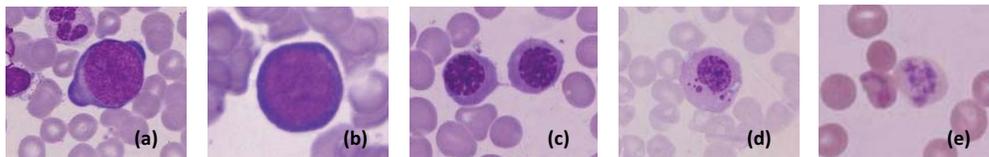


Figura 18. Eritropoyesis. (a) Proeritroblasto; (b) Eritroblasto basófilo (última célula de este proceso con capacidad mitótica); (c) Eritroblasto policromático; (d) Eritroblasto ortocromático; (e) Reticulocito.

Finalmente el elemento resultante, *eritrocito*, ya no contiene ningún tipo de organelo, debido a que éstos se perdieron durante el proceso de maduración. Por lo tanto, el eritrocito ya no se considera una célula sino una bolsa o glóbulo transportador de hemoglobina, por ello su color rojo característico (Figura 19). El proceso de la eritropoyesis, incluyendo la evolución desde la célula madre al eritrocito, dura alrededor de una semana. Su velocidad está controlada por la hormona eritropoyetina secretada por el riñón, y por la disponibilidad de componentes de los hematíes como el hierro, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y precursores de las proteínas [31].

Cuando se acerca hacia el final de su maduración, el eritrocito entra en contacto con el endotelio vecino y atraviesa su citoplasma para penetrar en la circulación y permanecer en ella durante los siguientes 120 días [32], en los que recorre alrededor de 300km, pasando 3,600 veces por los conductos sanguíneos y, conforme va envejeciendo, pierde fragmentos de membrana y disminuye su deformabilidad [33]. La función principal del eritrocito es transportar, a través de la hemoglobina, los gases, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, desde y hasta el endotelio alveolar del pulmón, en donde se realiza el intercambio gaseoso.

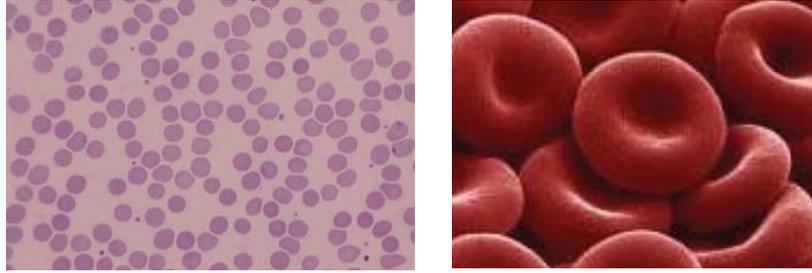


Figura 19 Eritrocito [34]

### 1.2.3 Composición del plasma sanguíneo

La sangre es un tejido conjuntivo líquido de color rojo brillante, posee un pH de 7.4 y una densidad de  $1.04 \text{ g/cm}^3$ . Un individuo adulto tiene aproximadamente  $5L$  de sangre, lo cual corresponde a un 7% de su peso.

La sangre está formada de un fluido coloidal llamado *plasma* que se encarga del transporte de elementos formes y nutrientes. Su función es mantener la presión oncótica, es decir, el efecto osmótico ejercido por las proteínas dentro del espacio vascular que está delimitado por una membrana selectivamente permeable (el endotelio). Debido a la conservación de la energía, la energía potencial del agua se transforma en energía cinética para dirigirse al lugar con menor potencial hídrico, es decir, a donde haya una mayor concentración de soluto. Por lo tanto, hay una presión oncótica generada por las proteínas del plasma y del intersticio, ya que este último tiene menor concentración de proteínas. De esta manera se impide el paso del flujo sanguíneo al exterior de los conductos. Otra de las funciones del plasma es mantener la estabilidad del pH sanguíneo, la viscosidad de la sangre, la resistencia vascular periférica y la presión vascular; además de intervenir en el equilibrio electroquímico de la concentración de iones.

El plasma posee un color amarillento translúcido y abarca el 55% del volumen sanguíneo. Tiene una viscosidad de aproximadamente 1.5 veces la del agua, es decir,  $0.015P$  ( $1.5mPa \cdot s$ ). Está constituido por 91.5% de agua y el resto de sustancias inorgánicas y orgánicas, tales como las *proteínas plasmáticas*, que representan el 70% del plasma. De ellas, el 7% es *fibrinógeno*, proteína de  $46nm$  de longitud y un peso molecular de  $340 \text{ kDa}$ . Es una molécula fibrilar que en sus extremos tiene cargas negativas que permiten la solubilidad del plasma y también repelen a otras moléculas del mismo, previniendo la agregación. Esta proteína es la responsable de la formación de coágulos en la sangre, transformándose en fibrina gracias a la actividad de las plaquetas. El 38% equivale a *inmunoglobulinas o anticuerpos* que se emplean por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar elementos extraños como bacterias, virus o parásitos. El 54% lo ocupan las *albúminas*, cuya función es mantener la presión oncótica, transportar hormonas tiroideas, liposolubles; ácidos grasos libres o no esterificados; bilirrubina, fármacos, drogas, etc. Además intervienen en el control del pH sanguíneo. El resto de las proteínas plasmáticas, 1%, son *lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad; protrombina*, que forma parte del proceso de coagulación, y la *transferrina* que une al hierro en forma férrica.

Dentro del plasma también se encuentran los metabolitos orgánicos, como: fosfolípidos (280 *mg/dL*), colesterol (150 *mg/dL*), triacilgliceroles (125 *mg/dL*), glucosa (100 *mg/dL*), urea (15 *mg/dL*), ácido láctico (10 *mg/dL*), ácido úrico (3 *mg/dL*), creatinina (1.5 *mg/dL*), bilirrubina (0.5 *mg/dL*) y sales biliares (trazas); además de sustancias de desecho (20%), todas ellas producto del metabolismo.

Los componentes inorgánicos (10%) son el cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato, fosfatos, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Contiene además otros solutos (1.5%) que corresponden a sales minerales, nutrientes, gases disueltos, sustancias reguladoras y vitaminas.

### 1.3 FORMA DEL GLÓBULO ROJO

El eritrocito está formado de una membrana lipídica que contiene proteínas tanto internas como externas; un citoesqueleto, que le da estructura y movilidad, y un interior líquido compuesto por hemoglobina.

El eritrocito tiene una presión interna negativa de alrededor de  $1/3 \text{ mm H}_2\text{O}$ , y en condiciones de equilibrio osmótico entre la membrana y el plasma sanguíneo esa presión es la necesaria para mantener la forma bicóncava [35]. Esto le permite disponer de mayor superficie y ocupar el mínimo volumen [36].

El espesor de la membrana es de  $0.01 \mu\text{m}$  [37]. El eritrocito tiene un diámetro de  $8 - 10 \mu\text{m}$  (Figura 20) aproximadamente y es capaz de deformarse tanto como para atravesar capilares de  $3.33 \pm 0.17 \mu\text{m}$  de diámetro; el volumen medio del glóbulo rojo es de  $107.5 \pm 16.8 \mu\text{m}^3$  y el área media es de  $138.1 \pm 17.4 \mu\text{m}^2$  [38], el área es 25% más grande que la mínima requerida para encerrar ese volumen [39].

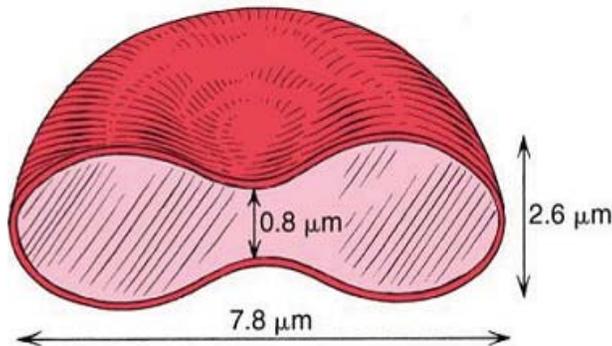


Figura 20. Forma del eritrocito. El diámetro promedio del eritrocito es de  $8 \mu\text{m}$ ; tiene un grosor máximo de  $2.6 - 3 \mu\text{m}$  y una distancia de  $0.8 - 1 \mu\text{m}$  entre las concavidades [40, 41].

La membrana del glóbulo rojo forma una barrera entre el plasma sanguíneo y la hemoglobina y enzimas internas; es impermeable para las proteínas y productos intermedios fosforilados del metabolismo, excepto para la glucosa, la fructosa, la manosa y la galactosa [42]. Por esta razón, la presión osmótica puede verse afectada, es decir, si hay una diferencia de concentraciones de soluto entre el interior y el exterior del eritrocito, el líquido contenido en él entrará o saldrá para mantener el equilibrio osmótico (Figura 21). Esto sucede cuando se encuentra bajo un estrés mecánico (como atravesar un capilar más delgado): el eritrocito pierde algo de su contenido de agua, resultando en una disminución del volumen y recuperándolo posteriormente. De esta manera puede atravesar conductos muy pequeños sin ser destruido [43].

La geometría del eritrocito implica que, en equilibrio, la diferencia de presiones a través de la pared es pequeña, de tal manera que la membrana puede deformarse en superficies isocóricas (a menos que haya un cambio osmótico importante) [44].

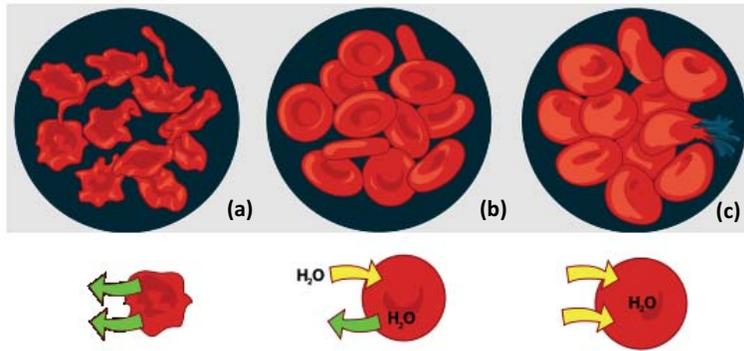


Figura 21. Esquema representativo de las tres principales formas que adquiere el eritrocito cuando se somete a una diferencia de presiones. (a) hipertónica, (b) hipotónica, y (c) isotónica [45]

Si la concentración del soluto es mayor en el exterior, en relación al medio citoplasmático del eritrocito, el agua contenida en éste saldrá para equilibrar presiones, de tal forma que el eritrocito se deshidratará, adquiriendo una forma contraída y espiculada. En este caso la solución se denomina *hipertónica* y el eritrocito puede morir de deshidratación carbónica (Figura 22a). Para el caso de una solución *hipotónica* sucede exactamente lo contrario: la concentración de soluto en el interior es mayor que en el medio externo del eritrocito, por lo que entra en él la cantidad de agua necesaria para llegar al equilibrio de presiones, es decir, se produce ósmosis del líquido hacia el interior del glóbulo rojo. El resultado de esto es una hinchazón del eritrocito, pudiendo llegar hasta la hemólisis (Figura 22b). En el caso en que el eritrocito se encuentre en una solución *isotónica*, es decir, en que las concentraciones de soluto en el interior y exterior sean las mismas, o al menos, las presiones estén en equilibrio, no hay difusión de solvente hacia ninguna dirección; en este caso se considera al eritrocito en equilibrio con el medio (Figura 22c) [46].

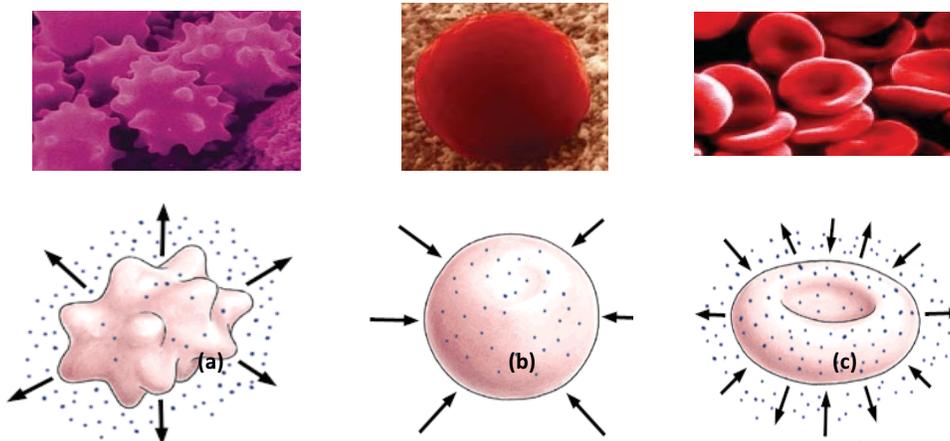


Figura 22. Eritrocito en solución hipertónica (produce crenación o encogimiento del eritrocito) (a), hipotónica (puede llegar a plasmólisis o hemólisis) (b) e isotónica (eritrocitos en equilibrio osmótico) (c) [47].

### 1.3.1 Anormalidades morfológicas del eritrocito

Bajo condiciones fisiológicas el eritrocito tiene  $8\mu\text{m}$  de diámetro y forma discoide, por lo que también se le denomina discocito, como se comentó previamente en la sección anterior. Pero si hay un defecto en las condiciones en el que éste se desenvuelve e, incluso, en su origen medular o extramedular, pueden surgir anormalidades en el tamaño, forma y citoplasma [48].

Por lo general, en un sujeto sano el 55% de los eritrocitos son unicóncavos. Éstos se derivan de la deformación que sufren los discocitos durante su flujo por la sangre. El 44% de los glóbulos rojos restantes son discocitos y el 1% corresponde a otras formas que adquieren los eritrocitos, como se describe a continuación.

#### **Anormalidades en tamaño (Anisocitosis).**

Consiste en el aumento o disminución del tamaño del eritrocito (Figura 23).

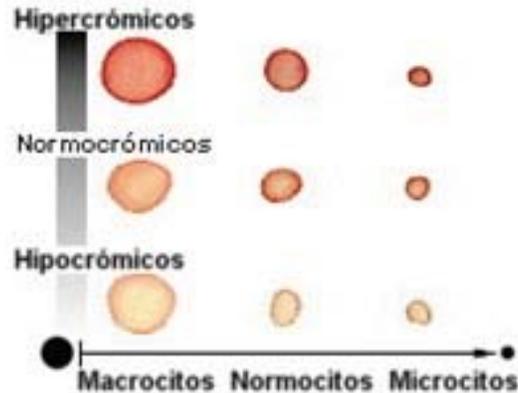


Figura 23. Los Macroцитos tienen un diámetro mayor a  $8.5\mu\text{m}$  y los Megalocitos mayor a  $12\mu\text{m}$  (asociados con deficiencia de vitamina B12 y/o ácido fólico, trastornos hepáticos, etc.) Los Microцитos son de  $6\mu\text{m}$  y están presentes en las anemias por su bajo contenido de Hb.[49].

#### **Anormalidades en la forma (poikilocitosis).**

Existe una variedad de agentes que pueden modificar la forma sistemáticamente y reversiblemente a volumen y área constantes: altas concentraciones de sales, alto pH, disminución del ATP, aumento del colesterol, aniones anfipáticos, entre otros. Las formas inducidas por estos parámetros son:

- *Equinocitos*. Observados en pacientes con uremia, defectos del metabolismo glucolítico y en algunos con anemia microangiopática (Figura 24). Representan aproximadamente el 0.13% del total de eritrocitos en la sangre de un sujeto sano [50,51]. Los *acantocitos* son una variación de los equinocitos, ya que también presentan espículas pero asimétricas (Figura 26).
- El *knizocito* constituye alrededor del 0.4% del total de los eritrocitos en un sujeto normal [52].

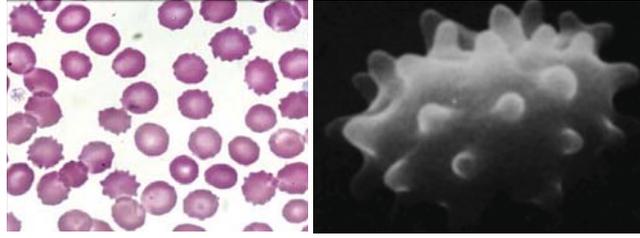


Figura 24. Equinocito. Presentan de 10 a 30 espículas simétricas que pueden convertirse en vesículas y desprenderse del glóbulo convirtiéndolo en esferoequinocito [53 (izq), 51 (der)].

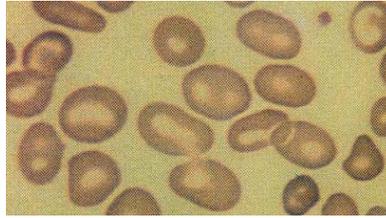


Figura 25. Knizocito. Posee tres concavidades causadas por alteraciones en la membrana lipídica [54].

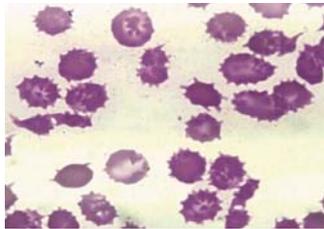


Figura 26. Acantocito. Estructura densa e irregularmente contraída que se presenta cuando el eritrocito se expone a condiciones que modifican el contenido lipídico de la membrana [55].

Otro tipo de agentes que modifican la forma de los eritrocitos son los cationes anfipáticos, las bajas concentraciones salinas, bajo pH, disminución del colesterol, induciendo formas cóncavas, por ejemplo:

- El *estomatocito*. Presenta una depresión central elongada parecida a una boca o estoma (de ahí su nombre) [50]. Y corresponden al estado transicional entre los eritrocitos normales y los esferocitos [51].
- Los *degmacitos* corresponden a eritrocitos en los que la hemoglobina ha sido desnaturalizada y precipitada, y suelen ser eliminados por el bazo. Estos pueden producirse durante anemias inducidas por fármacos (Figura 28).
- Los *esferocitos*. Se presentan, en su mayoría, en anemias inmuno hemolíticas y esferocitosis hereditaria.
- Los *microesferocitos* se caracterizan por una disminución en la relación área/volumen, y un aumento en la concentración de hemoglobina.
- Los *ovalocitos* o *eliptocitos* son discos bicóncavos ovales, que se vuelven casi cilíndricos [50]. Están asociados a anemias o a eliptocitosis hereditaria (Figura 30).

- El *drepanocito* es un eritrocito elongado con extremos puntiagudos, cuya forma se relaciona con la concentración de desoxi-hemoglobina (Figura 31).
- El *dacrocito* es un eritrocito en forma de gota, está asociado a las anemias y a la hematopoyesis extramedular (Figura 32).
- El *esquizocito* se asocia a la coagulación vascular diseminada.
- Los *queratocitos*, parcialmente fragmentados, cuyo contenido de hemoglobina no ha sido alterado, se asocian a anemias hemolíticas microangiopáticas (Figura 33).

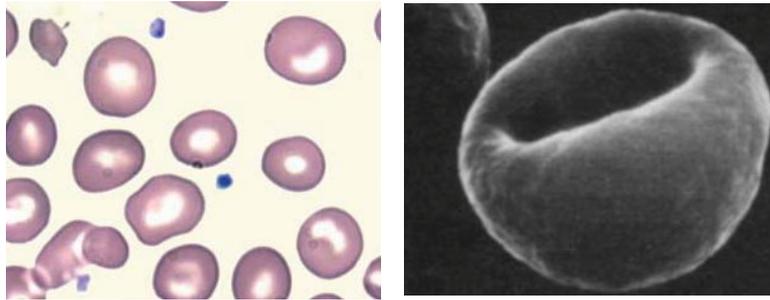


Figura 27. Estomatocito. La entrada de sodio excede la del potasio y la membrana gana cationes de agua que la hinchan. Esas invaginaciones cóncavas eventualmente forman vesículas en el interior de estomatocito [56 (izq), 51 (der)].

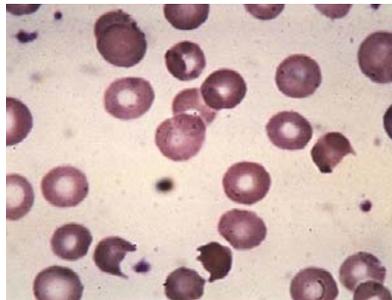


Figura 28. Degmacitos [57].

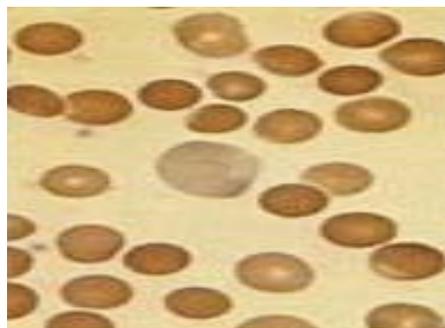


Figura 29. Esferocitos. Citoesqueleto incapaz de mantener la forma bicóncava por una alteración en la proteína que lo compone [58].



Figura 30. Eliptocitos. Asociados con una anomalía en la composición bioquímica del citoesqueleto [59].

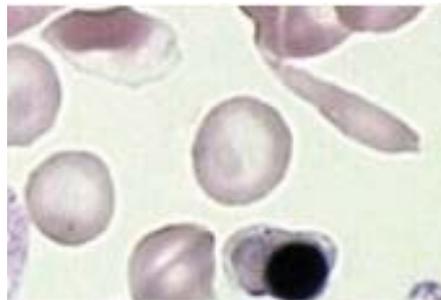


Figura 31. Drepanocito [60].

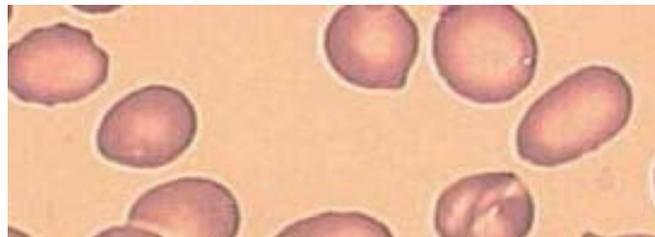


Figura 32. Dacrocito [61].



Figura 33. Queratocitos y esquizocitos [62].

### ***Anormalidades citoplasmáticas.***

El eritrocito es anucleado y no tiene ningún organelo, pero un defecto en su desarrollo desde la eritropoyesis puede producir graves consecuencias a nivel vascular. Por ejemplo:

- Los *punteados basófilos* contienen agregados anormales de ribosomas debidos a una deficiencia de hierro, entre otras cosas. Los *cuerpos de Howell* poseen remanentes nucleares asociados a las anemias severas por déficit de hierro también.
- Los *cuerpos de Heinz* poseen hemoglobina agregada o desnaturalizada (Figura 34).

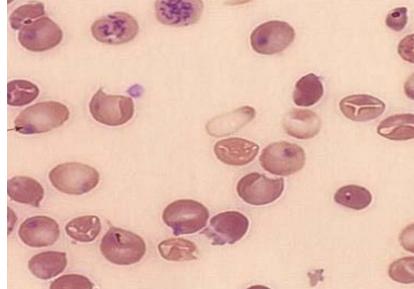


Figura 34. Cuerpos de Heinz [63].

### ***Variaciones en la concentración de hemoglobina (cromasia)***

En condiciones normales el eritrocito tiene un área central de palidez de más o menos la tercera parte de su diámetro. El único eritrocito que dispone de más hemoglobina (Hb) de lo normal en relación con su volumen es el esferocito, que carece de un área central de palidez y se tiñe en forma uniforme.

En ciertos transtornos puede existir *hipocromía*, que se origina por una síntesis anormal de Hb, asociada a la deficiencia de hierro, entre otras cosas. Se observa en el eritrocito una mayor palidez en su centro.

- Los *leptocitos* son eritrocitos con un área central clara, parecen una dona.
- Los *picnocitos* tienen hemoglobina concentrada en una parte lateral del eritrocito, la otra está clara (Figura 35).



Figura 35. Picnocitos [64].

## 1.4 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

La membrana está formada por una bicapa lipídica plana, el 80% corresponde a fosfolípidos, colesterol y glucolípidos. En ella están embebidas parcial o totalmente las proteínas integrales de membrana, unidas fuertemente por enlaces apolares; aparecen a ambos lados de la bicapa de fosfolípidos, ya que interaccionan intensamente con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la membrana. Su libre desplazamiento a través de esta bicapa contribuye a mantener su fluidez (Figura 36) [65]. Los carbohidratos de la molécula siempre se encuentran al exterior del eritrocito. Las proteínas periféricas se encuentran sólo unidas a la superficie interna o externa de la bicapa y se separan fácilmente de ella, debido a que están enlazadas a las membranas por fuerzas electrostáticas y de puentes de hidrógeno que pueden romperse por adición de sales o cambio de pH [66].

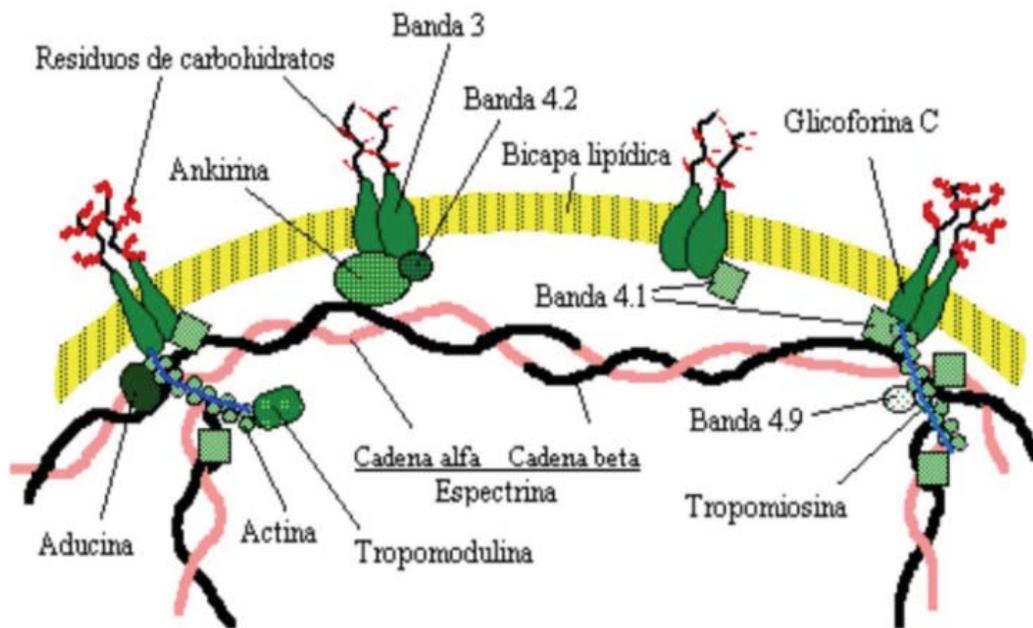


Figura 36. Bicapa lipoproteica, proteínas integrales y periféricas del eritrocito [66].

### 1.4.1 Proteínas integrales y periféricas

La naturaleza de las proteínas de la membrana define su función, ya que pueden servir como canales, transportadoras, receptoras, enzimas y anclajes del citoesqueleto [67].

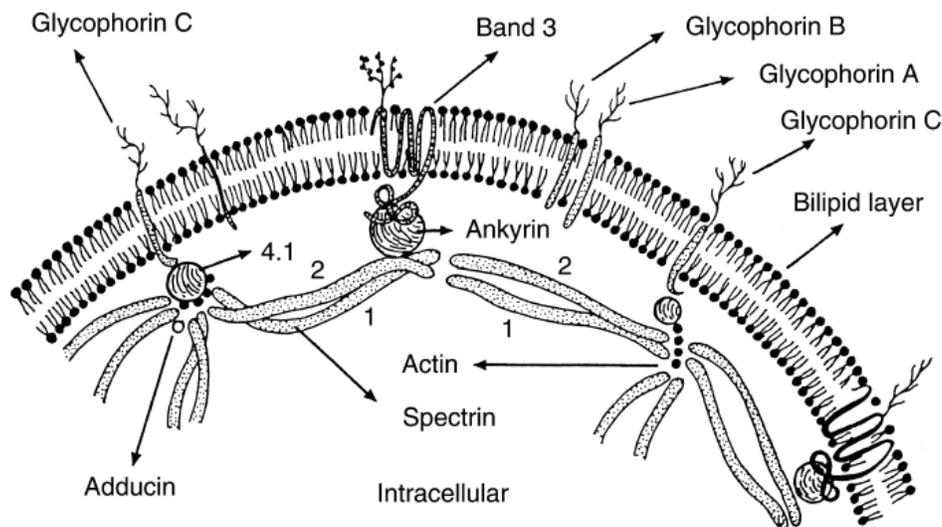


Figura 37. Esquema de la localización y posición de las proteínas de membrana (integrales y periféricas) [68].

### ***Proteínas integrales de membrana.***

Se caracterizan por ser proteínas anfipáticas: con dos polos hidrofílicos, uno en contacto con la fase acuosa extracelular, y otro con la fase acuosa citoplasmática, y una parte media hidrofóbica, sumergida en la bicapa lipídica.

Las principales proteínas integrales de membrana son las de *banda 3* o de intercambio iónico; la *glucoforina A* y *B*, las *ATPasas* y la *acetilcolinesteras*.

### **Proteína de Banda 3**

Esta proteína es la más abundante en la membrana del eritrocito. Tiene diversas funciones, como transporte iónico, modulación del metabolismo, reconocimiento celular y sirve como ancla, conectando proteínas citoplasmáticas solubles y componentes del citoesqueleto a la membrana. Ocupa alrededor del 25% de las proteínas integrales de membrana, que equivale a un millón de copias de este intercambiador iónico (AE1). Tiene un papel importante en el transporte de  $\text{CO}_2$  en el torrente sanguíneo, donde es llevado como bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), ya que la solubilidad del dióxido de carbono es baja (más de dos tercios de las moléculas de  $\text{CO}_2$  son transportados como  $\text{HCO}_3^-$ ). Cuando la sangre llega al pulmón, el proceso se revierte debido al gradiente de presiones del  $\text{CO}_2$  entre la sangre y el alveolo pulmonar [69].

La proteína de banda 3 se divide en tres dominios estructurales: uno es el sitio transmembranoso que mantiene el contacto con el medio extra e intracelular, donde ocurre el intercambio iónico del  $\text{HCO}_3^-$ , con el ión  $\text{Cl}^-$ , cuando se libera el  $\text{CO}_2$  en los alveolos pulmonares; el segundo corresponde al dominio citoplasmático corto, C-terminal, donde se forma un complejo metabólico entre la anhidrasa carbónica II, permitiendo así el paso del bicarbonato hacia la fase citoplasmática de la banda 3; y, finalmente, el tercer dominio corresponde a la N-terminal, ya en el citoplasma con las proteínas del esqueleto (Figura 38) [70].

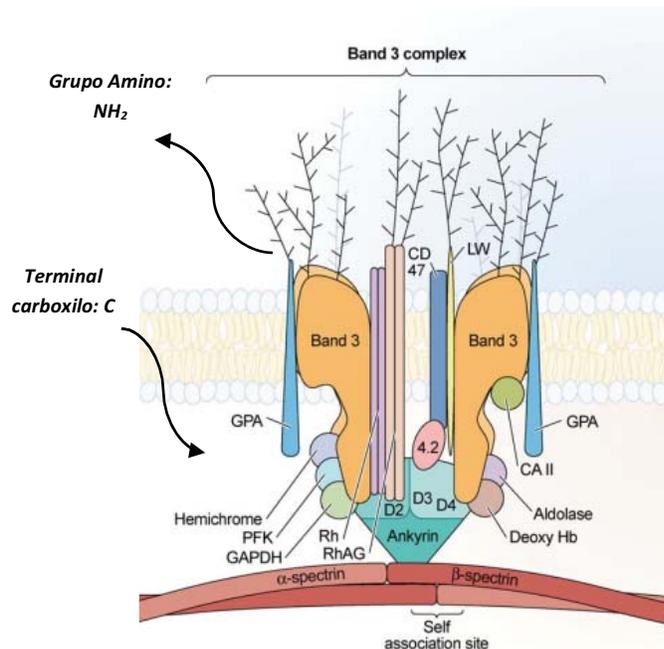


Figura 38. Proteína de Banda 3 [70].

El peso molecular de la proteína de banda 3 varía alrededor de los 96kDa y está compuesta de 911 aminoácidos. Si la estructura de la proteína se modifica se puede ocasionar un envejecimiento celular, disminuyendo la eficiencia del transporte aniónico y de glucosa, así como incrementando la degradación de la banda 3 y la unión de anticuerpos naturales a la membrana, lo cual resulta en la remoción celular [71].

### *Proteínas de Señalización: Glicoforinas A, B y C*

Las *glucoproteínas* son aquellas que están compuestas por una proteína unida a varios hidratos de carbono simples o compuestos y su función es de reconocimiento celular, ya que son características de cada individuo y permiten identificar a las células provenientes de otros organismos, en este caso, las sanguíneas.

El complejo de proteínas de señalización, *glucoporinas (A y B)*, está constituido por oligosacáridos complejos: *glucoesfingolípidos*, que actúan como antígenos, y *glucoesfingolinas*. En los eritrocitos puede haber dos antígenos llamados A y B, mientras que en el plasma puede haber dos anticuerpos, *a* (o *anti A*) y *b* (o *anti B*). De acuerdo a las diferentes combinaciones de éstos, se pueden obtener los cuatro posibles grupos sanguíneos: A, B, AB y O.

El *grupo O* no tiene antígenos en la membrana de los glóbulos rojos, sólo anticuerpos *a* y *b* en el plasma. Este grupo se considera universal por esta razón, pero no pueden recibir sangre más que de las personas de su mismo grupo, debido a los anticuerpos que podrían destruir a todos los demás antígenos; por ejemplo, el *b* destruye al *B*, etc. El *grupo A* tiene el antígeno A y el anticuerpo *b* en el plasma; el *grupo B* tiene el antígeno B y el anticuerpo *a*. El *grupo AB*, posee los antígenos A y B en los eritrocitos y sin anticuerpos en el plasma. Este grupo es el receptor universal por su carencia de anticuerpos en el plasma, aunque sólo puede dar sangre a los de su mismo grupo (Figura 39).

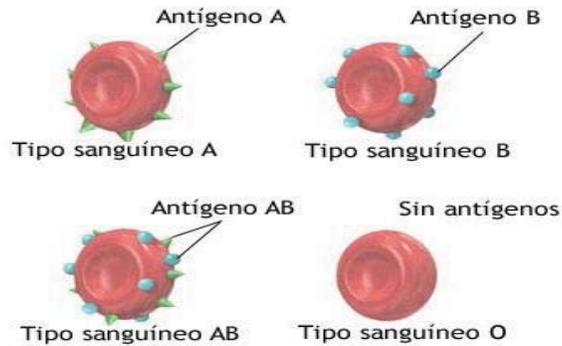


Figura 39. Grupos sanguíneos presentes en el glucocalix del eritrocito [72].

El *RH* es la proteína integral de membrana que si está presente en la superficie del eritrocito, es positivo ( $RH^+$ ); de lo contrario, es negativo, ( $RH^-$ ).

La glucoforina C es una cadena de polipéptidos de 128 aminoácidos que tiene forma de hélice y pertenece también a las proteínas intrínsecas (Figura 40). Forma un complejo con la proteína de banda 4.1, que se relaciona con la estabilidad y las propiedades mecánicas de la membrana plasmática. La glucoforina C contribuye a la estabilidad de la membrana gracias a su interacción con proteínas periféricas, además de participar en el intercambio iónico [73].

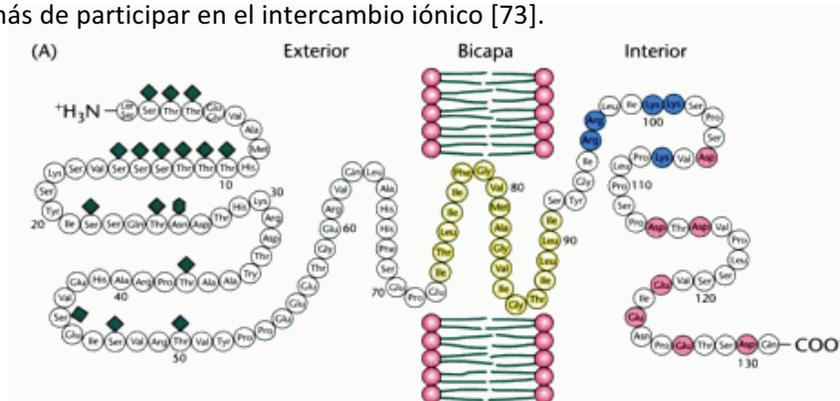


Figura 40. Glucoforina C [74]. Disposición de las terminales amino y carboxilo de la glucoforina en la bicapa lipídica.

### ***Proteínas extrínsecas o periféricas (proteínas de anclaje)***

Son aquellas localizadas en las caras interna o externa de la membrana y representan alrededor del 30% de la misma. Se encuentran unidas a las proteínas intrínsecas de forma electrostática o hidrofóbica. Casi la totalidad de las proteínas extrínsecas tienen cadenas glucosiladas formadas por fibrillas de 1.5nm de diámetro, dispuestas de manera perpendicular a la membrana, que constituyen la parte más externa de la misma (glucocalix). Dentro de la bicapa, las proteínas periféricas forman una estructura que sirve de unión al citoesqueleto con la membrana eritrocitaria.

Las proteínas periféricas que forman el citoesqueleto y el exterior del eritrocito, son: *espectrina (citoesqueleto)*, *actina*, la *banda 4.1, 4.2 y 4.9*; *anquirina*, *tropomodulina*, *tropomiosina* y *aducina (proteínas de anclaje)* (Figura 41), que le proporcionan estructura y movilidad al eritrocito [67].

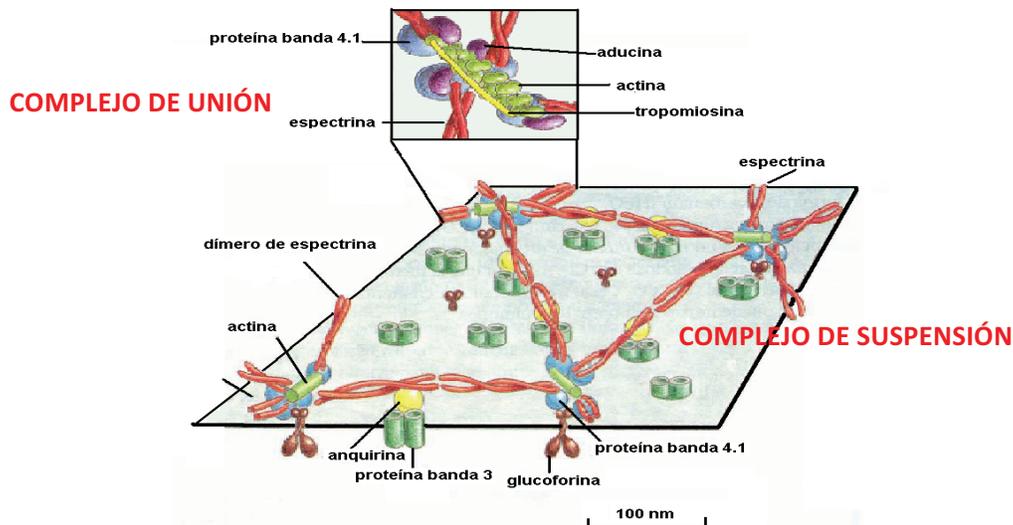


Figura 41. Complejo unión formado por cadenas de espectrina y proteínas de anclaje [89].

### *Actina*

Esta proteína es muy ubicua e importante para la forma del eritrocito, ya que le da el soporte mecánico al citoesqueleto al estar unida (en la parte citoplasmática) a la membrana. Además ayuda al transporte intracelular y a la movilidad de la membrana. Representa el 15% de la proteína celular, con un peso aproximado de 43kDa [75].

Los filamentos de actina están compuestos por monómeros de la misma, dispuestos de forma helicoidal, tienen unos 7nm de diámetro. Son filamentos polarizados, debido a la disposición ordenada de las subunidades de actina en el filamento, siempre se ensamblan con la misma orientación. El extremo positivo se denomina así porque en él predomina la polimerización, adición de nuevos monómeros, respecto a la despolimerización, mientras que en el extremo negativo predomina la despolimerización.

Este microfilamento es muy importante porque en él es donde se unen todas las proteínas del complejo de unión (Figura 41).

### *Aducina*

Es una proteína del citoesqueleto que está involucrada en la transducción de señales. Debido a su interacción con los filamentos de actina y de espectrina, modifica el esqueleto de la membrana e influye en la actividad de algunos canales iónicos, por ejemplo, participa en el cotransporte de Na-K-Cl y en la bomba Na-K-ATPasa (Figura 41).

### *Anquirina*

Está compuesta por tres subunidades estructurales correspondientes a tres dominios funcionalmente diferentes: regulador, de unión a la membrana y de unión a la espectrina. Su contribución a la integridad de la membrana es fundamental, ya que es un importante punto de anclaje a la bicapa lipídica a través de la banda 3 en el complejo de suspensión (Figura 41).

### *Tropomiosina y Banda 4.9*

La primera es una proteína de ligadura de la actina, que regula su mecánica (40.6kDa). Y la Banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de los microfilamentos de actina (48kDa). Ambas están situadas a los lados de los filamentos de actina, y la proteína de ligadura de la tropomiosina es la tropomodulina que controla la longitud de la unión de los filamentos de actina a los tetrámeros de espectrina [76] (Figura 41).

### *Proteína de Banda 4.1*

Su función principal es estabilizar la unión entre la espectrina y la actina, así como fijar los complejos de unión a los dominios transmembranales de la glucoforina [77] (Figura 41).

### *Proteína de Banda 4.2*

Es una proteína que liga al ATP, el cual regula la asociación de la proteína de banda 3 con la anquirina. El peso molecular de las proteínas de membrana ya ha sido bien descrito, ocupando el primer lugar la espectrina  $\alpha$  y  $\beta$ , que es la que compone principalmente al citoesqueleto y la proteína de banda 3 (Figura 42) [78].

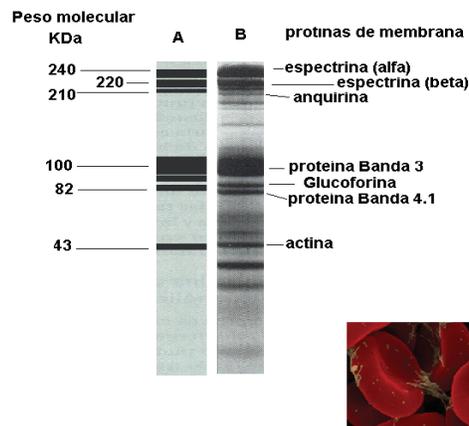


Figura 42. Patrón electroforético de las proteínas de membrana del eritrocito [78].

## **1.4.2 Citoesqueleto**

El citoesqueleto del eritrocito es una red elástica tridimensional que está constituida por proteínas que se encuentran ancladas a la membrana: espectrina  $\alpha$  y  $\beta$ , anquirina, proteína de banda 3, 4.1, 4.2 y actina, así como algunas proteínas menores como miosina, tropomiosina y tropomodulina. El citoesqueleto es el principal responsable de mantener la forma y las propiedades mecánicas del eritrocito [79, 80].

Está compuesto principalmente (en un 75%) por heterodímeros de espectrina, que consiste en cadenas polipéptidos entrelazadas,  $\alpha$  (que tiene 22 segmentos triple-hélice de aproximadamente 270 aminoácidos, con un peso de 280 kDa) y la  $\beta$  (que tiene 17 segmentos triple-hélice, con un peso de

246kDa), encontradas de forma antiparalela una con otra, es decir, la C-terminal de la cadena  $\beta$  se une con el extremo amino de la siguiente cadena  $\beta$ ; aproximadamente tienen una longitud de 80-100nm.

Al unirse las cadenas de espectrina se forma un tetrámero de forma helicoidal con una longitud de aproximadamente 30nm (Figura 43), cuyos extremos están ligados por una proteína llamada actina [81], y ésta, a su vez, está anclada a la membrana [82] mediante la anquirina que está conectada a las proteínas de banda 3, además de estar asociada con otras proteínas como la aducina, tropomiosina y banda 4.1, [83,84]. La espectrina constituye del 20-25% del total de las proteínas de la membrana [85] y tiene un papel muy importante en la forma discoide del eritrocito y en las propiedades viscoelásticas de la membrana. Esta red de actina-espectrina ayuda a mantener esfuerzos locales, dilatación y condensación [86].

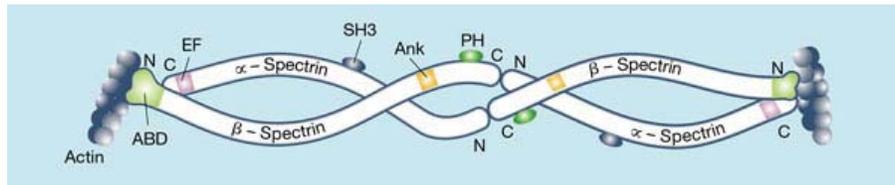


Figura 43. Tetrámero de espectrina: consta de dos cadenas alfa y beta, situadas de forma antiparalela, unidas, en sus extremos, mediante la actina.

Este conjunto de proteínas forma los vértices del citoesqueleto y se llama *Complejo Unión (CU)* [87]. En medio de esta estructura de espectrinas se encuentra el *Complejo de Suspensión (CS)*, que también le da soporte a la membrana.

Estructuralmente esta red está organizada en  $\sim 33,000$  unidades que se repiten. Se ha demostrado mediante microscopía electrónica de transmisión que cada una de estas unidades se puede representar como un hexágono de espectrina cuyos vértices están formados por 6 CU (en el caso más estable), constituidos con 6 dímeros largos de espectrina  $\alpha\beta$ , radiando de un protofilamento central corto de actina, y en el centro de cada uno de estos, un CS (Figura 44).

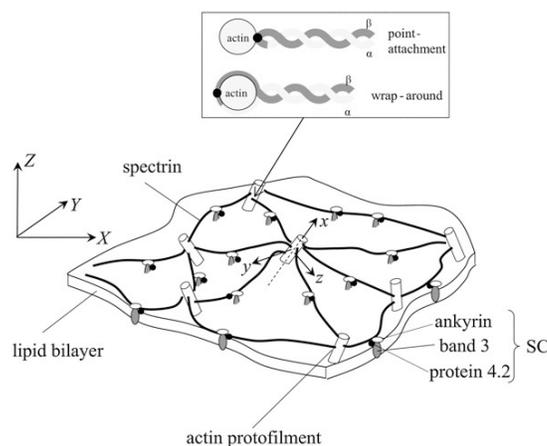


Figura 44. Unidad hexagonal del citoesqueleto y sus complejos de suspensión [88].

Los CS sirven de conexión primaria entre la red de proteínas y la bicapa lipídica, y consisten en banda 3, anquirina y proteína 4.2 (Figura 44). El sitio secundario donde se ancla la red de proteínas a la bicapa es por el CU, donde la proteína 4.1 se asocia con la glicoforina C, otra proteína transmembranal con un simple dominio transmembranal [88] (Figura 45).

Cada CU puede verse como un vértice de actina (Figura 44), y su funcionalidad depende del número de vértices. La red del citoesqueleto puede formar pentágonos (3%) y heptágonos (8%) (Figura 47), entre otros; por ejemplo: un tetrámero de espectrina sencillo, pero con dos CU; tres estructuras de espectrina en forma de "Y", unidas por tres CU; tres moléculas de espectrina conectadas mediante dos uniones complejas, cuyos brazos pueden estar unidos de diversas formas; dos filamentos de espectrina unidos a dos CU, y cuatro moléculas de espectrina unidas a dos complejos unión [89].

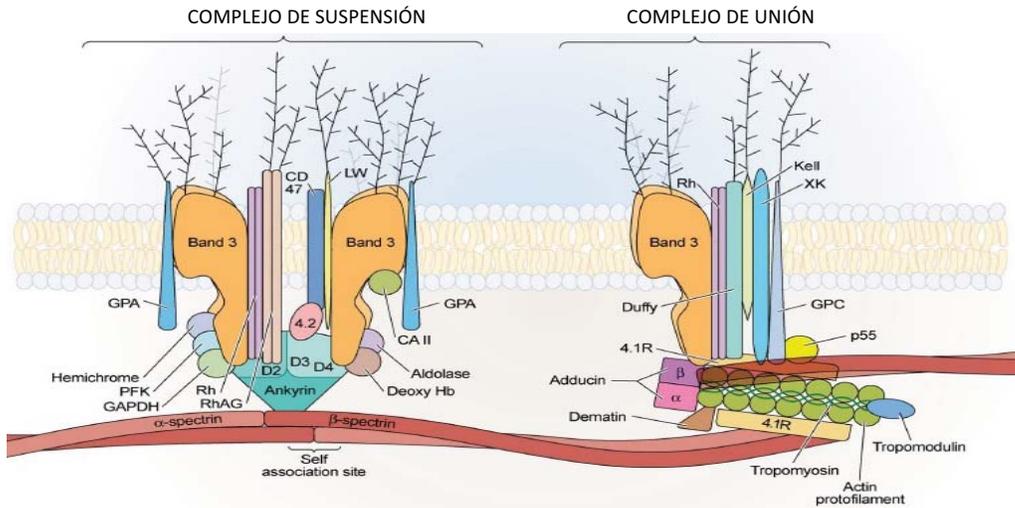


Figura 45. Izquierda: representación esquemática del complejo de suspensión anclado a la espectrina cerca de su centro. Está compuesto por la banda 3 que está ligada a la anquirina y que a su vez se ancla a la espectrina; la proteína 4.2, a la que se le unen la banda 3 y la anquirina; y por las glicoproteínas se unen a la banda 3, entre otras proteínas. Derecha: esquema del complejo de unión que contienen espectrina, F-actina y proteína de banda 4.1, así como las proteínas que se unen a la actina como tropomiosina, tropomodulina, aducina, etc. [70].

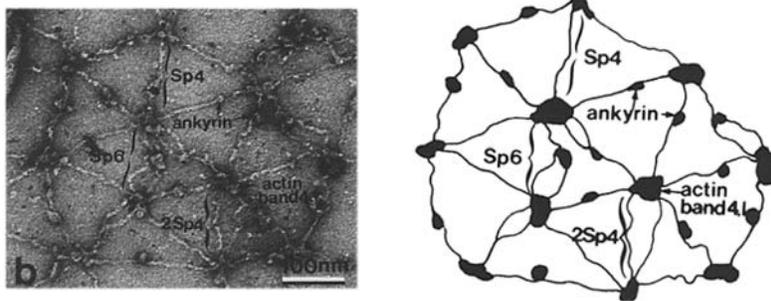


Figura 46. Distribución hexagonal con complejos unión. Los tetrámeros de espectrina (Sp4), la red de tres espectrinas (Sp6), los dobles filamentos del tetrámero de espectrina (2Sp4). En la figura de la derecha se representa esto de forma más ilustrativa [89].

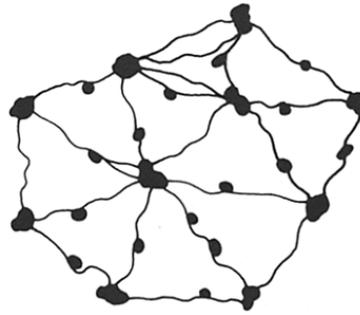
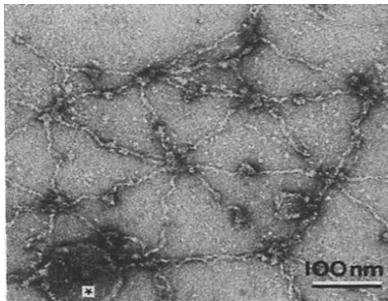


Figura 47. Subunidades heptagonales y pentagonales del citoesqueleto [89].

La red de espectrina puede formar ya sea tetrámeros (en un 45-55%) u oligómeros (25-35%), que son la unión entre dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. Los hexámeros son los más abundantes, representando un 14% del total de configuraciones de la espectrina.

Los tetrámeros de espectrina en una membrana sin esfuerzos se encuentran en equilibrio con los dímeros que los conforman. Cuando se induce una deformación, este equilibrio desaparece y se separan las uniones temporalmente, de tal forma que los esfuerzos que se distribuyen en toda la membrana logran grandes deformaciones para atravesar por la microcirculación. Cuando regresa al equilibrio, adquiere su forma original recuperando los complejos unión [90]. Aquí, la célula se comporta como un sólido elástico débil a bajos niveles de esfuerzo, mientras que puede comportarse como un fluido cuando se le aplican deformaciones más altas. Los experimentos muestran que la estructura del citoesqueleto está regulada por factores bioquímicos como las concentraciones del  $\text{Ca}^{2+}$  y del ATP (adenosin trifosfato), además de que se ha postulado que la fosforilación afecta la unión de la actina con la espectrina y produce cambios en su forma y, por lo tanto, en la deformabilidad del eritrocito [91].

### 1.4.3 Hemoglobina (Hb)

La hemoglobina es una proteína globular que constituye el 95% del contenido de los eritrocitos. Ella es la transportadora del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) a partir de los pulmones a los tejidos periféricos, y del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y protones de hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) de estos tejidos hacia los pulmones para ser excretados. En condiciones normales, las concentraciones de hemoglobina en la sangre varían desde 13-18 g/dl en el hombre y de 12-16 g/dl en la mujer.

La Hb consta de cuatro estructuras polipeptídicas: dos cadenas  $\alpha$  (141 aminoácidos) y dos  $\beta$  (146 aminoácidos), ésta es la llamada *hemoglobina adulta*, HbA [92]; también puede tener dos  $\alpha$  y dos  $\gamma$  (otra forma de la hemoglobina adulta, presente en un 2%, HbA<sub>2</sub>), dos  $\alpha$  y dos  $\gamma$  (hemoglobina fetal HbF). Su peso molecular es de 64 kDa.

La HbA está formada por cuatro grupos prostéticos o *hemo* y una proteína de estructura cuaternaria, *globina*. El primero es un tetrapirrol cíclico, con un hierro en el centro de cada uno (Figura 48). El hierro se encuentra en estado de oxidación,  $\text{Fe}^{2+}$ . Puede formar entre 5 y 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la HbA (oxiHb y desoxiHb). La globina es la parte protéica de la HbA (las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).

Se calcula que por cada litro de sangre hay 150g de *Hb* y que cada uno de ellos disuelve 1.34ml de  $O_2$ , en total se transportan 200ml de  $O_2$  por litro de sangre. Esto es, 87 veces más de lo que el plasma por sí solo podría transportar.

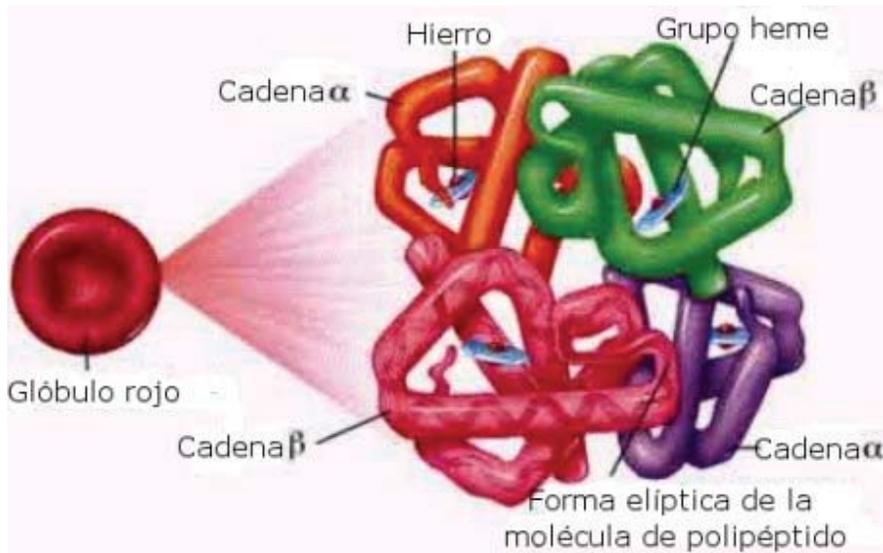


Figura 48. Estructura de la hemoglobina [93]

## 1.5 GLUCOSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

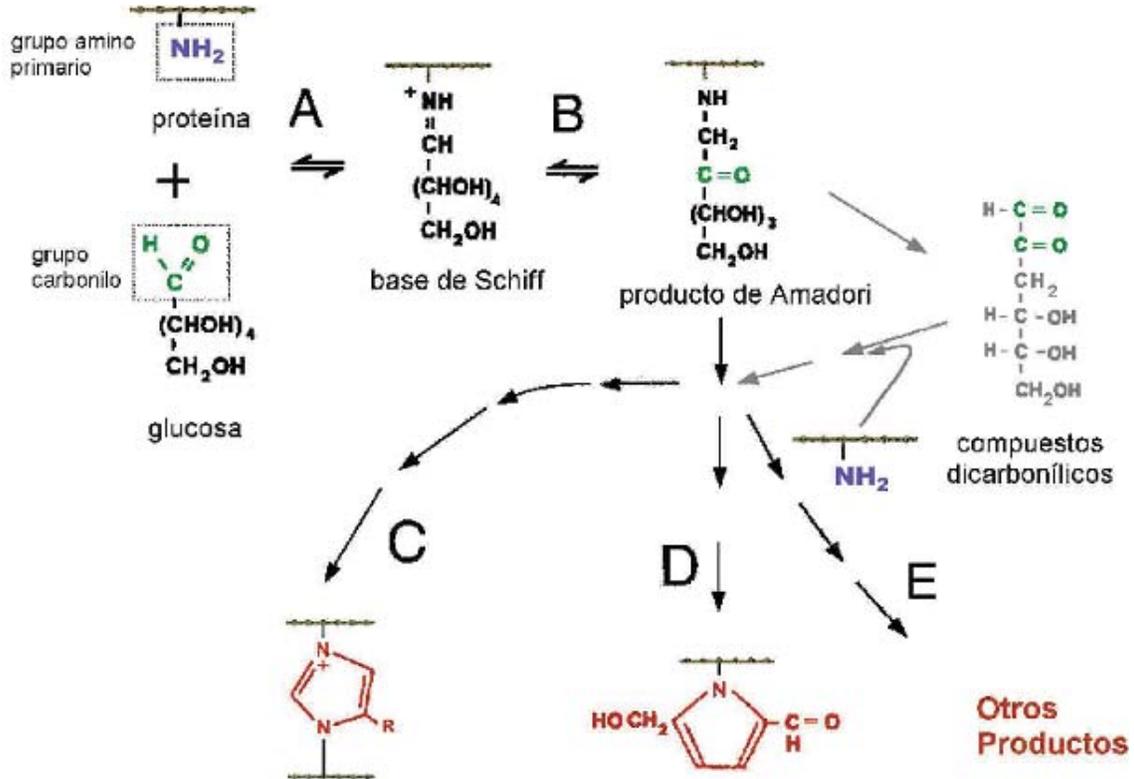


Figura 49. Productos de glucosilación avanzada. Esquema de reacción del proceso de glucosilación no enzimática de proteínas (A) Formación de la base de Schiff (B) Reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas, los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc.).

La glucosilación es la reacción de grupos amino primarios ( $\text{NH}_2$ ), péptidos y proteínas con el grupo carbonilo de los azúcares reductores. A lo largo de esta reacción se pueden distinguir tres etapas: inicialmente se produce la asociación de la molécula de glucosa con la proteína, formando un compuesto denominado Base de Schiff (Figura 49A), cuya estructura se reordena hasta tomar una forma más estable, denominada producto de Amadori (Figura 49B). Enseguida éste sufre de complejas transformaciones que lo llevan a la formación de compuestos más complejos (generalmente coloreados y/o fluorescentes) (Figura 49C, D y E), cuya cantidad depende de la concentración de azúcares reductores y de la vida media de las proteínas, es decir, del tiempo de exposición de éstas a los azúcares. Si una proteína tiene un tiempo de vida corto, la glucosilación no enzimática llega, en general, hasta el producto de Amadori (siendo aún reversible el proceso); de lo contrario, se completa el esquema.

### 1.5.1 Características de las Especies Reactivas

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Su concentración en el plasma depende del mecanismo de regulación de los individuos sanos, aumentando de manera importante en personas diabéticas.

Es un monosacárido cuya fórmula es  $C_6H_{12}O_6$ . Existen diversas formas en que la glucosa puede estar; las más estables, sin embargo, son las que están cerradas.

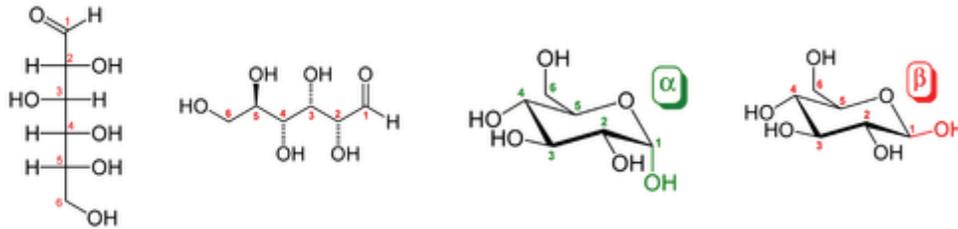


Figura 50. Representaciones de las formas lineal y cíclica de la D-glucosa. Las formas abiertas representan el 0.0002% del total de la glucosa en sangre, ya que son las menos estables [94]. Las dos últimas son glucopiranos alfa y beta, respectivamente. Son las más abundantes.

La glucosa posee un grupo carbonilo libre que puede reaccionar con los grupos amino de las proteínas para formar bases Schiff. La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo.

Los aminoácidos, unidad estructural de todas las proteínas, poseen un grupo amino primario, un grupo carboxilo y una cadena lateral característica de cada aminoácido (Figura 51). Al formarse una proteína se produce la reacción entre el grupo carboxilo del primer aminoácido y el grupo amino del siguiente formándose un enlace peptídico (Figura 52). Una vez formada la cadena polipeptídica, sólo quedará el grupo amino primario del primer aminoácido, constituyendo el denominado *grupo amino terminal*, siendo éste el que reacciona con el grupo carbonilo libre de la glucosa (además de que algunos aminoácidos poseen en su cadena lateral grupos capaces de reaccionar con los azúcares reductores).

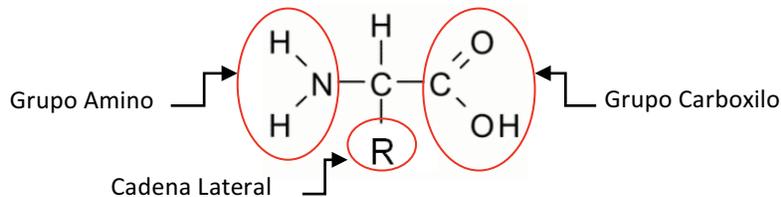


Figura 51. Unidad estructural de la proteína: Aminoácido [95].

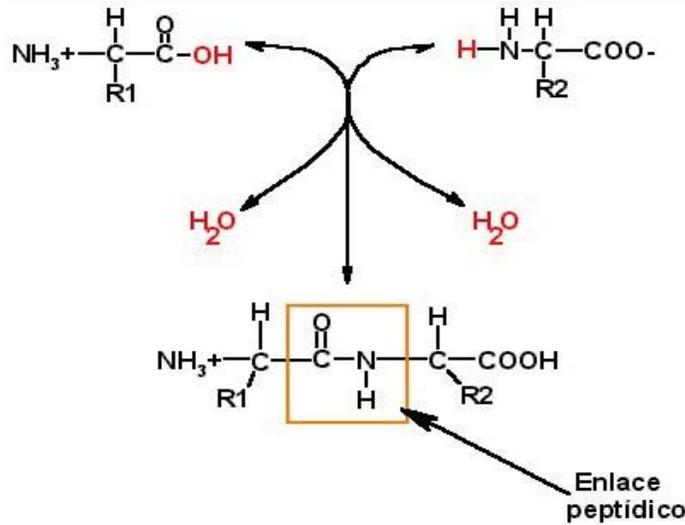


Figura 52. Enlace peptídico [96].

Por otro lado, no todos los grupos son capaces de reaccionar con el grupo carbonilo de los azúcares, ya que pueden estar ocultos en la estructura tridimensional de la proteína de modo que las moléculas de los azúcares no tienen acceso a ellos.

### 1.5.2 Etapas Reversibles del Proceso de Glucosilación

Como ya habíamos mencionado, primero reacciona un azúcar reductor con una proteína mediante la adición del grupo amino de ésta al grupo carbonilo del azúcar, formando la **base de Schiff**. Esta molécula es estable durante un tiempo corto (horas), luego del cual se inicia un proceso de reordenamiento de los enlaces químicos que da lugar a un producto más estable denominado **producto de Amadori**, que posee un grupo carboxilo capaz de reaccionar con los grupos aminos disponibles, estabilizando su estructura a través de equilibrios entre una forma abierta y otras cerradas, manteniéndose así de 2-4 semanas.

El hecho de que ambas reacciones sean reversibles y consecutivas determina que de acuerdo al tiempo de evolución habrá predominio de la base de Schiff (horas) o del producto de Amadori (días). La interrupción del contacto de la glucosa con la proteína en cualquiera de estas etapas produce la reversión completa del efecto.

### 1.5.3 Glucosilación de Proteínas en la Diabetes Mellitus y el Envejecimiento del Eritrocito

Las proteínas de vida media corta como las plasmáticas, y las presentes en células que son rápidamente reemplazadas como la hemoglobina en los eritrocitos, alcanzan a formar bases de Schiff o productos de Amadori. Por otro lado, las proteínas de bajo recambio como el colágeno, la mielina, la proteína del cristalino ocular, que tienen vida media larga, pueden llegar a transformarse en productos de

glucosilación avanzada, ocasionando: 1) la modificación de proteínas estructurales que se encuentran fuera de la célula, 2) el desencadenamiento de procesos intracelulares a través de la unión a receptores extracelulares y 3) la alteración de proteínas intracelulares [97].

Durante el tiempo que el eritrocito está en la circulación, además de las proteínas de membrana y el citoesqueleto, la Hb se glucosila progresivamente, debido a que la molécula de glucosa reacciona espontáneamente con el extremo  $\text{NH}_2$  terminal (amino) de la cadena  $\beta$  de la Hb, para formar  $\beta$ -NA1 valina o hemoglobina glucosilada A1 (correspondiente a la base de Schiff). Luego de un proceso de reordenamiento se llega a los productos de Amadori, donde se forman ketoaminas con las terminales  $\text{NH}_2$  de la cadena  $\alpha$ , y con algunos residuos de lisina de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\beta$ -Lys 66,  $\alpha$ -Lys 61,  $\beta$ -lys 17 y  $\alpha$ -lys 40), siendo éstos los que con mayor afinidad se glucosilan. Aparentemente la responsable de la fácil difusión de la glucosa a través de la membrana del eritrocito es la proteína de banda 4.5 [98].

El producto de Amadori puede producir oxidaciones posteriores y reacciones de reordenamiento, completando el esquema de glucosilación (Figura 49) y convirtiéndose en productos que juegan un rol aún más patogénico en el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares de la diabetes, alterando la estructura, cantidad y función de las proteínas del tejido [99].

## 1.6 FUNCIÓN DEL ERITROCITO

La función del eritrocito es el transporte de oxígeno,  $O_2$ , de los pulmones a los tejidos periféricos, y dióxido de carbono,  $CO_2$ , de éstos a los pulmones para ser exhalado. Como ya se había mencionado, el eritrocito está compuesto en su mayoría de hemoglobina, que es la proteína que se encarga del transporte de  $O_2$ ,  $CO_2$  y  $H^+$ . La *Hb* se satura en los pulmones con  $O_2$  al 98% y 33% en los tejidos, es decir, cede casi el 70% de todo el oxígeno que puede transportar.

Cuando el  $CO_2$  llega al eritrocito, reacciona con el  $H_2O$ , produciendo  $H_2CO_3$  en un 90% y el resto de  $CO_2$  se une a la hemoglobina generando carbamino Hb. El ácido carbónico pasa automáticamente a  $HCO_3^-$  y  $H^+$ . Este último se incorpora a la hemoglobina desoxigenada, generando  $HbH^+$ . La *Hb* retiene  $2H^+$  por cada molécula de  $O_2$  que pierde. El  $HCO_3^-$  difunde a través de la membrana eritrocitaria y en parte se intercambia por iones  $Cl^-$  del plasma. De esta manera se transporta la mayoría de  $CO_2$  y el restante se transporta como  $CO_2$  disuelto (5%).

En los pulmones se da el proceso inverso, el oxígeno se une a la desoxiHb y los  $H^+$  se liberan. El  $HCO_3^-$  de la sangre entra al eritrocito y sale el  $Cl^-$ . El  $H^+$  reacciona con el  $HCO_3^-$  y forma el ácido carbónico, éste se desdobra en  $CO_2$  y  $H_2O$ . El  $CO_2$  es exhalado y el agua sale a favor del gradiente, a medida que aumenta su concentración. Éste es un fenómeno reversible que se da entre los eritrocitos y el pulmón [31].

Los eritrocitos forman parte del 50% del volumen sanguíneo total y varían significativamente en área, volumen y propiedades mecánicas. Durante su vida media experimentan estrés tanto químico como mecánico al atravesar capilares delgados, resultando esto en una pérdida de área membranal. Esta disminución conlleva a un aumento del esfuerzo requerido para que pasen por capilares pequeños, liberando potasio y agua, disminuyendo su volumen. Consecuentemente, los eritrocitos envejecen, su densidad y la concentración de hemoglobina aumenta, causando precipitación en la membrana y daño a las proteínas integrales, así como a sus propiedades mecánicas, concluyendo esto en la destrucción del glóbulo rojo, y, por lo tanto, un deterioro importante en su función [100].

## 1.7 REOLOGÍA

La reología es el estudio de la deformación y flujo de un cuerpo al ser aplicadas fuerzas externas. La sangre, el único tejido líquido del cuerpo humano, tiene propiedades reológicas que se ven modificadas por diversos factores: desde la composición del fluido, que depende del metabolismo celular de todos los tejidos; de los cambios en morfología y deformabilidad de sus células, principalmente de los eritrocitos, debido a que pasan por capilares con diámetros de aproximadamente  $3\mu\text{m}$  y tienen que plegarse y extenderse de manera considerable; así como del calibre de los vasos sanguíneos y la velocidad del flujo. Al estudio de estas propiedades se le denomina hemorreología.

Las propiedades reológicas del eritrocito más importantes son: viscosidad aparente (relación entre esfuerzo de corte y velocidad de corte), coeficientes de esfuerzos normales, viscosidad compleja (respuesta ante esfuerzos de corte oscilatorio), módulo de almacenamiento y módulo de pérdidas (comportamiento viscoelástico lineal), funciones complejas de viscoelasticidad no lineal.

El comportamiento viscoelástico de la membrana eritrocitaria es aproximadamente lineal. Durante el proceso de la deformación se desarrollan tres sucesos significativos: (1) la membrana se extiende sin modificar el área de su superficie ya que opone una resistencia al movimiento; (2) flexión y plegamiento de la membrana, que implica una resistencia a la flexión debida a la rigidez de la misma; y, (3) una resistencia ejercida por la viscosidad de la hemoglobina. Enseguida, el eritrocito recupera su forma bicóncava original en 0.1s, aproximadamente. Ya que el interior del citoplasma es líquido, la habilidad de recuperar su forma original luego de la remoción de las fuerzas aplicadas es el resultado de la energía almacenada en la membrana y el citoesqueleto. Las fuerzas elásticas dependen únicamente de la cantidad de deformación; por otro lado, la viscosidad dentro de la membrana y en el medio adyacente a ella, limita la velocidad a la cual el eritrocito recupera su forma original.

### 1.7.1 Estrés y Esfuerzo

El *estrés* o la *tensión normal*,  $\sigma$ , se define como la fuerza ejercida por unidad de área, y puede dividirse en tres tipos: *estrés compresivo*, como el ejercido al aplicar presión; *estrés extensional*, contrario a la presión, donde se aplican fuerzas que estiran al material; y *estrés cortante*, donde la fuerza se ejerce tangencial o paralelamente a la superficie (Figura 53). El estrés tiene unidades de fuerza por unidad de área  $\left[\frac{N}{m^2}\right]$ .

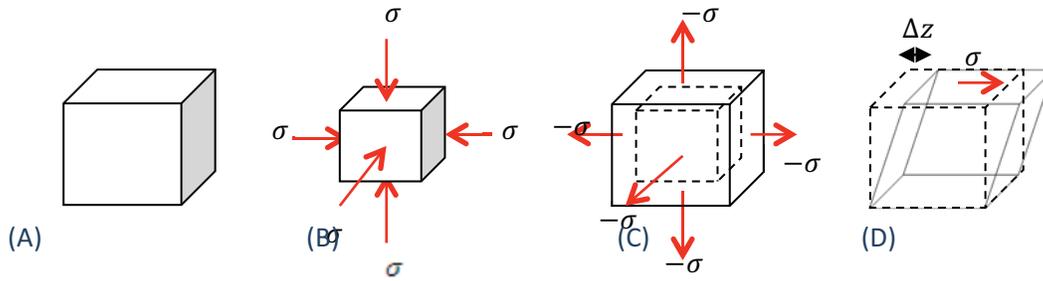


Figura 53. Ejemplo de la aplicación de los tres tipos de estrés. Del lado izquierdo se observa un cuerpo en equilibrio (A), enseguida se le aplica un estrés compresivo y se ve que su tamaño se reduce (B); después un estrés extensional, donde su tamaño aumenta (C); y, finalmente, el de cizallamiento o estrés cortante, cuya fuerza es tangencial a la superficie (D).

Cuando se aplica cierto estrés a un material, éste sufrirá una deformación (Figura 54). Para esto se define el *esfuerzo*,  $\epsilon$ , que es la deformación por unidad de longitud.

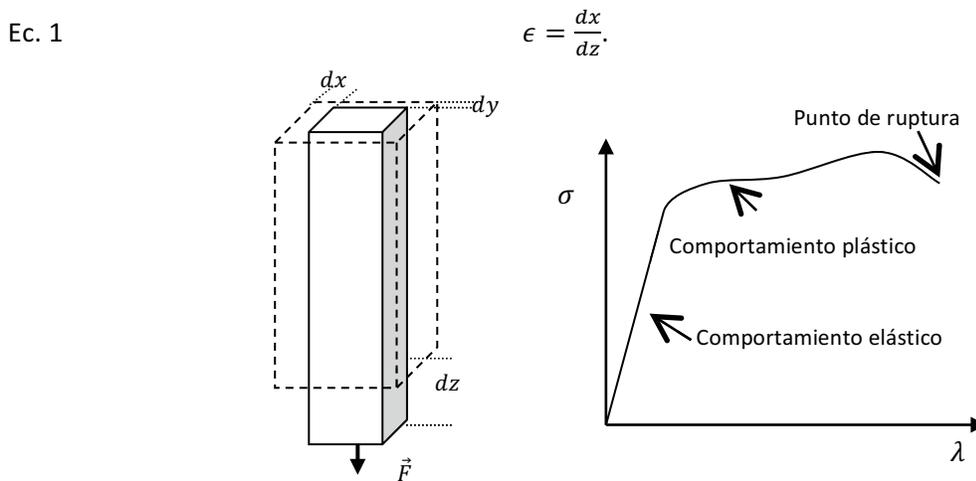


Figura 54. Curva estrés-esfuerzo. Si se estira un bloque de uno de sus extremos con una fuerza  $\vec{F}$ , el bloque disminuirá su tamaño en el plano  $xy$  por cantidades infinitesimales  $dx$  y  $dy$ . El coeficiente que relaciona el estrés aplicado y el esfuerzo resultante se denomina Módulo de elasticidad.

### 1.7.2 Elasticidad ( $\mu$ )

Si se le aplica una deformación y el tiempo de relajación es largo,  $\tau$ , comparado con el que se necesita para realizar las mediciones reológicas, se considera que el fluido se comporta “como sólido”. Si este material regresa a su posición original luego de la deformación, entonces se considera elástico. Sus unidades en el Sistema Internacional son  $[N/m^2]$ .

En el caso de que tenga comportamiento Hookeano, donde la relación entre el estrés y el esfuerzo cortante es lineal, se considera que el material es isotrópico, es decir, que las propiedades físicas de ese sólido no dependerán de la dirección. Entonces, de forma tensorial tenemos que:

Ec. 2

$$\sigma_{ij} = C_{ijkl}\epsilon_{kl}$$

donde  $\sigma_{ij}$  es el tensor de estrés,  $\epsilon_{kl}$  es el tensor de esfuerzos y  $C_{ijkl}$  es el tensor de constantes elásticas de proporcionalidad, que son independientes de las dos variables anteriores. Ya que el estrés aplicado es cortante e independiente de la dirección donde se aplica, esta constante elástica se llama *Módulo de Elasticidad Transversal* o *Módulo de Elasticidad Cortante*,  $\mu$ .

## 1.8 ELASTICIDAD DEL SISTEMA MEMBRANA-CITOESQUELETO

Para caracterizar la elasticidad de un material se debe aplicar una fuerza por unidad de área (estrés) y medir la deformación resultante (esfuerzo). Debido a que el conjunto membrana más citoesqueleto del eritrocito tiene un comportamiento elástico aproximadamente lineal (para grandes esfuerzos) y la deformación no depende de la dirección, el módulo de elasticidad,  $\mu$ , se define como la pendiente de la curva estrés-esfuerzo (Figura 55) [37]. Éste representa la energía almacenada debida a la extensión de la membrana en el plano de la superficie sin modificar su área. Las unidades de este último son fuerza por unidad de longitud y se normaliza con el espesor de la membrana ( $100\text{Å}$ ), para obtener fuerza por unidad de área [120].

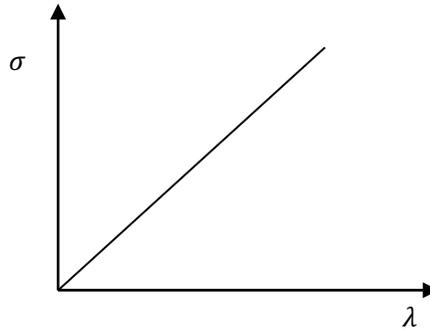


Figura 55. Curva estrés-esfuerzo para materiales elásticos.

Para los cálculos, la membrana del eritrocito se considera como un material incompresible, bidimensional e isotrópico (en cuanto a las propiedades viscoelásticas): continuo en dos dimensiones, con un carácter molecular en la tercera dimensión. De esta manera, las tensiones aplicadas no actúan de forma normal a la superficie, sino se distribuyen sobre el plano, de tal manera que la membrana no cambia su espesor, sólo su forma. Por esta razón, las fuerzas aplicadas se consideran distribuidas por unidad de longitud [101]. El interior del eritrocito se encuentra en estado líquido, permitiendo una resistencia a la deformación despreciable [102]. La membrana puede resistir grandes tensiones por cortos periodos de tiempo, pero a esfuerzos más altos eventualmente se rompe, esta dependencia en el tiempo implica la existencia de una componente viscosa [103, 104].

### 1.8.1 Análisis teórico de la succión con micropipetas

Las propiedades viscoelásticas de la membrana del eritrocito dependen del tiempo que dure la deformación, esto significa un rearrreglo molecular en respuesta al esfuerzo. Para caracterizar la elasticidad del sistema membrana-citoesqueleto es necesario conocer las componentes de la tensión,  $T$ , debidas a la aplicación de fuerzas externas, en este caso, aquellas que producen estrechamiento y cambio de curvatura de la membrana (Figura 56), ya que el análisis de la deformación con micropipetas se basa en la aspiración a una presión  $P$ , que produce una tensión  $T$  en el plano de la membrana, con área superficial constante, donde se ha situado la pipeta, que es un cilindro de radio  $R_p$  (Figura 57).

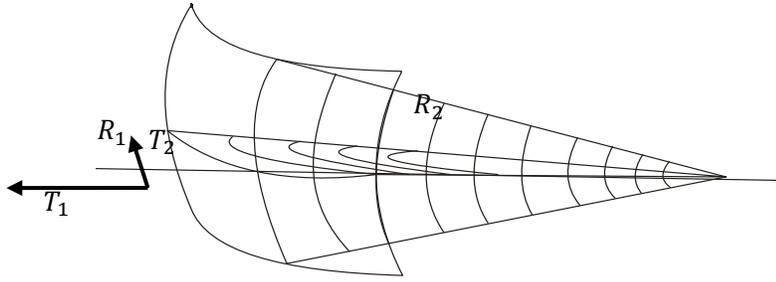


Figura 56. Aquí se muestran los dos principales radios de curvatura de un elemento de membrana ( $1/R_1$  y  $1/R_2$ ), así como las tensiones respectivas en las diferentes direcciones de deformación.

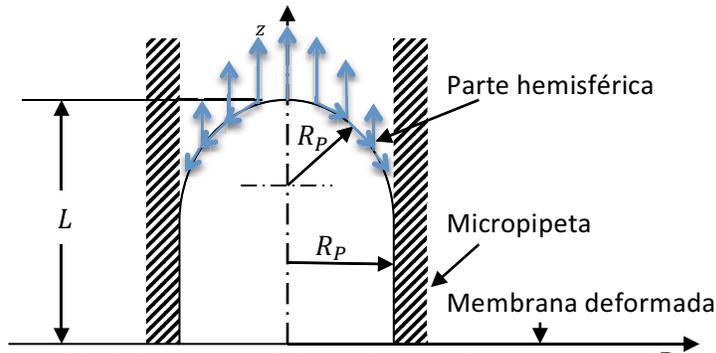


Figura 57. Modelo de la aspiración de la membrana mediante una pipeta cilíndrica de radio  $R_p$ .

Durante la deformación, la tensión se divide en dos componentes: la tensión ejercida en dirección radial (por la dirección en que es aplicada la presión), y la angular (debida a la curvatura de la membrana). Ambas direcciones de deformación dependen de la posición en  $R$  en que se encuentren. Por simetría, el radio de curvatura es el mismo en ambas direcciones de deformación  $R_1 = R_2 = R$ , (Figura 57).

Ya que la membrana resiste gran dilatación, las deformaciones son esencialmente a área constante. Por ello se requiere únicamente un coeficiente de extensión,  $\lambda$ , que describa la deformación en términos de las coordenadas iniciales y finales,  $R_0$  y  $R$ , respectivamente.

Ec. 3 
$$\lambda_1 = \frac{\Delta R}{\Delta R_0}.$$

Y, considerando que la membrana es incompresible, se debe cumplir que  $\lambda_1 = \lambda_2^{-1}$ . La parte deformada está compuesta de un cilindro más una tapa hemisférica, ambos de radio  $R_p$ . El primero tiene una altura  $L - R_p$ , y su área es  $2\pi R_p(L - R_p) = 2\pi R_p L - 2\pi R_p^2$ ; el área de la parte hemisférica es  $\pi R_p^2$ . Por lo tanto, el área total es  $2\pi R_p L - \pi R_p^2$ , así el área luego de la deformación es:

Ec. 4 
$$\pi R_0^2 = \pi R^2 - \pi R_p^2 + 2\pi R_p L.$$

De aquí:

Ec. 5 
$$\lambda_1 = \frac{\Delta R}{\Delta R_0} = \frac{(R^2 + 2R_p L - R_p^2)^{1/2}}{R}.$$

Por otro lado, ya que el sistema de coordenadas de la deformación (donde simplemente hay extensión y compresión, no cizalladura), el tensor de esfuerzos Lagrangiano,  $\epsilon_{ij}$ , puede expresarse en términos del vector deformación [105]:

Ec. 6 
$$\epsilon_{11} = \frac{(\lambda_1^2 - 1)}{2} = \frac{2R_p L - R_p^2}{2R^2},$$

$$\epsilon_{22} = \frac{(\lambda_1^{-2} - 1)}{2} = \frac{R_p^2 - 2R_p L}{2(R^2 + 2R_p L - R_p^2)}.$$

Cuando se realiza la extensión y se deja pasar un tiempo, hay evidencia de una variación de la longitud, lo que implica una componente viscosa. Para ello, calculamos la tasa del tensor de deformación,  $V_{ij}(s^{-1})$ , que se define mediante el cambio en el tiempo del cuadrado de la métrica entre las coordenadas iniciales y finales. Cuando  $L \geq R_p$  se considerará que la porción aspirada tiene forma hemisférica de radio  $R_p$  unida a un cilindro con radio  $R_p$  y altura  $L - R_p$ , por lo tanto, la tasa de esfuerzo,  $V_{ij}$ , definida en términos del coeficiente de extensión (considerando  $R_0$  constante), es:

Ec. 7 
$$V_{11} = \dot{\lambda}_1 / \lambda_1 = R_p \dot{L} / R^2$$

$$V_{22} = -\dot{\lambda}_1 / \lambda_1 = -R_p \dot{L} / R^2.$$

El balance de fuerzas y las ecuaciones de equilibrio de la membrana requieren dos hipótesis principales que permitan la continuidad de las tensiones de la región aspirada al resto de la superficie: (a) la membrana es aspirada firmemente dentro de las paredes de la pipeta, es decir, se encuentra tirante sin fricción contra el vidrio y (b) se desprecian los momentos producidos por alguna flexión en la membrana. Para calcular la tensión total sobre la membrana es importante considerar que el comportamiento viscoelástico involucra dos términos: uno que se refiere a la energía almacenada durante la deformación (elasticidad), y el otro se relaciona con la disipación interna (viscosidad).

Ec. 8 
$$T_{ij} = T_{ij}^e + T_{ij}^v = -p\delta_{ij} + 2\mu\epsilon_{ij} + 2\eta V_{ij},$$

donde  $T_{ij}[N/m]$  es la tensión ejercida sobre la membrana,  $-p$  es la presión,  $\delta_{ij}$  es la función delta de Kronecker, que representa la matriz identidad (vale 1 para  $i = j$  y 0 para  $i \neq j$ );  $\mu[N/m]$  es el módulo de rigidez, que corresponde a la componente elástica de la tensión;  $\eta[N \cdot s/m]$  es el parámetro que caracteriza la disipación viscosa y  $V_{ij}$  es la tasa de deformación, estos últimos corresponden a la componente viscosa de la tensión [106]. Por lo tanto, mediante las Ec. 6-13, tenemos que las componentes de la tensión son:

Ec. 9 
$$T_{11} = -p + \mu \left[ \frac{2R_p L - R_p^2}{R^2} \right] + 2\eta \frac{\dot{L} R_p}{R^2},$$

$$T_{22} = -p + \mu \left[ \frac{R_p^2 - 2R_p L}{R^2 + 2R_p L - R_p^2} \right] - 2\eta \frac{\dot{L} R_p}{R^2}.$$

Ya que se asume que la tensión es continua en la punta de la pipeta, entonces el tensor de esfuerzos inicial, al colocarla sobre la membrana antes de la extensión, se encuentra mediante el análisis de Laplace [107] (que es la ley que relaciona el cambio de presiones en el interior y el exterior de una gota, con la tensión producida en la superficie):

$$\text{Ec. 10} \quad T = \frac{R_p \Delta P}{2},$$

donde  $\Delta P$  es la presión aplicada durante la extensión. El coeficiente de deformación y la tensión principal,  $T_{11}$ , se definen por la dirección de la extensión. En equilibrio, el balance de fuerzas superficiales y volumétricas, considerando que la única variación es en  $R$ , indica que:

$$\text{Ec. 11} \quad T_{11} - T_{22} + R \left( \frac{dT}{dR} \right) = 0.$$

es decir, si consideramos la integración de  $-\infty$  a  $R_p$  (por ser una extensión), la ecuación anterior se convierte en:

$$\text{Ec. 12} \quad T = \int_{R_p}^{\infty} (T_{11} - T_{22}) \frac{dR}{R}.$$

Usando Ec. 9,

$$\text{Ec. 13} \quad T = \frac{\mu}{2} \left[ \ln \left( \frac{2L}{R_p} \right) + \frac{2L - R_p}{R_p} \right] + 2\eta \frac{\dot{L}}{R_p} = \frac{R_p \Delta P}{2}.$$

De aquí, si se realiza un cambio de variable con  $x = L/R_p$  y  $\tau = \eta/\mu$ , como la constante de tiempo que relaciona la viscosidad con la elasticidad, tenemos que:

$$\text{Ec. 14} \quad \Delta P \frac{R_p}{\mu} = \ln(2x) + 2x - 1 + 4\tau \dot{x}.$$

Considerando que durante la deformación se llega a una longitud máxima,  $L_m$  (con  $x \rightarrow x_m$ ), vemos que:

$$\text{Ec. 15} \quad \Delta P \frac{R_p}{\mu} = \ln(2x_m) + 2x_m - 1,$$

y según la (Figura 58), para  $x_m \leq 4$  esta curva tiene un comportamiento lineal y puede aproximarse por la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 16} \quad \Delta P \frac{R_p}{\mu} = ax_m + b = ax + b + 4\tau \dot{x}.$$

La pendiente de la gráfica corresponde al módulo de elasticidad [37]. Luego de la extensión viene la fase de recuperación, es decir, al dejar de aplicar presión pasa un tiempo en el que el eritrocito regresa a su forma inicial mediante un comportamiento exponencial del tiempo, característica que corresponde al modelo de un sólido viscoelástico [108]. En este caso, la constante de tiempo  $\tau$  se le denomina constante de tiempo de recuperación, que dará una relación entre la viscosidad y la elasticidad durante la aspiración de la membrana mediante la relación  $\tau_r = \eta/\mu$  y la Ec. 18. Utilizando la Ec. 14, con  $a = 2.45$  y  $b = -0.603$ ;  $\Delta P = 0$  [108], podemos encontrar la constante de tiempo de relajación que nos va a permitir calcular la viscosidad.

Ec. 17

$$ax + b + 4\tau\dot{x} = 0,$$

Si  $t_1 = t(x = 1)$ , al integrar:

Ec. 18

$$\frac{t-t_1}{\tau_r} = -1.633 \ln \left[ \frac{L^m/R_p^{-0.246}}{L/R_p^{-0.246}} \right].$$

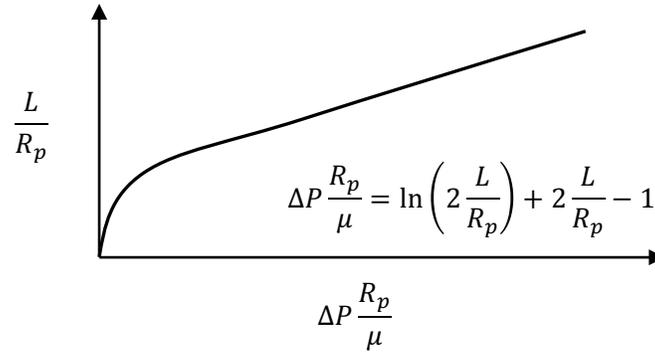


Figura 58. Curva estrés-esfuerzo. Representa la diferencia de presiones requeridas para aspirar la membrana a una distancia  $L$  dentro de la pipeta. La curva se normaliza porque se quiere que sea independiente de  $R_p$  y  $\mu$ , ya que se asume que ésta es constante [120].

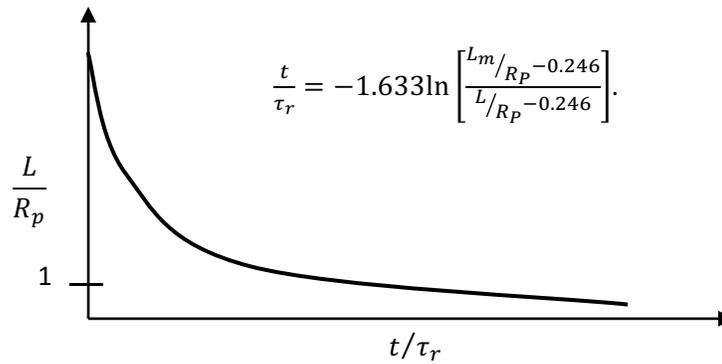


Figura 59. Curva de relajación. La relajación de la membrana es de forma exponencial, y la constante de tiempo respectiva se relaciona con la viscosidad y la elasticidad mediante  $\tau_r = \eta/\mu$ .

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de las propiedades reológicas del eritrocito es fundamental para entender el comportamiento reológico de la sangre. En muchas patologías, los parámetros hemoreológicos se encuentran alterados, lo que conlleva a un daño importante a nivel de la microcirculación. La disminución de la deformabilidad de los eritrocitos para circular por la red capilar es uno de los factores más importantes que impide la efectiva respiración celular, ya sea porque ocluyen a los capilares promoviendo una ruptura de los mismos o porque aumentan la resistencia del flujo en la circulación.

La DM, que se caracteriza por altas concentraciones prolongadas de glucosa en sangre, desarrolla complicaciones circulatorias que son la razón de la condición de discapacidad en esta patología. Por esta razón es necesario conocer las propiedades elásticas del sistema membrana-citoesqueleto en pacientes diabéticos como un parámetro de factor de riesgo al daño vascular irreversible.

# HIPÓTESIS

La deformabilidad del eritrocito depende de las propiedades elásticas del sistema membrana-citoesqueleto, que son modificadas, entre otros procesos, por la glucosilación irreversible de las proteínas que lo componen. Por lo que la deformabilidad de los eritrocitos provenientes de pacientes con DMT2 será menor que en el caso control por un aumento en la rigidez de la membrana y habrá variaciones en tamaño y complejidad de las formas eritrocitarias entre ambos casos.

# OBJETIVO

Relacionar la información obtenida de tamaño y complejidad mediante citometría de flujo de los eritrocitos de sujetos control y de pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II (DMT2) con daño vascular, con la medición de la deformación del eritrocito producida por succión con micropipetas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la información proporcionada por citometría de flujo acerca de las diferentes formas eritrocitarias presentes en un sujeto sano y un paciente diabético con complicaciones vasculares severas como RD, NeD o ND. Comparar los resultados cualitativamente con lo publicado en la literatura.
- Medir y comparar la elasticidad de eritrocitos aislados de sangre normal y de pacientes con DMT2 con complicación vascular.

# CAPÍTULO 3

---

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.1 SEPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS

Es importante mantener a los eritrocitos a temperatura ambiente (~20°C), ya que la elasticidad de los mismos puede verse afectada si pasan por un proceso de congelación previo [109].

#### 3.1.1 Centrifugación Diferencial

La centrifugación diferencial permite la separación de células y partículas del mismo tamaño, forma y densidad, en distintas zonas del gradiente sin ser mezclados [110]. La centrifugación que separa por tamaños se llama *centrifugación zonal o diferencial*. Esta técnica se basa en la velocidad de sedimentación de los componentes de la muestra al colocarla en un medio que forma un gradiente de densidad, lo que favorece la concentración de cada tipo celular en una zona particular de la solución. La densidad máxima de este medio deberá ser menor a la de las células, para que éstas puedan alcanzar la zona que les corresponde de acuerdo al tiempo y velocidad de centrifugación [111].

El gradiente de densidad se realizó con Ficoll-Hypaque (ph 7.4, 2:1). Éste es un polisacárido que permite gradientes de densidad discontinuos, de tal manera que los componentes de la muestra puedan diferenciarse en zonas específicas. La ventaja de este gradiente es que no contiene grupos ionizables que puedan servir de unión a muestras, además de ser muy estable a pH neutro y alcalino [112].

La muestra se colocó durante 30 min (3000rpm, 20°C) en una centrífuga Sorval R5C con un rotor SS34 (Figura 60). Éste posee un ángulo fijo en su estructura, lo que permite que las partículas tengan poca distancia que recorrer antes de sedimentarse; de esta manera se utiliza un tiempo de centrifugación corto.

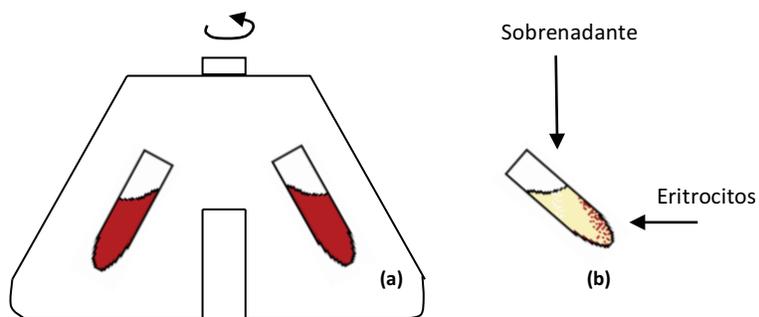


Figura 60. Centrifugación de la sangre. **(a)** Rotor de ángulo fijo, **(b)** Las partículas recorren menos distancia, permitiendo un tiempo de centrifugación relativamente corto.

El resultado de este procedimiento fue una separación en bandas (Figura 61). Alrededor del 45% del volumen consiste en elementos formes y el 55% es plasma sanguíneo. Éste se localizará en la parte superior de la muestra centrifugada, con algunos de los componentes orgánicos e inorgánicos que viven en él; luego una banda blanca delgada que corresponde a los leucocitos; enseguida una capa transparente de Ficoll-Hypaque; posteriormente los granulocitos sobre la capa de nuestro interés: los eritrocitos, que se encuentran en la parte inferior del tubo.

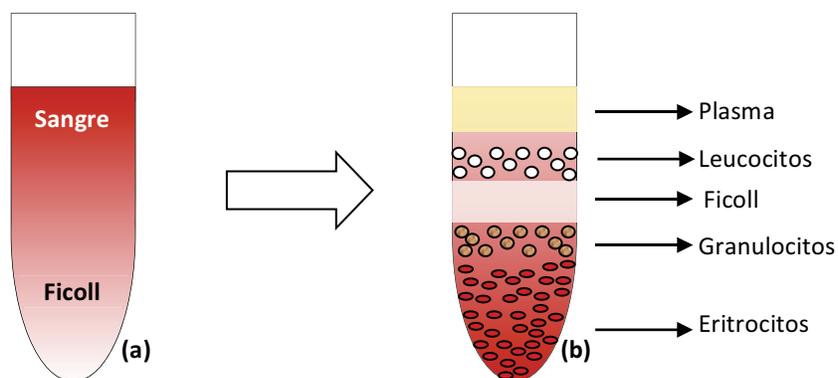


Figura 61. Separación de los componentes de la sangre. **(a)** La muestra se colocó con Ficoll-Hypaque 2:1, **(b)** Luego de la centrifugación, los componentes de la sangre se separaron en bandas: Leucocitos (arriba), granulocitos (en medio), y eritrocitos (abajo).

### 3.1.2 Homogeneidad de la muestra

Los eritrocitos, durante el transcurso de su vida media, van perdiendo fragmentos de membrana y agua, disminuyendo su volumen en un 25%, incrementando su densidad, viscosidad y fragilidad osmótica [113]. A este proceso se le denomina “envejecimiento” de la membrana. En una muestra sanguínea es seguro encontrar tanto eritrocitos jóvenes como viejos; para el propósito de esta tesis se utilizaron los primeros como muestra ideal.

Para este fin se quitó el sobrenadante y se tomó únicamente la capa superficial de la zona de eritrocitos, que corresponde a la población más joven, y se colocó en una solución salina de fosfatos, PBS, (pH 7.4, 20°C, en una concentración 2:1). Esta solución es muy útil para mantener la osmolaridad

del medio, hace el papel del plasma sanguíneo donde viven los glóbulos rojos. El PBS, en solución isotónica, permite que el eritrocito no se hinche o se desnutra, es decir, que viva en su estado de equilibrio osmótico.

### **3.1.3 Citometría de flujo**

Es una técnica cuantitativa que permite la medición de múltiples características físicas y químicas de células individuales en suspensión, como su tamaño, granularidad o complejidad interna; además de la evaluación de fluorocromos pegados a anticuerpos, que a su vez se encuentran unidos a la célula, ya sea en la membrana o en algún órgano interno de la misma. Luego de la medición de estos parámetros, el citómetro es capaz de separar las diversas poblaciones seleccionadas de la muestra en tubos diferentes.

La citometría de flujo consiste en hacer pasar miles de estas células a través de un láser para ser analizadas de forma individual y en un corto tiempo. Existen algunos sistemas que tienen una tasa de 100,000 partículas por segundo, colectando de 10 a 20 parámetros de cada una [114].

#### ***Sistema Hidráulico***

Es el encargado de hacer circular la muestra (con células de  $1 - 150\mu m$ ), hasta el punto de interrogación (o foco hidrodinámico), que es donde incide el láser. El flujo debe ser laminar, es decir, con un número de Reynolds no mayor a 2300, para evitar turbulencias que puedan interferir con la calidad óptica de las mediciones.

La solución (previamente diluida para evitar agregación) se introduce mediante un tubo de inyección que se encuentra en el centro del sistema, para posteriormente ser enfocada hidrodinámicamente a través un flujo coaxial que se mueve a lo largo de un cilindro de diámetro pequeño (Figura 62), creando un perfil de velocidades parabólico, con el máximo en el centro del mismo y casi cero en las paredes del vidrio (la velocidad es proporcional al cuadrado de la razón entre los diámetros mayor y menor). Esto es crucial porque las proteínas de los especímenes biológicos que se usan en citometría de flujo se adhieren a las superficies, incrementando, eventualmente, las turbulencias en el flujo antes laminar. Además de modificar el diámetro de la columna central de flujo de la muestra, se considera la presión de ésta, que es de  $1 - 2PSI$  más alta que la del flujo que la envuelve, forzando la alineación de las células en el centro; si esta presión se incrementa, el diámetro de ese centro disminuirá, desestabilizando el flujo de las células y disminuyendo la precisión y exactitud de la medición [115].

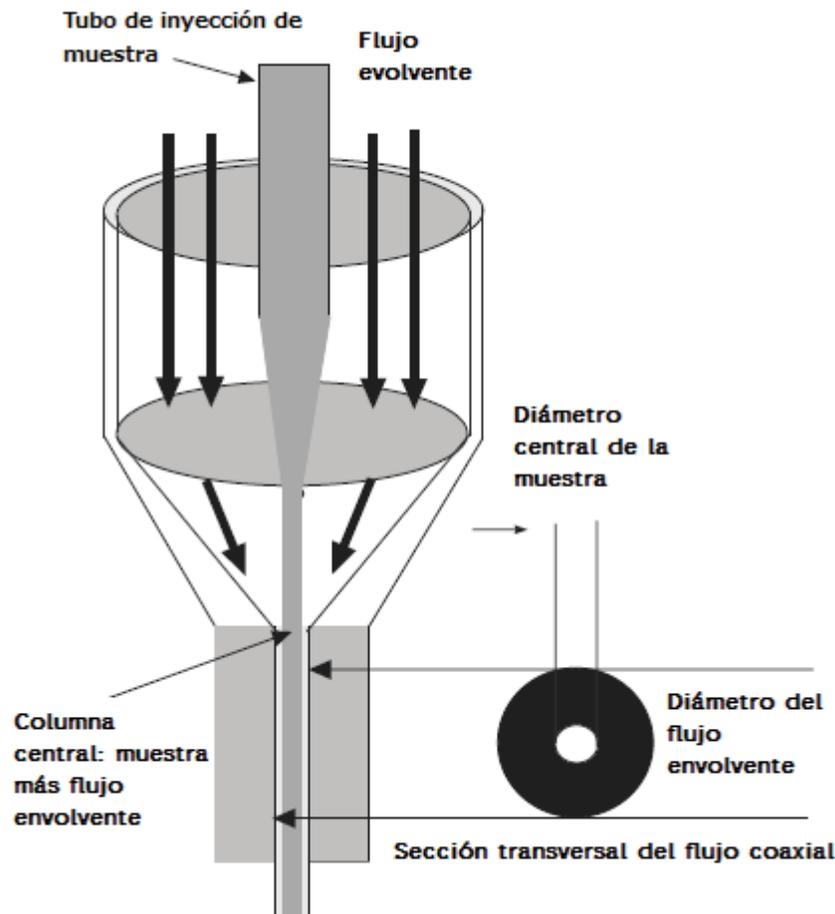


Figura 62. Esquema del sistema hidrodinámico del citómetro [115].

El flujo altamente acelerado de la columna central permite la separación espacial de las partículas dentro de la columna de la muestra, de esta manera es posible analizar las señales que se transmiten a través de las células con mayor exactitud.

### ***Sistema Óptico y Detectores***

La fuente debe coincidir con el espectro de absorción de los fluorocromos de interés. El láser de Argón es el más utilizado porque se pueden obtener diversas longitudes de onda con él: UV (350nm), Azul profundo (457nm), azul (488nm), azul verde (514nm). También es posible encontrar de manera conjunta, un citómetro que utilice, además del de argón, un diodo láser de He-Ne, cuya longitud de onda es de 633nm (rojo).

El perfil del haz es elíptico ( $15 \times 16 \mu m$ ), para producir una sección transversal larga, pero relativamente plana, que reduce la variación de la intensidad de la mancha focal cuando la partícula o la célula la atraviesa. Cuando el láser incide sobre la muestra hay dispersión de luz en todas direcciones, que se colecta por unos detectores localizados a  $90^\circ$  de la dirección de incidencia (detectores de dispersión lateral), y otro localizado justo en la dirección del haz (detector de dispersión hacia adelante). La luz dispersada o emitida por fluorescencia es colectada en tubos fotomultiplicadores a través de espejos y filtros ópticos (pasa bandas, pasa altas y pasa bajas) [116].

La intensidad de la luz colectada hacia adelante es proporcional al tamaño celular, así que la electrónica del detector de dispersión hacia adelante se encarga de hacer la transformación de intensidad a voltaje, para graficar esto respecto al tiempo y así relacionar la altura del pulso con el tamaño de la célula (Figura 63). El sistema de cómputo presenta un histograma del tamaño celular contra la frecuencia con que éstas aparecen.

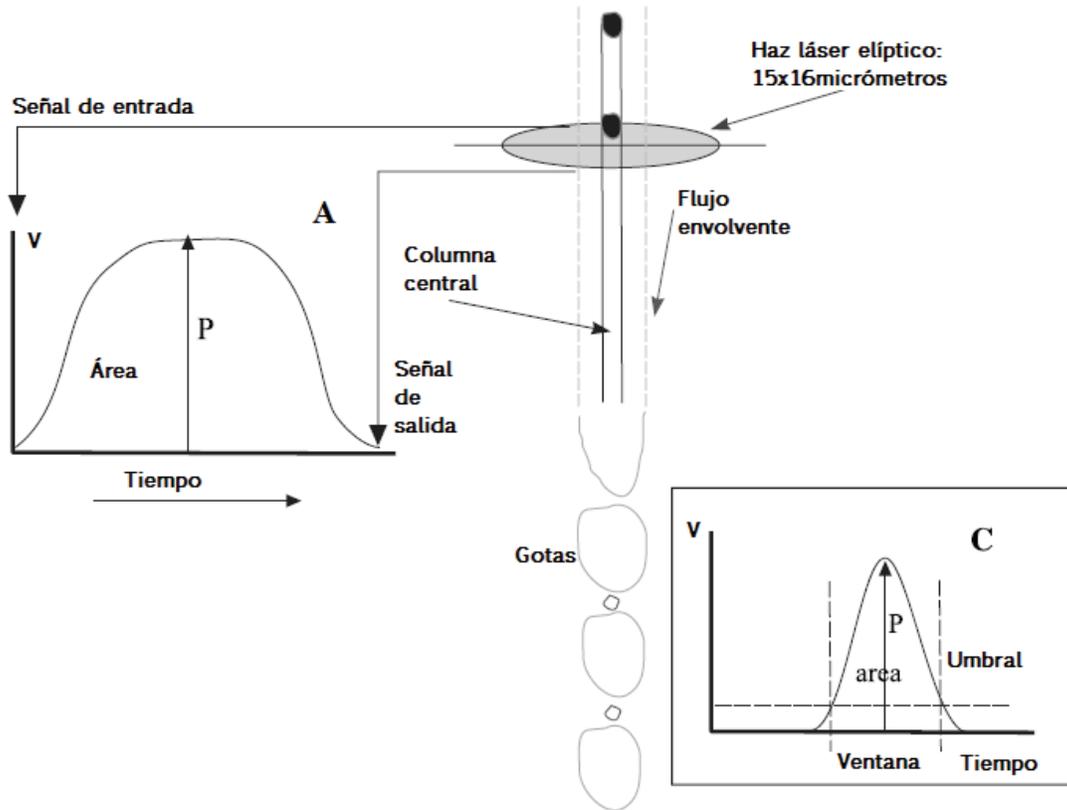


Figura 63. Esquema del punto de interrogación [115]. (A) Cuando la célula pasa a través del punto de interrogación crea un pulso cuya amplitud depende del tamaño de la célula o partícula que esté atravesando el haz. Posteriormente la señal regresa a cero. (Para el caso de fluorescencia, se toma la integral de la curva). (B) Modos en los que el haz emite, lo deseable es TEM 00, aunque es posible una mezcla de éste y TEM 01. (C) El pulso se traduce en una señal de voltaje, en la cual el usuario define una ventana temporal y un umbral.

La luz dispersada a  $90^\circ$  se utiliza para relacionar su intensidad con la granularidad o complejidad celular. El histograma resultante da el número de células contra la complejidad que poseen. En conjunto, ambos histogramas se unen para dibujar una gráfica de dispersión, en donde en la ordenada se encuentra la dispersión lateral y en la abscisa la dispersión hacia adelante. Así es más fácil identificar las diversas poblaciones celulares presentes en una muestra. El sistema permite seleccionar la población de interés, y lo demás considerarlo como umbral [116].

## Separación de las poblaciones de interés

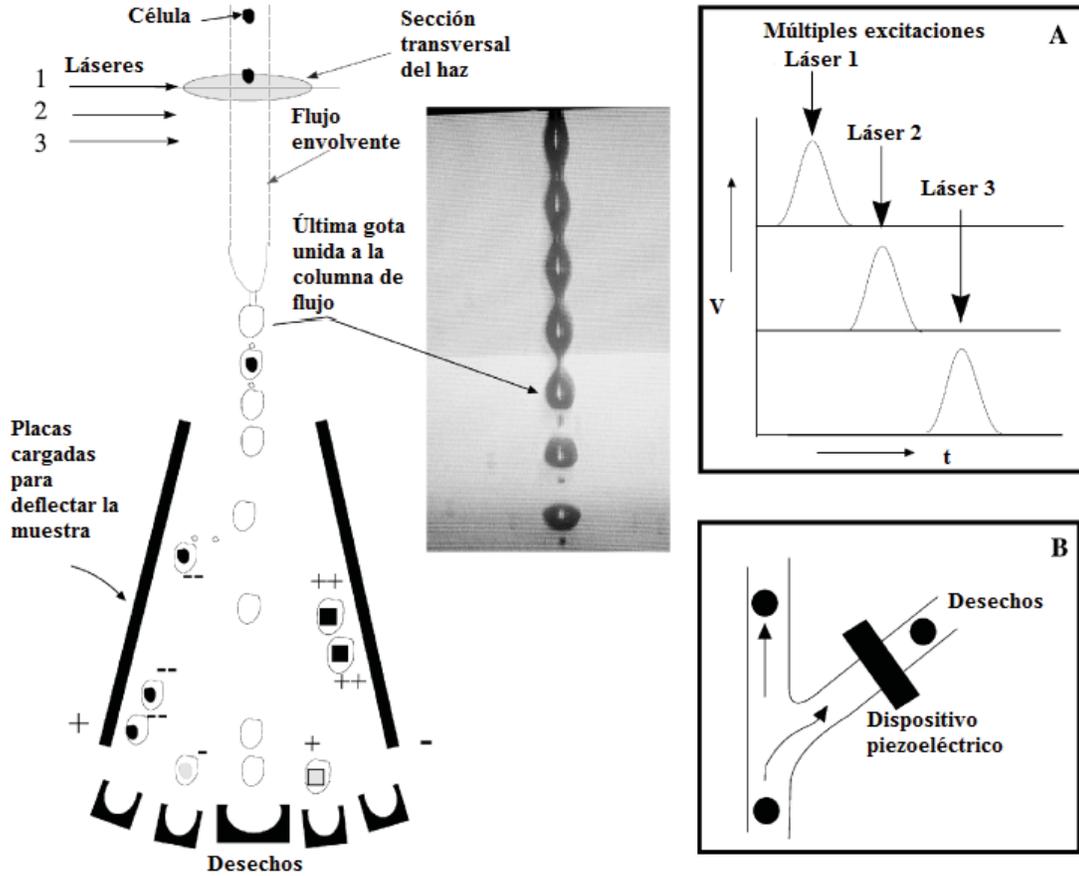


Figura 64. Separación de la muestra mediante citometría de flujo [115].

La columna de flujo (envolvente + muestra) y el láser se intersectan en el foco hidrodinámico. La columna se hace vibrar mediante un cristal piezoeléctrico que oscila a frecuencias de 10,000 a 300,000Hz, dependiendo del diámetro, velocidad y naturaleza de la columna, así como del tamaño de las células de la muestra. Cuando la columna vibra, se va separando en gotas. Una vez seleccionada la población de células o partículas deseada (mediante probabilidad Gaussiana [117]), se le asigna una carga a la última gota que está aún unida a la columna de flujo. Posteriormente se atrae a través de las placas casi paralelas mediante la aplicación de un voltaje entre ellas. Cada gota que contenga la partícula o célula deseada se sitúa dentro de un contenedor seleccionado.

Cuando se hace vibrar la columna de flujo mediante la aplicación de un campo eléctrico se forman gotas (que contienen células), de acuerdo a la siguiente ecuación [118]:

$$\text{Ec. 19} \quad v = \lambda f.$$

Donde  $v$  es la velocidad del flujo,  $\lambda$  es la distancia entre las gotas (longitud de onda de las oldulaciones causadas por la vibración) y  $f$  es la frecuencia de formación de las mismas (frecuencia de modulación). El sistema considera que la formación estable de gotas ocurre cuando la distancia entre

ellas es igual a 4.5 veces el diámetro del flujo. Las gotas son entonces iluminadas con el láser, y los detectores amplifican la señal obtenida. El sistema mide el tiempo de retardo entre una señal y otra, de aquí puede discernir qué tipo de población va a separar. La siguiente ecuación representa el movimiento de la célula, está basada en la segunda ley de Newton que describe el movimiento debido a la fuerza de gravedad; en la fuerza de flotación y en la de Stokes, que describe la interacción de la célula con el fluido; y, finalmente, en el campo eléctrico aplicado (considerando que la membrana eritrocitaria está cargada<sup>†</sup>) [119]:

Ec. 20 
$$m \frac{d\vec{r}}{dt^2} = \left(m - \frac{1}{6} \pi d^3 \rho\right) \vec{g} + \vec{E}q - 6\pi\eta_f d \frac{d\vec{r}}{dt},$$

es decir,

Ec. 21 
$$\frac{d\vec{r}}{dt^2} + C \frac{d\vec{r}}{dt} + D = 0,$$

donde,  $m$ ,  $d$  y  $q$  son la masa, diámetro y carga, respectivamente, de la célula;  $\rho$  y  $\eta_f$  son la densidad y viscosidad del fluido;  $\vec{E}$ ,  $\vec{g}$  y  $d\vec{r}/dt$  son el campo eléctrico, la aceleración debida a la gravedad y la componente espacial, respectivamente; y  $t$  es el tiempo.  $C = 6\pi\eta_f d/m$  y  $D = -(1 - \pi\rho d^3/6m)\vec{g} - q\vec{E}/m$ .

En la Figura 65 se muestra el análisis mecánico de una célula que cae bajo el efecto de la gravedad a una velocidad inicial cero, y es dirigida hacia uno de los canales mediante la aplicación de un campo eléctrico a una velocidad  $u_0$ . Si el desplazamiento en la dirección  $y$  es mayor a una distancia crítica,  $l_c$  (Figura 65), no entrará al canal lateral, sino se irá al central (correspondiente a los desechos).

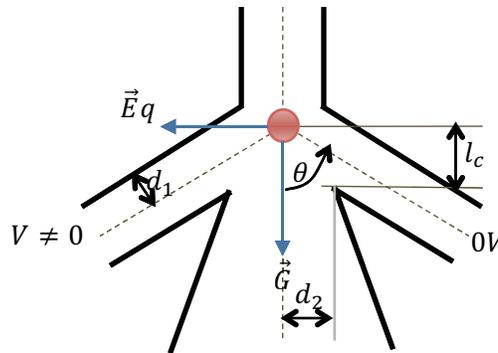


Figura 65. Distancia crítica [119].

Los canales de la izquierda y la derecha son de selección de la muestra. Luego de señalar la muestra deseada en el histograma de dispersión, se escoge a cuál canal mandarla. Aquellas gotas que no correspondan a los parámetros seleccionados se mandarían hacia el canal central, que corresponde a los desechos.

La distancia crítica se encuentra calculando la tangente del ángulo  $\theta$ , como se muestra en el siguiente esquema (Figura 66):

<sup>†</sup> El cálculo considera a las células como partículas cargadas con un cierto volumen.

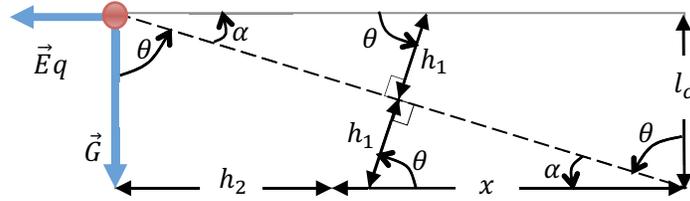


Figura 66. Esquema del análisis geométrico de la posición de la célula.

Si  $x = h_1/\cos \theta$  y  $\tan \theta = (h_2 + x)/l_c$ , por lo tanto:

$$\text{Ec. 22} \quad l_c = \frac{h_2}{\tan \theta} + \frac{h_1}{\sin \theta}$$

Donde  $h_1$  y  $h_2$  corresponden a los diámetros de los tubos laterales y de desecho, respectivamente. La solución de la Ec. 21, en términos de las constantes  $C$  y  $D$ , considerando que  $t = 0$ :  $\vec{r} = 0$  y  $d\vec{r}/dt = u_0$ , es:

$$\text{Ec. 23} \quad x(t) = -\frac{D_x + u_0 C}{c^2} e^{-ct} - \frac{D_x}{c} t + \frac{D_x + u_0 C}{c^2}$$

$$\text{Ec. 24} \quad y(t) = -\frac{D_y + u_0 C}{c^2} e^{-ct} - \frac{D_y}{c} t + \frac{D_y + u_0 C}{c^2}$$

donde  $D_x = -\frac{q}{m} E \sin \theta$  y  $D_y = -\left(1 - \frac{1}{6} \pi \rho \frac{d^3}{m}\right) g - \frac{q}{m} E \cos \theta$ . Por lo tanto, la población deseada entrará en el tubo seleccionado si la distancia que recorre en el eje  $y$  es mayor a la distancia crítica,  $l_c$ , y esto dependerá de la relación  $q/m$ .

## 3.2 MICROPIPETAS

La deformabilidad de los eritrocitos puede ser medida por diversos métodos: filtración, ectacitometría, reoscopia y aspiración por medio de micropipetas. Este último permite el análisis cuantitativo de la presión negativa aplicada y la extensión de la membrana dentro de la pipeta; de esta manera es posible medir las propiedades viscoelásticas, la organización de la membrana y la estructura intracelular. Durante cortos periodos de tiempo (5 – 10min), la membrana se comporta como un material sólido que es linealmente elástico; para largos periodos de tiempo, ocurren deformaciones permanentes indicando un carácter semisólido. Este comportamiento se refiere únicamente a la membrana, ya que el interior del eritrocito es líquido y éste no se resiste a la deformación ni posee un módulo de elasticidad [120].

### 3.2.1 Micropipetas

Las micropipetas se hicieron a partir de capilares de borosilicato de vidrio con 0.8 y 1.1mm de diámetro interno y externo, respectivamente. El sistema utilizado para crear las puntas a partir del capilar fue un *Flaming/Brown Micropipette puller, Model P-97, Sutter Instrument CO* (Figura 67). El vidrio se sostiene en los extremos con unos sujetadores y se programa el sistema para que lo estire en sentidos opuestos mientras que en el centro del mismo se aplica calor mediante una resistencia, hasta que se separa en dos pipetas (Figura 69).



Figura 67. Equipo *Flaming/Brown Micropipette puller, Model P-97, Sutter Instrument CO*, utilizado para hacer las micropipetas [121].

Los parámetros adimensionales, relativos al valor rampa que obtiene el equipo (el mínimo requerido para romper cada tipo de vidrio), que se pueden ajustar para obtener el tamaño deseado de las pipetas son:

- CALOR RELATIVO (0 – 999). Controla la corriente eléctrica que se suministra al filamento, para fundir el vidrio con el calor disipado. Éste dependerá del tipo de resistencia que se utilice, así como el tamaño y tipo de vidrio utilizado. El parámetro puede variarse a partir del valor rampa.

- FUERZA RELATIVA (0 – 255). Éste controla la fuerza con que se jala el capilar en sentidos opuestos. Entre mayor sea este parámetro, la punta de la pipeta tendrá un diámetro menor y la longitud de la punta será mucho más larga.
- VELOCIDAD RELATIVA (0 – 255). Se refiere a qué tan rápido el vidrio comenzará a estirarse. Dependerá de su viscosidad, que a su vez es función de la temperatura del mismo.
- TIEMPO (0 – 255, cada unidad representa 0.5ms). Es el tiempo de enfriamiento del aire contenido en el sistema.

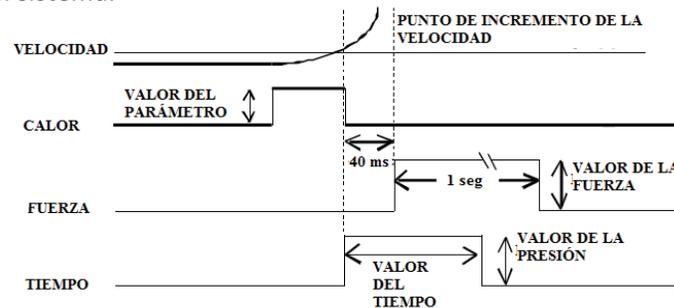


Figura 68. Esquema del ciclo de rompimiento del capilar [122].

El programa utilizado para que la punta de la pipeta tenga un diámetro interno de  $3 - 4\mu m$  fue: HEAT = 605, PULL = 65, VEL = 120, TIME = 150.

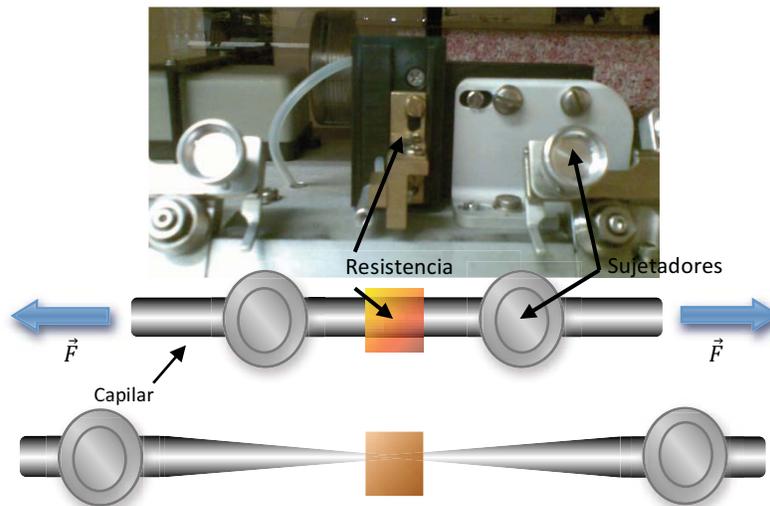


Figura 69. Foto (arriba) y esquema de la hechura de las micropipetas (abajo). La punta de ésta es cilíndrica.

Posteriormente se observa la pipeta en la microfornja, que consiste en un microscopio acoplado a unos micromanipuladores que sujetan al capilar con la finalidad de acercarlo a una resistencia por la que circula corriente; la energía disipada de ésta, controlada por el medidor de temperatura, derrite el vidrio para quitar cualquier astilladura que se haya producido mientras se rompía y pule la punta o la suaviza (Figura 70). El diámetro interno final al que se quiere llegar es alrededor de  $3\mu m$ , ya que es el mínimo requerido para no romper la membrana ni dejar pasar al eritrocito completamente [123].



Figura 70. La punta de la pipeta se mide con un micrómetro ajustado al lente del microscopio [124]. Ésta debe medir de 2 – 3 $\mu$ m de diámetro interno, aproximadamente.

Las pipetas hechas se transportan en una caja de petri y se mantienen en refrigeración debido a que la temperatura ambiente aumentó durante los experimentos, ocasionando que la punta se dilatara y los eritrocitos entraran por completo al capilar.

### 3.2.2 Sistema para micromanipulación

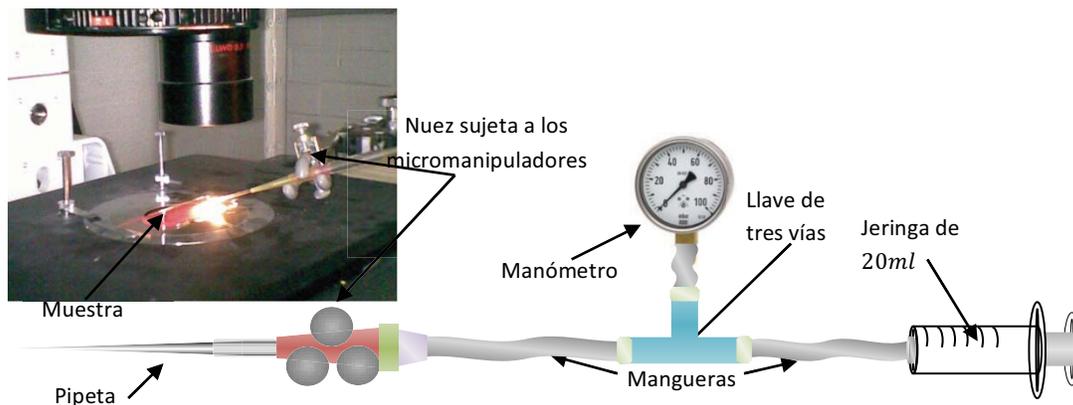


Figura 71. Esquema detallado del sistema para sujetar a la pipeta.

El sistema consiste en un microscopio invertido colocado sobre una mesa antivibratoria. A él se le acopla una cámara de video conectada a una computadora para hacer el análisis de imágenes. Junto al microscopio se colocan unos micromanipuladores para sujetar y mover la pipeta en tres dimensiones. Para este fin, la pipeta se sostiene por un catéter intravenoso periférico (punzocat), unido a una llave de tres vías para venoclisis, la cual tiene uno de sus extremos conectados a un manómetro y el otro a una manguera que, a su vez, está unida a una jeringa de 20ml para realizar la succión (Figura 71).

### 3.2.3 Succión del eritrocito

Es importante que, luego del aislamiento, los eritrocitos se encuentren en solución isotónica, ya que la resistencia a la deformación varía con la concentración de soluto del medio: es menor en solución hipertónica que en hipotónica e isotónica. Cabe mencionar que no hay diferencia entre la resistencia a la deformación de la biconcavidad del eritrocito, ya sea en solución isotónica o hipotónica, y la periferia de la misma; aunque la desventaja es que podrían ocasionarse pliegues en la membrana cuando se sujeta de forma ecuatorial [125]. En este caso, la succión se hizo entre la biconcavidad y la parte periférica, debido a restricciones del equipo.

La muestra en el portaobjetos debe ser lo suficientemente grande para evitar que la pipeta toque el fondo; además debe estar muy diluida en PBS para que los eritrocitos no se adhieran (Figura 72). La pipeta se coloca entonces sobre la membrana y se ajusta la presión a cero en el momento en que ésta no entra ni tampoco se despega de la punta.

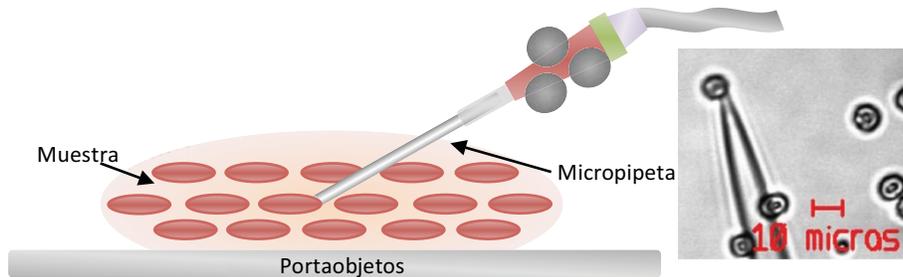


Figura 72. Esquema representativo de la colocación de la micropipeta para atrapar al eritrocito (izquierda). A la derecha se muestra una imagen tomada con la cámara de video acoplada al microscopio, usando el objetivo de 40x.

Durante la succión y deformación del eritrocito se toma video con la cámara Lumenera, que utiliza INFINITY CAPTURE Software para capturar video y fotos, e INFINITY ANALYZE Software para la medición y análisis de elementos de la imagen.

Con la jeringa se succiona el aire contenido en las vías, lo que producirá una diferencia de presiones entre el interior y el exterior de la pipeta, traduciéndose esto en la succión de la membrana del eritrocito (Figura 73).

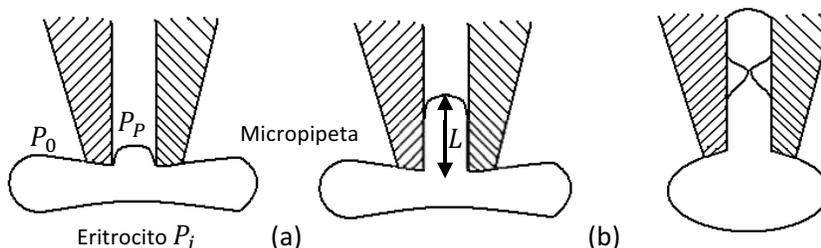


Figura 73. (a) Comienzo de la succión, (b) Longitud crítica  $L$  y (c) Rompimiento de la membrana.  $P_p$  y  $P_0$  son las presiones de la pipeta y del medio, respectivamente

La succión se realiza hasta llegar a una longitud  $L$ , justo antes de que la membrana se rompa. Durante todo el procedimiento se mide la presión,  $\Delta P$ , con un manómetro [inHg]. Con estos parámetros

más el radio de la pipeta,  $R_p$ , se grafica la curva estrés-esfuerzo (como se explicó en la teoría de las micropipetas), cuya pendiente es el inverso del módulo de elasticidad, en condiciones ideales.

### 3.2.4 Aplicación del Teorema de Bernoulli al sistema de succión.

La presión que se mide durante la succión corresponde al aire que pasa por la manguera conectada al manómetro, no al que se encuentra en el capilar. Es de ahí donde se necesita conocer la presión, y para ello se aplica el Teorema de Bernoulli. En la Figura 71 se muestra el sistema de succión de una forma simplificada, ya que la altura entre la punta de la pipeta y el manómetro eran de  $(3.5 \pm 0.5)cm$ .

Si consideramos que no hay pérdidas de gas dentro de la tubería, la masa del mismo que entra durante el tiempo  $t$  es la misma que sale en ese mismo tiempo:

$$\text{Ec. 25} \quad \Delta m_1 = \rho_1 \Delta V_1 = \rho_1 (A_1 \Delta x_1) = \rho_1 (A_1 v_1 \Delta t)$$

$$\Delta m_2 = \rho_2 \Delta V_2 = \rho_2 (A_2 \Delta x_2) = \rho_2 (A_2 v_2 \Delta t),$$

donde  $\rho_1 = \rho_2 = \rho = 1.2 \text{ kg/m}^3$ , es la densidad del aire;  $\Delta m$  es la cantidad de aire que entra y que sale durante la succión;  $\Delta V$  es el volumen correspondiente;  $\Delta x$  es la longitud que recorre del área  $A_1$  a  $A_2$ , durante el tiempo  $\Delta t$  a una velocidad  $v_1$  y  $v_2$ , respectivamente. De la igualdad de la Ec. 25 se tiene:

$$\text{Ec. 26} \quad A_1 v_1 = A_2 v_2.$$

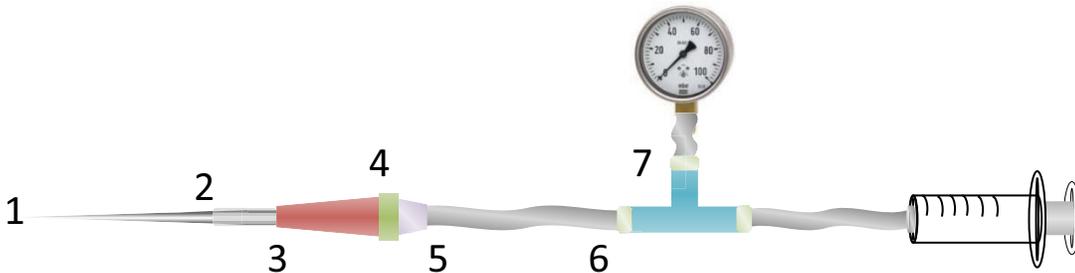


Figura 74. Sistema de succión. Los puntos 1-7 corresponden a diferentes secciones transversales por donde pasa el aire succionado.

El análisis se realizó en cada uno de los 7 puntos donde hubo un cambio de área transversal. De acuerdo a la conservación de la energía, la ecuación de Bernoulli es, en los puntos 1-2:

$$\text{Ec. 27} \quad P_1 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 + \rho g y_1 = P_2 + \frac{1}{2}\rho v_2^2 + \rho g y_2.$$

De acuerdo a la Ec. 26 considerando que  $y_1 \neq y_2$ :

$$\text{Ec. 28} \quad P_1 = P_2 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 \left[ \left( \frac{A_1}{A_2} \right)^2 - 1 \right] + \rho g (y_2 - y_1).$$

En los puntos 2-3, donde  $A_2 v_2 = A_3 v_3 = A_1 v_1$ ; con  $y_1 \neq y_2 \neq y_3$  y la Ec. 28:

Ec. 29 
$$P_1 = P_3 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 \left[ \left( \frac{A_1}{A_3} \right)^2 - 1 \right] + \rho g (y_3 - y_1).$$

Continuando con el mismo procedimiento para los demás tubos, el teorema de Bernoulli entre el punto 1 y el 7 es:

Ec. 30 
$$P_1 = P_7 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 \left[ \left( \frac{A_1}{A_7} \right)^2 - 1 \right] + \rho g (y_7 - y_1).$$

Para encontrar la velocidad en el punto 1, de la Ec. 26 y la conservación de la energía para un elemento de fluido de masa m:

Ec. 31 
$$K_7 + U_7 = K_1 + U_1.$$

$$\frac{1}{2}mv_7^2 + mgh = \frac{1}{2}mv_1^2 + 0$$

$$v_1^2 = v_7^2 + 2gh = \left( \frac{A_1}{A_7} \right)^2 v_1^2 + 2gh$$

Ec. 32 
$$v_1 = \sqrt{\frac{2ghA_7^2}{A_7^2 - A_1^2}}.$$

De aquí, conociendo  $A_1$ ,  $A_7$ ,  $h = y_7 - y_1$ ,  $g$ ,  $\rho$ ,  $y_1$  y  $y_7$ , se puede la encontrar la presión ejercida en la punta de la pipeta usando Ec. 32 y Ec. 30.

Ec. 33 
$$P_1 = P_7 + \frac{1}{2}\rho \left( \frac{2ghA_7^2}{A_7^2 - A_1^2} \right) \left[ \left( \frac{A_1}{A_7} \right)^2 - 1 \right] + \rho gh.$$

# CAPÍTULO 4

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 CITÓMETRO DE FLUJO

Se analizaron 14 casos por citometría de flujo, de los cuales 5 son control; 1 corresponde a una persona con episodios frecuentes de hiperglucemia, sin embargo no se le ha dictaminado la diabetes por no ser constantes; 8 son pacientes con DMT2, 4 de ellos insulino dependientes, 2 tratados con glibencamida (estimula la secreción de insulina) y 2 corresponden a diabéticos no tratados con ningún medicamento, todos con microangiopatías severas (RD, NF, ND y NeD).

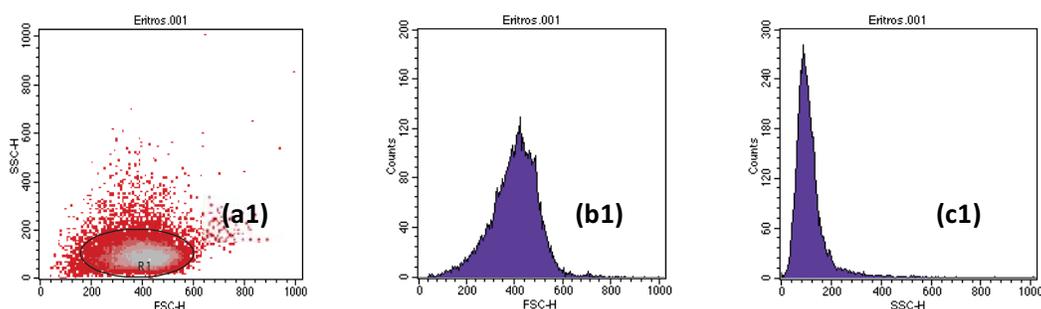
De cada muestra se seleccionaron 20 mil eritrocitos para su análisis citométrico y así obtener histogramas cualitativos de tamaño y complejidad. Con estos datos se reconstruye la información en forma de una gráfica de dispersión que muestra la distribución de las poblaciones eritrocitarias en cada sujeto [126].

#### 4.1.1 Casos Control

Tabla 1. Porcentajes de diferentes clases morfológicas que presenta el eritrocito en sujetos control y pacientes diabéticos, con y sin daño vascular [132]

Sujetos	Estomatocitos	Discocitos	Knizocitos y Equinocitos
Control [%]	55.5 ± 12.3	43.8 ± 12.6	0.7 ± 0.9
Diabéticos [%]	40.0 ± 20.8	57.3 ± 22.5	3.1 ± 3.3
DCV* [%]	44.8 ± 23.9	54.1 ± 26.8	1.8 ± 2.9
DCeV [%]	46.8 ± 8.3	48.1 ± 9.1	5.1 ± 4.0
OVP [%]	25.5 ± 18.7	71.9 ± 19.1	2.5 ± 3.0

\* DCV: Daño cardiovascular; DCeV: Daño cerebrovascular; OVP: Obstrucción vascular periférica.



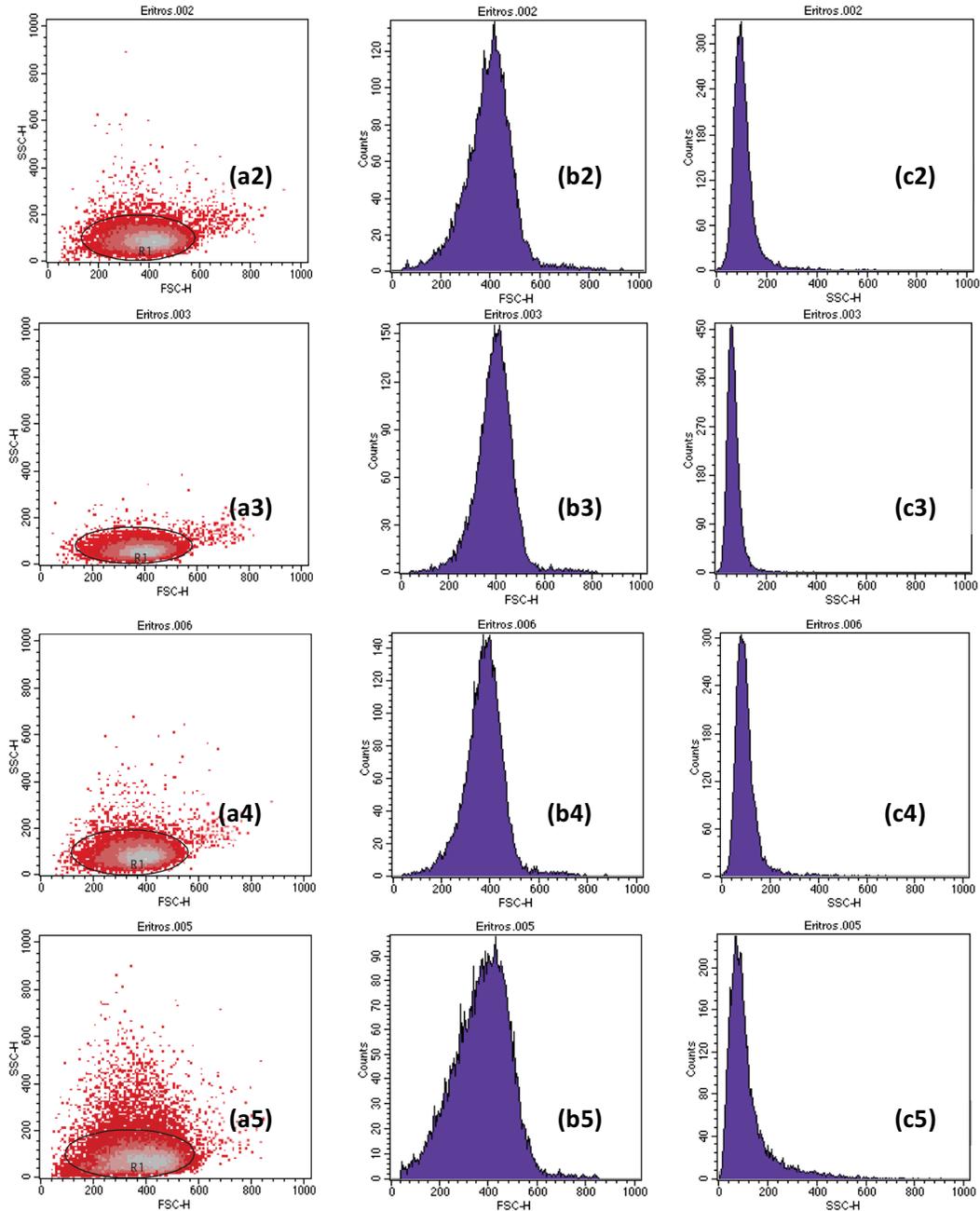


Figura 75. **(a1-5)** Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). **(b1-5)** Histograma de dispersión lateral (tamaño). **(c1-5)** Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad).

Según la literatura, los sujetos control tienen una población mayoritaria de eritrocitos, que son muy deformables y parte de la transición al estado bicóncavo del eritrocito; le siguen en porcentaje los discocitos, menos deformables pero más estables; el resto pertenece a knizocitos, equinocitos y otras formas eritrocitarias (Tabla 1) [132]. Los cinco casos control muestran una población significativa (Figura 75), tanto en tamaño como en complejidad, de acuerdo a los histogramas de dispersión hacia adelante y lateral, respectivamente.

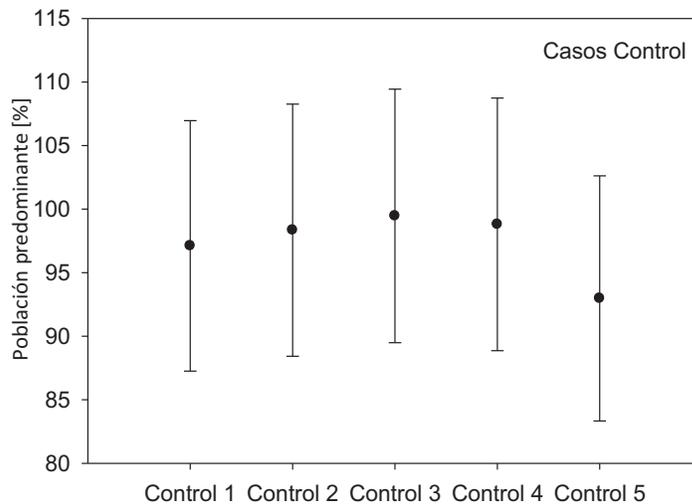


Figura 76. Gráfica de los porcentajes correspondientes a la población más grande de cada caso control. El resto pertenece a otras formas eritrocitarias.

En la Figura 76 se muestra, en promedio, el porcentaje correspondiente a la población predominante de cada uno de los sujetos control, es decir, la población con más eritrocitos de las mismas características, tanto de tamaño como en complejidad ( $97 \pm 10\%$ ). Con estos resultados no es posible discernir entre las formas de los diferentes eritrocitos inmersos en la muestra, ya que se requiere de un sorting (procedimiento mediante el cual se separan células de distintas formas y tamaños), pero cualitativamente demuestra que existe, al menos, una población predominante (dentro de la cual pueden estar los estomatocitos y discocitos), y otras más pequeñas que podrían relacionarse con las formas menos comunes, pero presentes en un sujeto normal, de los eritrocitos.

La glucosa y la Hb glucosilada fueron medidas en cada uno de los casos (Tabla 2). Como se había mencionado anteriormente, los niveles normales de glucosa van  $70 - 105\text{mg/dL}$  y la hemoglobina glucosilada de  $5 - 7$ . El promedio fue de  $82 \pm 8\text{ mg/dl}$  y  $5.2 \pm 0.2$ , respectivamente.

Tabla 2. Glucosa y Hemoglobina glucosilada de los sujetos control

Sujeto	Glucosa [ <i>mg/dl</i> ]	Hb Glucosilada
1	85	5.5
2	70	5.0
3	80	5.3
4	84	5.0
5	92	5.1
<b>Promedio</b>	<b>82±8</b>	<b>5.2±0.2</b>

#### 4.1.2 Casos de pacientes con DMT2 sin tratamiento médico

De la misma manera se procedió con las muestras de pacientes diabéticos. En la literatura se encuentra que en pacientes diabéticos hay una disminución de los estomatocitos, un aumento de los discocitos knizocitos y equinocitos, incrementándose esta diferencia en pacientes con DM que ya tienen complicaciones vasculares (Tabla 1).

Los resultados siguientes corresponden al análisis citométrico de los eritrocitos de pacientes con DMT2 sin tratamiento, con DCV. Se utilizó la misma cantidad de muestra (20,000 glóbulos rojos), y se separaron las regiones definidas, como en el caso control.

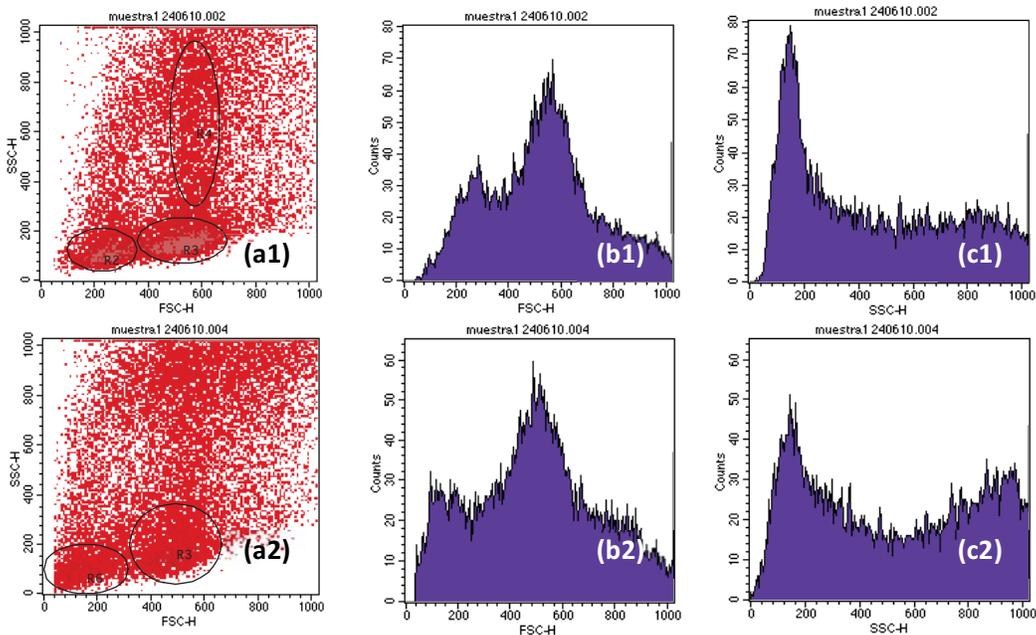


Figura 77. **(a1-2)** Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). **(b1-2)** Histograma de dispersión lateral (tamaño). **(c1-2)** Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad).

Tabla 3. Glucosa y Hemoglobina glucosilada de los pacientes con DMT2 sin tratamiento médico

Paciente	Glucosa [mg/dl]	Hb Glucosilada
1	160	7.3
2	210	7.6
<b>Promedio</b>	<b>185±35</b>	<b>7.5±0.2</b>

Es notorio el cambio entre los sujetos control y los pacientes con DMT2 sin tratamiento médico, en cuanto a la distribución de las diferentes poblaciones de la muestra. En los histogramas de tamaño (Figura 77b), se muestra la presencia de más de una sola población predominante, incluso podría decirse que existen mínimo tres poblaciones significativas; en cuanto a la complejidad (Figura 77c), también se puede interpretar que los eritrocitos de pacientes diabéticos sin tratamiento médico, adquieren diversas formas y que incluso hay dos predominantes. En ambos histogramas ninguna de las poblaciones está completamente definida, pero cualitativamente se puede observar una gran diferencia comparados con los casos control.

En la gráfica de dispersión (Figura 77a) se observa la distribución de las diversas poblaciones; en los círculos pueden apreciarse con más claridad dos de ellas, el resto de la muestra se encuentra muy disperso, lo que indica una variación importante de la forma y tamaño de los eritrocitos, que concuerda con los histogramas de tamaño y complejidad.

Los niveles de glucosa de un paciente diabético, independientemente de sus complicaciones vasculares y el tiempo con el padecimiento, se encuentran arriba de los  $130\text{ mg/dl}$ , al menos, ocasionando que la Hb glucosilada se encuentre sobre el nivel máximo, 7. En los casos con DMT2 descontrolada, la concentración de glucosa en la sangre fue de  $185 \pm 35\text{ mg/dl}$  y la Hb glucosilada de  $7.5 \pm 0.2$  (Tabla 3)

#### 4.1.3 Caso tratado con glibencamida

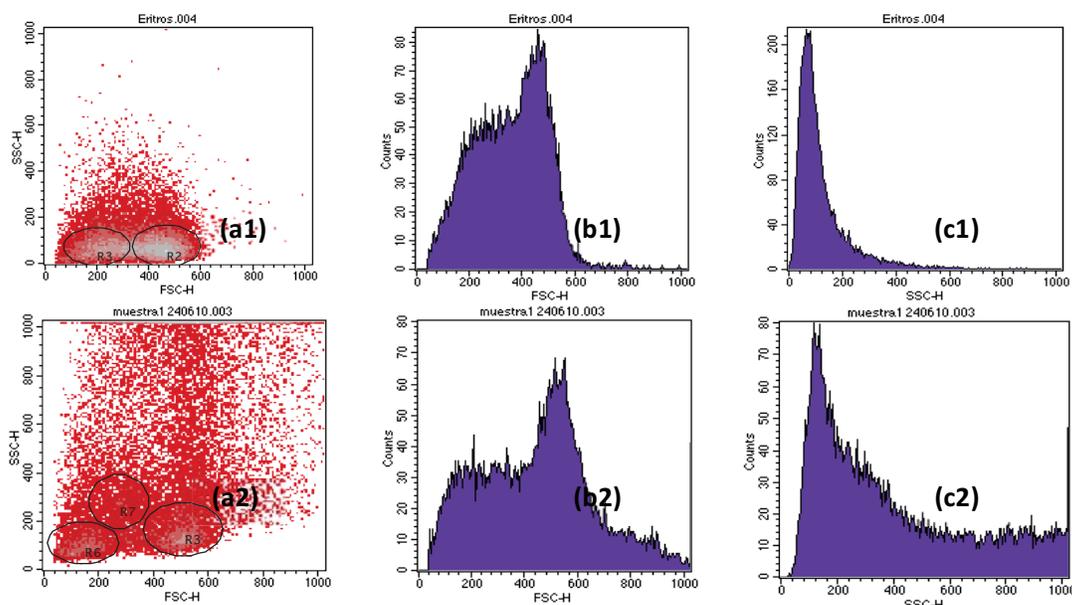


Figura 78. (a1-2) Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). (b1-2) Histograma de dispersión lateral (tamaño). (c1-2) Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad).

Tabla 4. Glucosa y Hemoglobina glucosilada de los pacientes con DMT2 tratada con glibencamida.

Paciente	Glucosa [ $\text{mg/dl}$ ]	Hb Glucosilada
1	120	7.7
2	150	8.1
<b>Promedio</b>	<b><math>135 \pm 21</math></b>	<b><math>7.9 \pm 0.3</math></b>

La muestra fue tomada de dos pacientes con DMT2 y DCV, tratados con glibencamida, un medicamento que estimula la producción de insulina. En ambos pueden distinguirse dos poblaciones predominantes en los histogramas de tamaño; en cuanto a la complejidad, una población es mayoritaria y se puede interpretar que el resto de la muestra no tiene forma única. Esto es claro también en la gráfica de dispersión (Figura 78b), donde pueden apreciarse al menos tres poblaciones significativas entre tamaño y complejidad, y el resto de la muestra muy inhomogénea.

La glucosa se encuentra en  $135 \pm 21\text{ mg/dl}$  y la Hb glucosilada en  $7.9 \pm 0.3\text{ mg/dl}$ .

#### 4.1.4 Caso de pacientes insulinodependientes

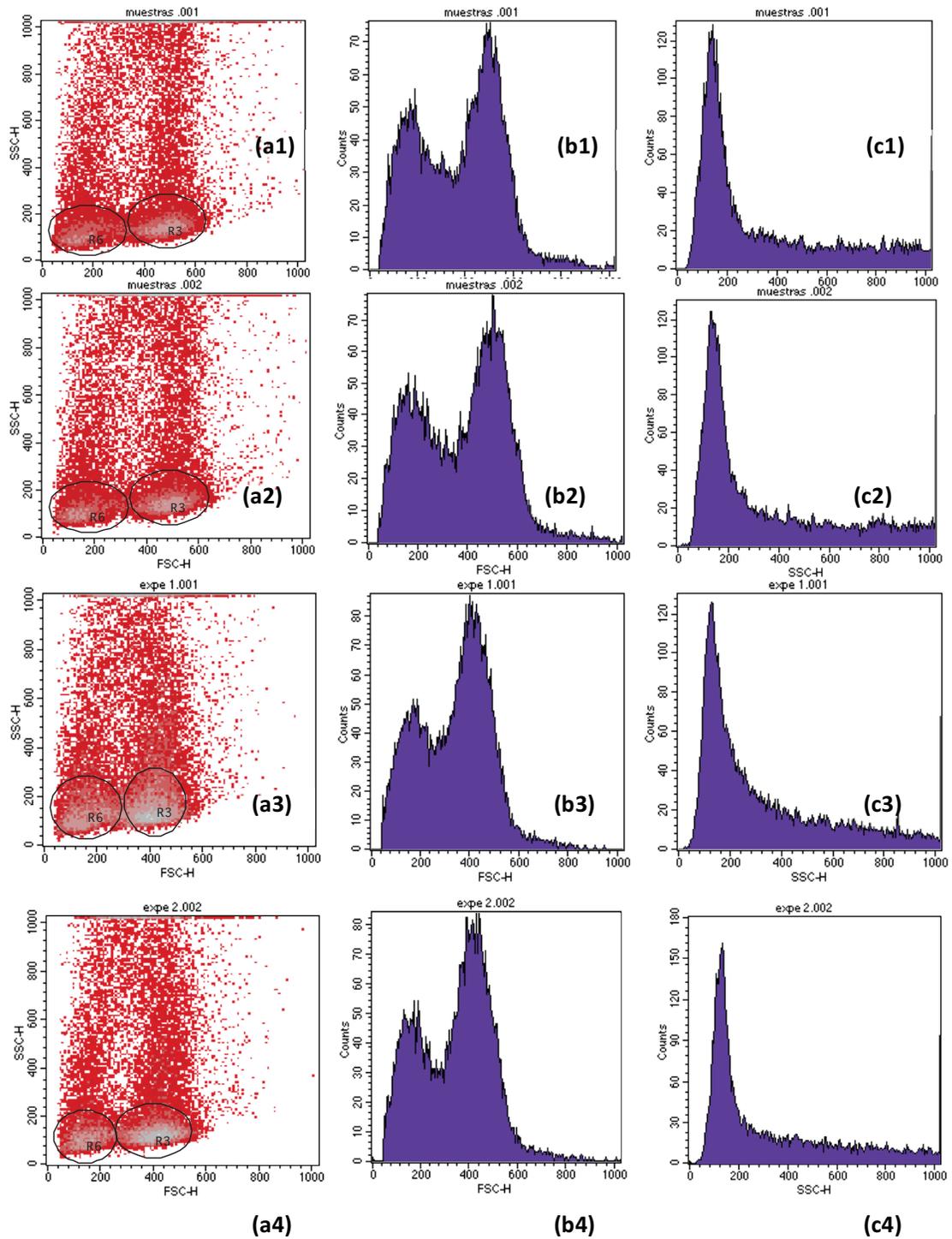


Figura 79. (a1-4) Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). (b1-4) Histograma de dispersión lateral (tamaño). (c1-4) Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad).

Tabla 5. Glucosa y Hemoglobina glucosilada de los pacientes insulinodependientes.

Paciente	Glucosa [mg/dl]	Hb Glucosilada
1	114	7.7
2	110	8.1
3	95	7.3
4	80	7.5
<b>Promedio</b>	<b>112±3</b>	<b>7.7±0.3</b>

Las muestras fueron tomadas de dos pacientes con DMT2 con DV, que previamente se trataron con glibencamida y, como los niveles de glucosa ya no descendieron debido al tiempo con el padecimiento y los bajos niveles de salud, se les cambió a insulina intramuscular.

En los 4 casos se muestran dos poblaciones predominantes en cuanto a tamaño, que corresponde también con los resultados de la Tabla 1. La complejidad es similar a la encontrada en los casos control, sólo que en ésta se observa la presencia de más formas eritrocitarias (Figura 79).

En la Tabla 5 se puede observar que la Hb glucosilada está arriba de 7, y que en dos casos particulares, donde la glucosa esta dentro de los niveles normales, la glucosilación permanece arriba del máximo.

#### 4.1.5 Caso con hiperglucemia

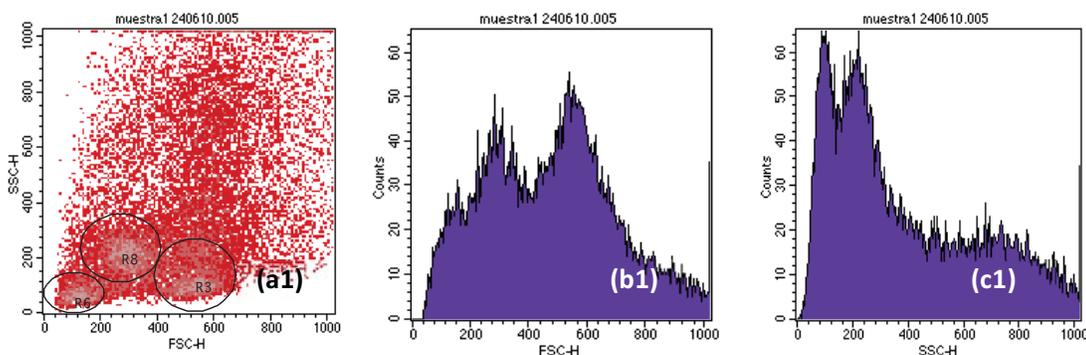


Figura 80. (a1) Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). (b1) Histograma de dispersión lateral (tamaño). (c1) Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad).

Tabla 6. Glucosa y Hemoglobina glucosilada del caso con hiperglucemia.

Paciente	Glucosa [mg/dl]	Hb Glucosilada
1	130	5.6
<b>Promedio</b>	<b>130±11</b>	<b>5.6±2.4</b>

Este caso es particularmente interesante, ya que aún no tiene un diagnóstico médico de DM como tal porque la glucosa no se encuentra alta de forma constante; sólo tiene episodios frecuentes de hiperglucemia, lo que ya le ha originado daños vasculares importantes. En las gráficas se pueden

distinguir, al menos, tres poblaciones de eritrocitos en cuanto a tamaño y complejidad; en la gráfica de dispersión se observa el resto muy disperso, lo que también indica la presencia de otras formas eritrocitarias.

## 4.2 ASPIRACIÓN CON MICROPIPETAS

### 4.2.1 Caso Control

Los videos fueron tomados con la cámara digital *CCD Lumenera Infinity* (resolución de 1600x1200 y 2 megapíxeles), con una duración de  $14.14 \pm 0.01s$ , cada uno. Se utilizó el software Sony Vegas Pro 9.0<sup>®</sup> para obtener los fotogramas de cada video, seleccionándolos en el momento en que era visible el aumento de longitud de la membrana dentro del capilar. Cada uno de ellos era de 720x480 px. Para el análisis de las imágenes, se utilizó el software Infinity Analyze, que viene en el paquete de la cámara, e ImageJ 1.43.

El diámetro obtenido de la pipeta en la microforja fue de  $3.1 \pm 0.4\mu m$  (utilizada únicamente para el caso control). Luego de asegurar que el eritrocito seleccionado tuviera forma de discocito, se midió su diámetro antes de que la membrana entre a la pipeta, suponiendo que es un círculo, como se muestra en la siguiente figura.

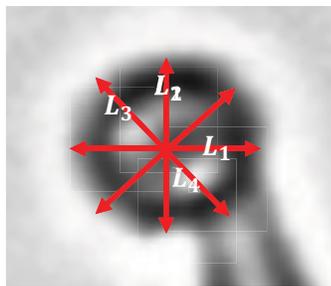


Tabla 7. Diámetros obtenidos del eritrocito succionado [ $\mu m$ ]

$L_1$	7.99	0.01
$L_2$	7.57	0.01
$L_3$	7.93	0.01
$L_4$	8.35	0.01
Diámetro	7.96	0.32

Figura 81. Medición del diámetro del eritrocito.

El diámetro promedio fue de  $7.96 \pm 0.32\mu m$ . Conforme se aumentó la succión, se seleccionaron los fotogramas más claros y se procedió a su análisis con ImageJ. En cada uno de ellos se tomó el perfil, mediante el trazo de una línea, tanto del radio de la pipeta como de la longitud de la membrana dentro de la misma, para realizar el cociente  $L/R_p$  y así calcular la curva estrés-esfuerzo.

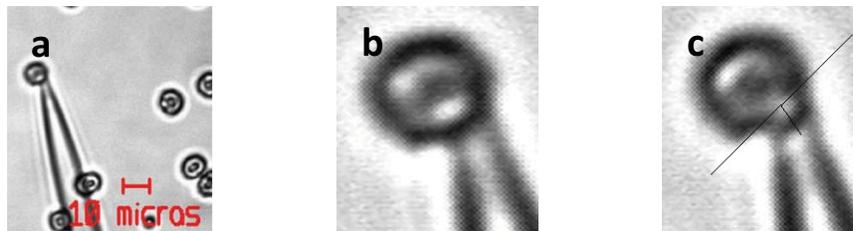


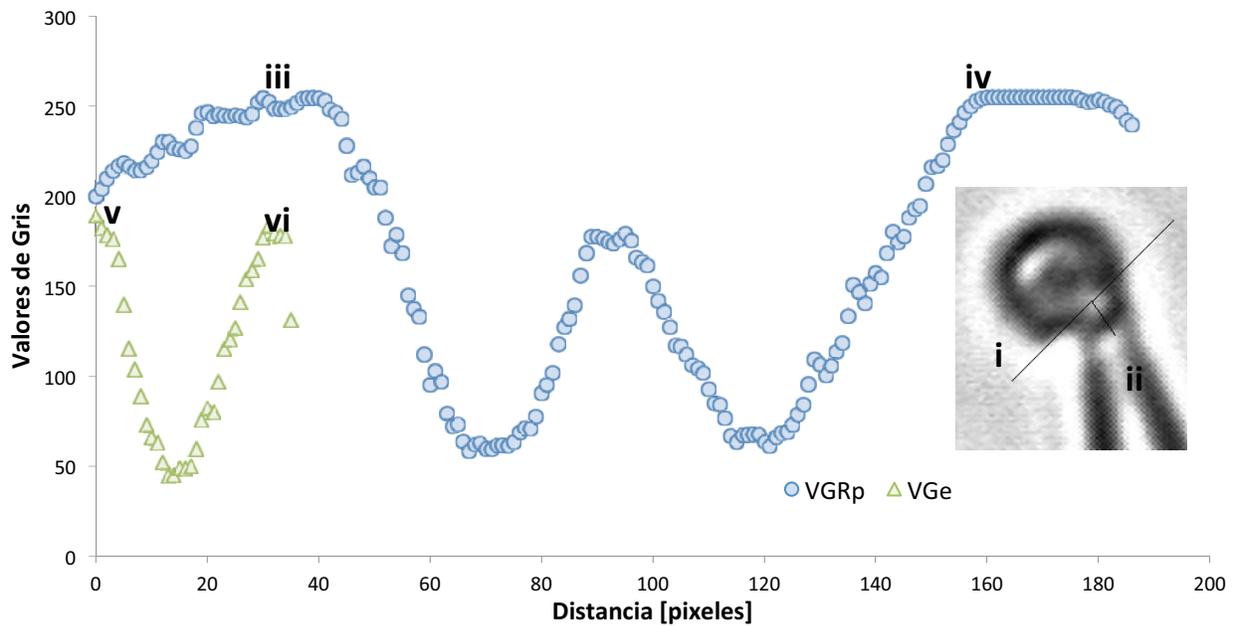
Figura 82. (a) Imagen analizada con INFINITY ANALYZE de Lumenera, (b) Imagen analizada con ImageJ, (c) En esta figura se trazaron dos líneas de las que se obtiene el perfil de valores de gris contra distancia en píxeles, para realizar el cociente respectivo.

Las siguientes figuras muestran los fotogramas escogidos, donde se trazaron dos líneas para obtener perfiles de valores de gris contra distancia en píxeles, como se aprecia en las gráficas correspondientes.

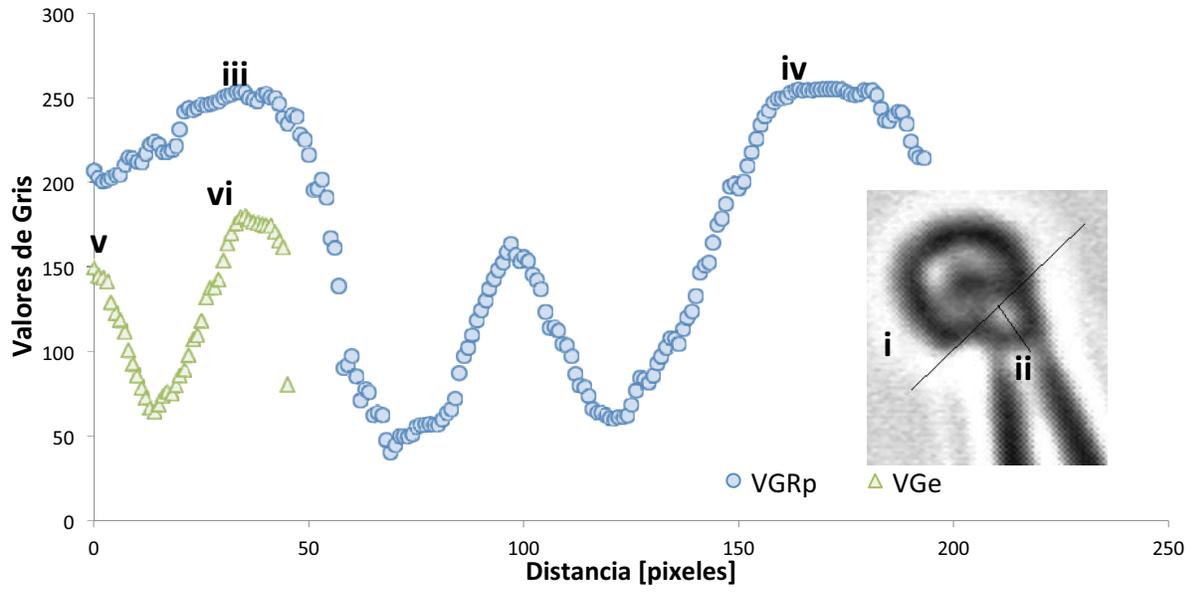
Las crestas indican valores de gris altos que corresponden a colores claros; y los valles son los valores más oscuros. Para obtener el diámetro de la pipeta se escogió invariablemente el punto más alto de ambas crestas antes de la caída de valores de gris y se obtuvo la diferencia. En cuanto a la sección aspirada de la membrana, el punto inicial se traza a partir de la línea que define el perfil de la pipeta y más allá del límite visible de la membrana, como se muestra en el punto ii. La distancia correspondiente a la longitud de la membrana dentro de la pipeta es el punto vi.

De la misma forma se analizan todas los fotogramas obtenidos durante el resto de la deformación y se calculan los cocientes respectivos, como se muestra a continuación (VGRp es el perfil correspondiente a la pipeta; y Vge, al eritrocito):

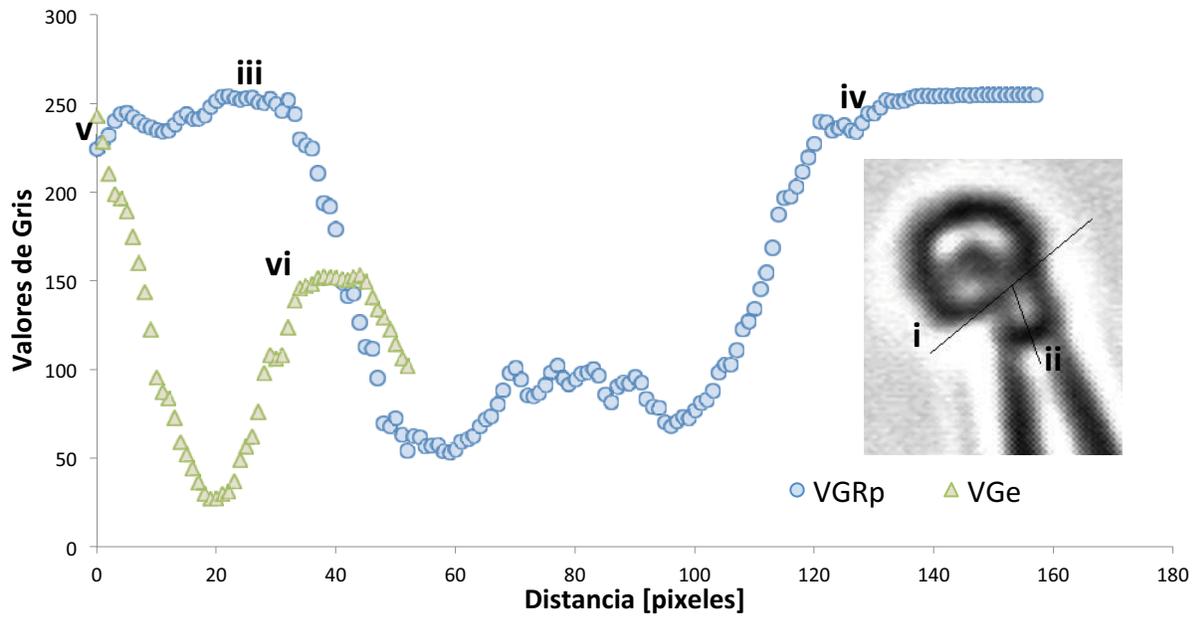
Gráfica 1. Fotograma 140



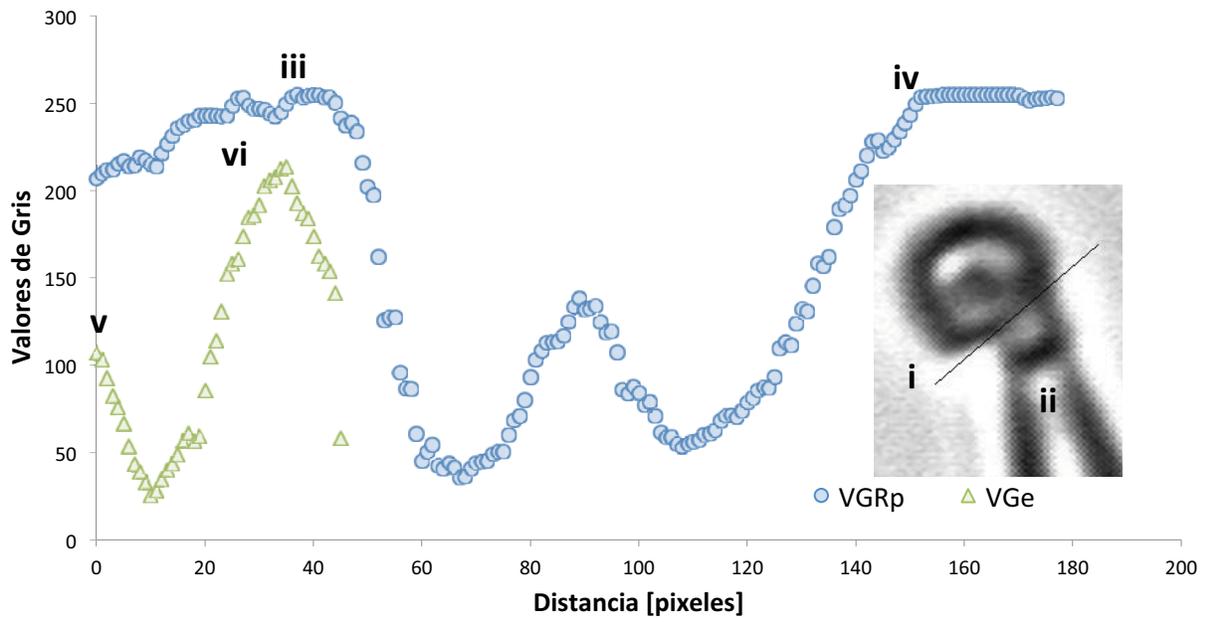
Gráfica 2. Fotograma 181



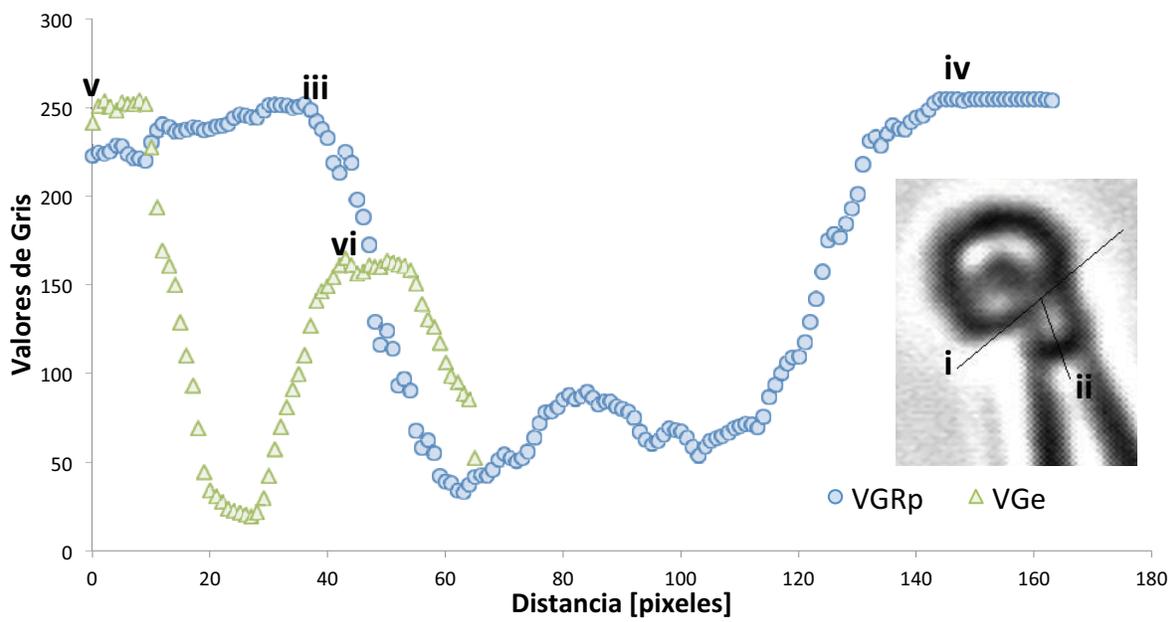
Gráfica 3. Fotograma 232



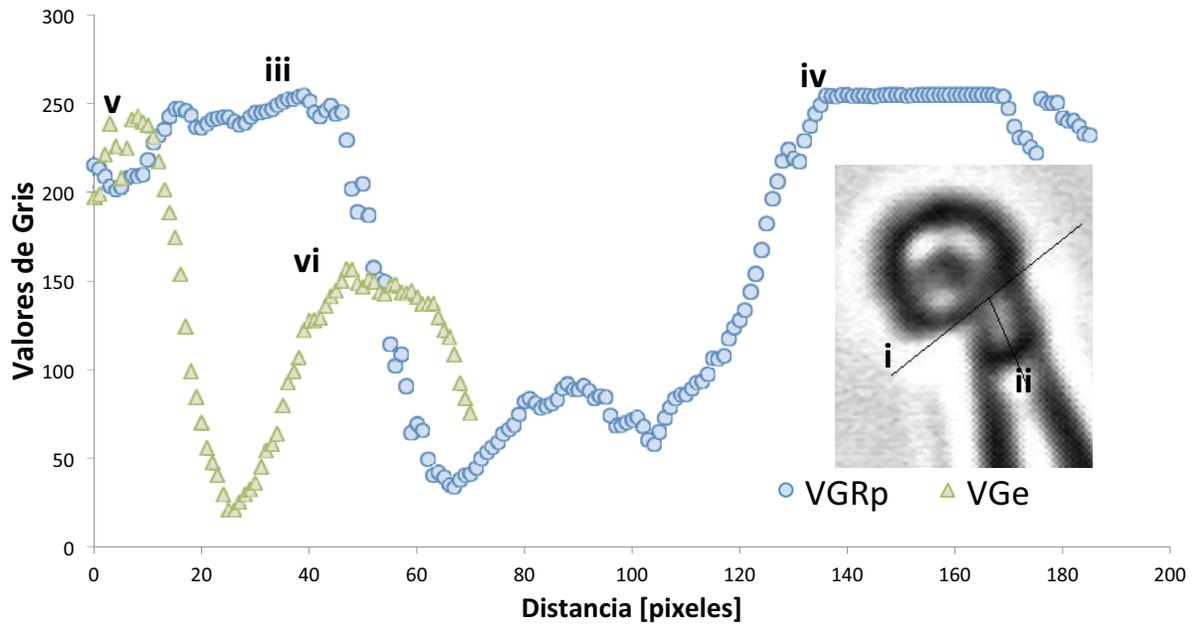
Gráfica 4. Fotograma 278



Gráfica 5. Fotograma 319



Gráfica 6. Fotograma 410



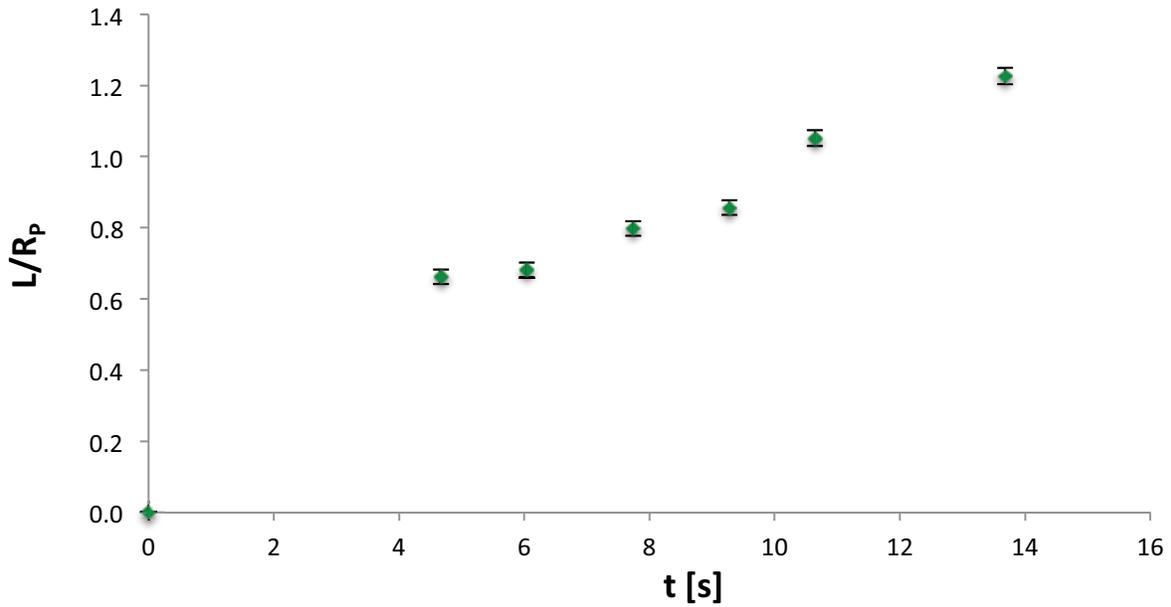
En la siguiente tabla se muestra el cociente obtenido de las gráficas anteriores,  $L/R_p$ , el fotograma respectivo y la presión medida al tiempo t.

Tabla 8. Deformación de un eritrocito control

Fotograma	$t \pm \Delta t$ [s]	$\Delta P \pm \delta(\Delta P)$ [inHg]	$L/R_p \pm \Delta(L/R_p)$
0	0.000 0.001	0.0 0.3	0.0 0.00
140	4.671 0.001	2.0 0.3	0.7 0.02
181	6.039 0.001	2.5 0.3	0.7 0.02
232	7.741 0.001	3.5 0.3	0.8 0.02
278	9.276 0.001	4.0 0.3	0.9 0.02
319	10.644 0.001	4.5 0.3	1.1 0.02
410	13.680 0.001	5.5 0.3	1.2 0.02

La siguiente curva muestra el esfuerzo resultante respecto al tiempo en que se succionó la membrana.

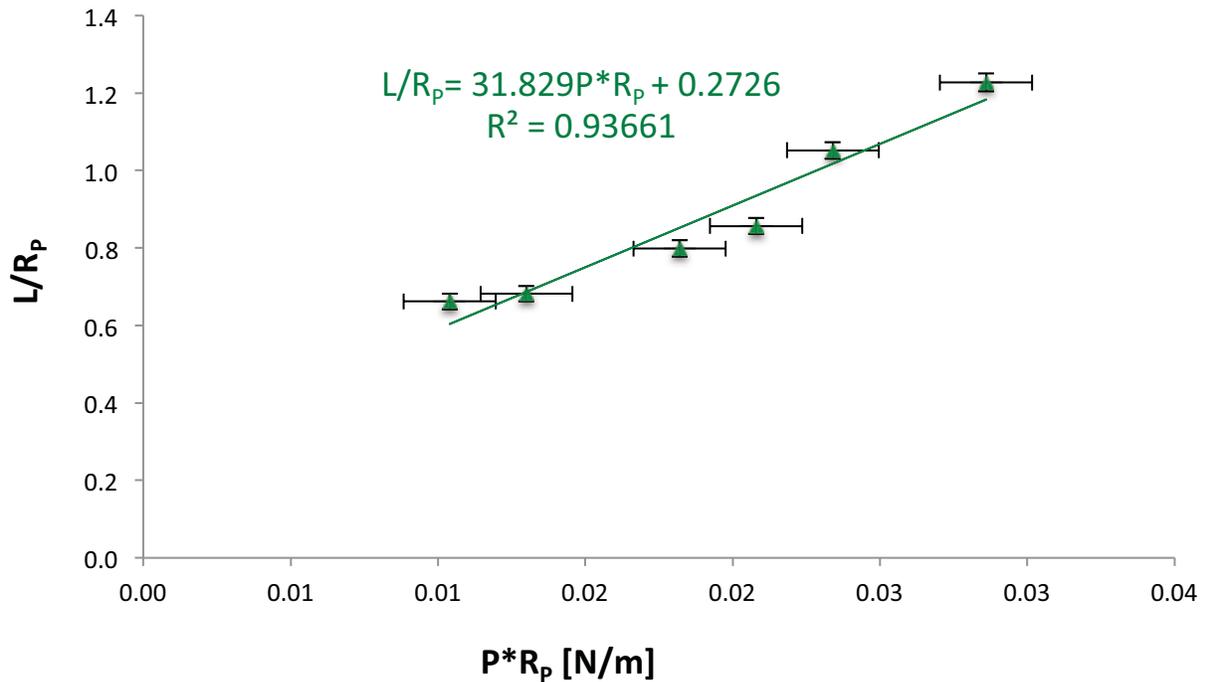
Gráfica 7. Desarrollo en el tiempo de la deformación del eritrocito control.



En la siguiente gráfica se representa la curva estrés-esfuerzo, cuya pendiente se relaciona con la elasticidad del sistema membrana-citoesqueleto. De acuerdo a la Ec. 16:

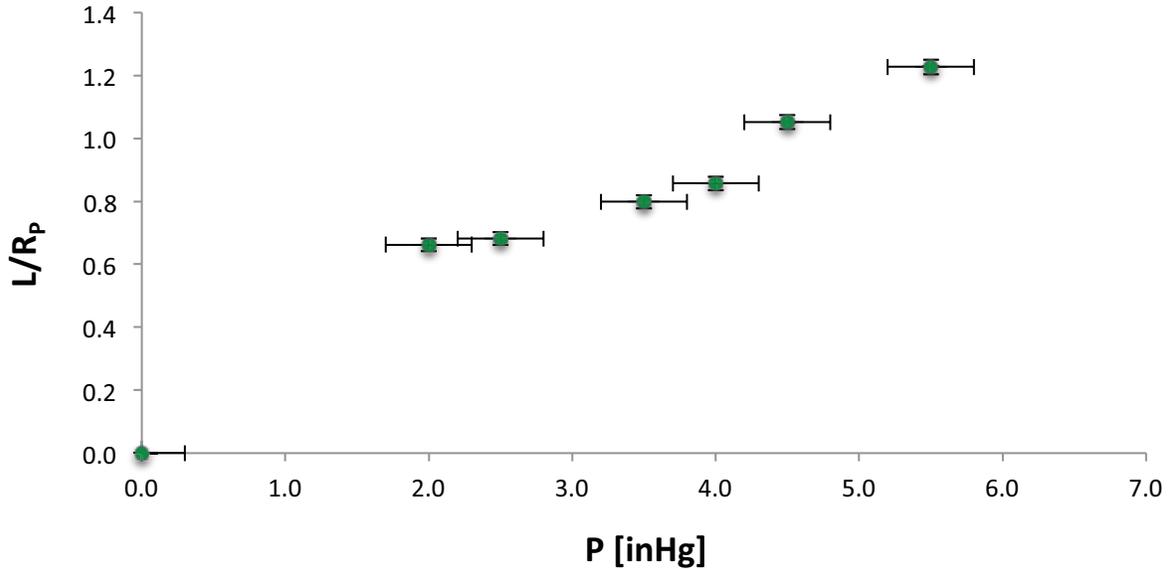
Ec. 34 
$$\frac{L}{R_p} = \frac{\Delta P R_p}{a\mu} - \frac{b}{a}$$

Gráfica 8. Curva estrés-esfuerzo del eritrocito control.



La siguiente curva muestra las presiones medidas en el manómetro en inHg durante la succión, considerando el desarrollo de Bernoulli explicado en la teoría.

Gráfica 9. Deformación contra presión medida en el manómetro para el eritrocito control.



#### 4.2.2 Caso con Diabetes Mellitus

Se analizaron dos casos de eritrocitos (en forma de discocitos) de pacientes con DMT2, con daño vascular, insulín dependientes. De la misma manera que en el control, los videos fueron tomados con la cámara CCD durante  $14.14 \pm 0.01s$ , cada uno. El análisis de imagen se hizo con ImageJ 1.43.

El diámetro de la micropipeta que se obtuvo en la microforja fue de  $3.6 \pm 0.3\mu m$ . Antes de la succión también se realizó la medición del diámetro del eritrocito como en la Figura 81. Para este caso, el diámetro promedio de los casos analizados con DM fue de  $8.36 \pm 0.16\mu m$ .

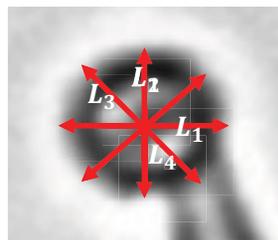


Figura 83. Medición del diámetro del eritrocito.

Tabla 9. Diámetro promedio obtenido del eritrocito succionado en los casos con DM [ $\mu m$ ]

$D_1$	8.47	0.01
$D_3$	8.25	0.01
Diámetro promedio	8.36	0.16

Los fotogramas fueron igualmente analizados con ImageJ, tomando los perfiles del diámetro de la pipeta y la membrana dentro de la misma para realizar el cociente L/Rp.

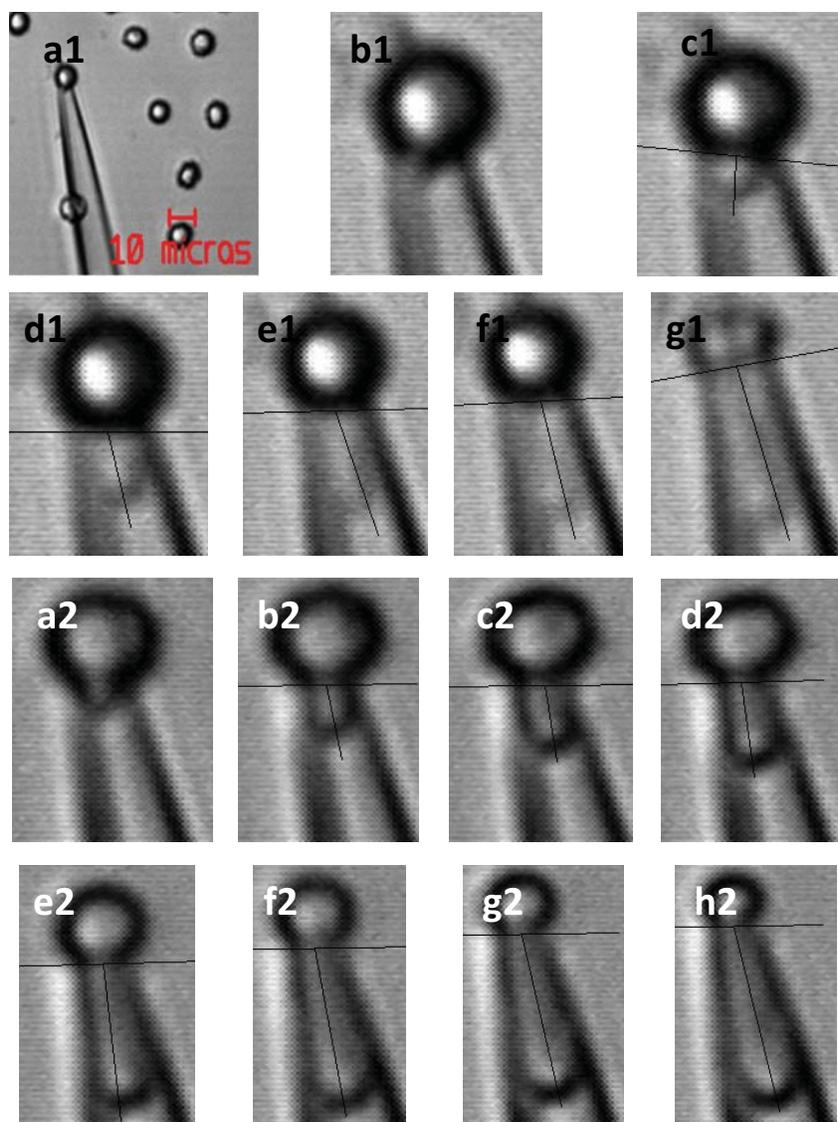


Figura 84. **(a)** Imagen analizada con INFINITY ANALYZE de Lumenera, **(b)** Imagen analizada con ImageJ, **(c)** En esta figura se trazaron dos líneas de las que se obtiene el perfil. El número corresponde al eritrocito 1 y 2, respectivamente. En ambos casos se seleccionaron los fotogramas más definidos.

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos durante la succión: presión en inHg y el cociente de la deformación respecto al radio de la pipeta durante el tiempo  $t$ .

Tabla 10. Deformación del eritrocito 1 de paciente con DMT2

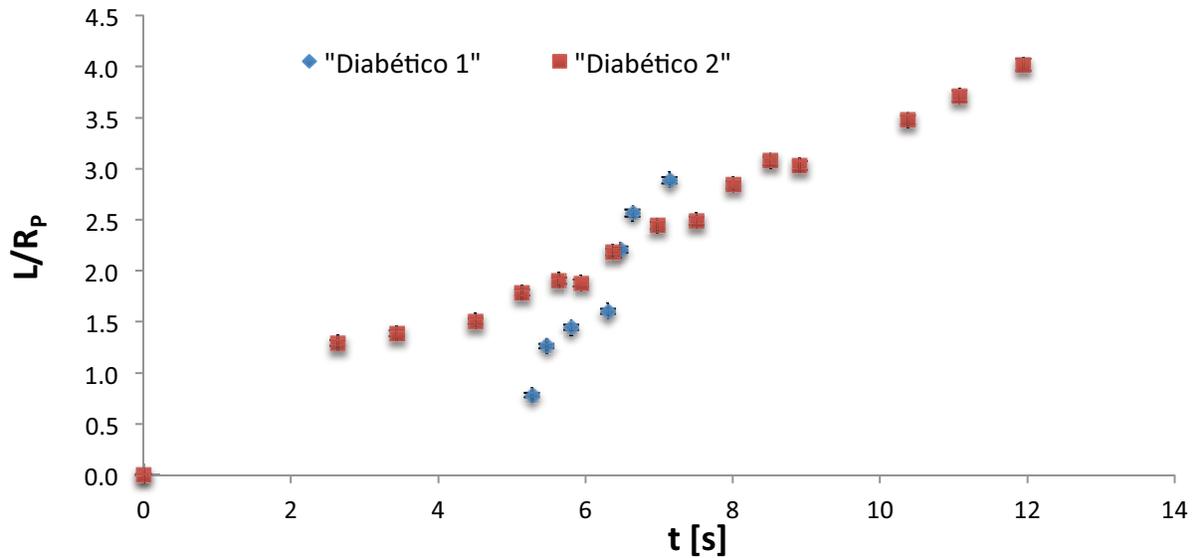
Fotograma	$t \pm \Delta t$ [s]	$\Delta P \pm \delta(\Delta P)$ [inHg]	$L/R_p \pm \Delta(L/R_p)$
0	0.000 0.001	0.0 0.2	0.0 0.02
158	5.272 0.001	5.5 0.2	0.8 0.02
164	5.472 0.001	7.0 0.2	1.3 0.02
174	5.806 0.001	10.0 0.2	1.4 0.03
188	6.306 0.001	12.5 0.2	1.6 0.03

<b>194</b>	6.473	0.001	14.5	0.2	2.2	0.03
<b>199</b>	6.640	0.001	16.0	0.2	2.6	0.04
<b>214</b>	7.140	0.001	18.5	0.2	2.9	0.03

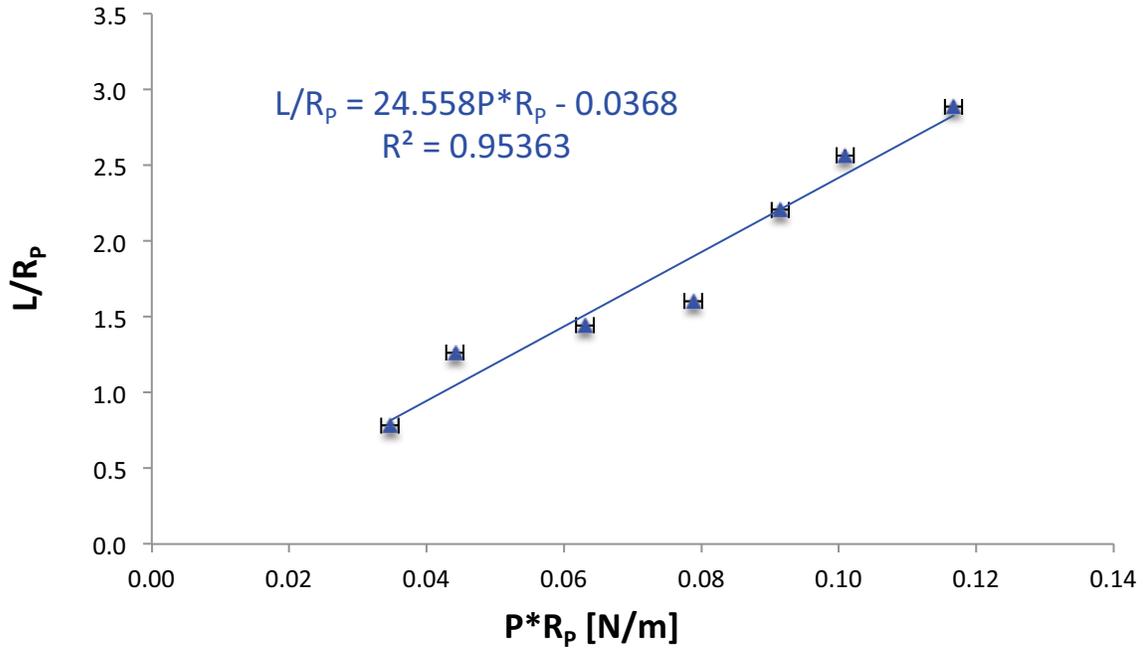
Tabla 11. Deformación del eritrocito 2 de paciente con DMT2

Fotograma	$t \pm \Delta t$ [s]		$\Delta P \pm \delta(\Delta P)$ [inHg]		$L/R_p \pm \Delta(L/R_p)$	
<b>0</b>	0.000	0.001	0.0	0.2	0.0	0.00
<b>79</b>	2.636	0.001	3.5	0.2	1.3	0.03
<b>103</b>	3.437	0.001	4.0	0.2	1.4	0.03
<b>135</b>	4.505	0.001	5.0	0.2	1.5	0.03
<b>154</b>	5.138	0.001	6.5	0.2	1.8	0.03
<b>169</b>	5.639	0.001	8.0	0.2	1.9	0.03
<b>178</b>	5.939	0.001	10.5	0.2	1.9	0.03
<b>191</b>	6.373	0.001	12.0	0.2	2.2	0.03
<b>209</b>	6.974	0.001	13.0	0.2	2.4	0.04
<b>225</b>	7.508	0.001	14.5	0.2	2.5	0.04
<b>240</b>	8.008	0.001	15.0	0.2	2.8	0.04
<b>255</b>	8.509	0.001	17.5	0.2	3.1	0.04
<b>267</b>	8.909	0.001	19.0	0.2	3.0	0.04
<b>311</b>	10.377	0.001	20.5	0.2	3.5	0.05
<b>332</b>	11.078	0.001	21.0	0.2	3.7	0.06
<b>358</b>	11.945	0.001	22.0	0.2	4.0	0.06

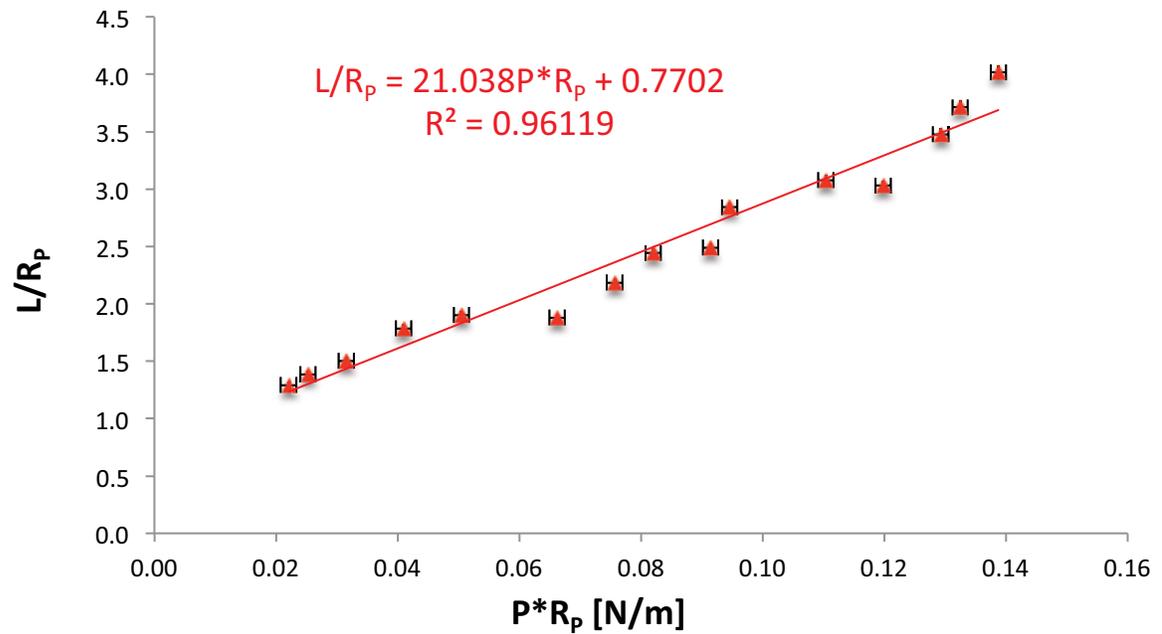
Gráfica 10. Esfuerzo contra tiempo para los casos de eritrocitos de pacientes con DMT2



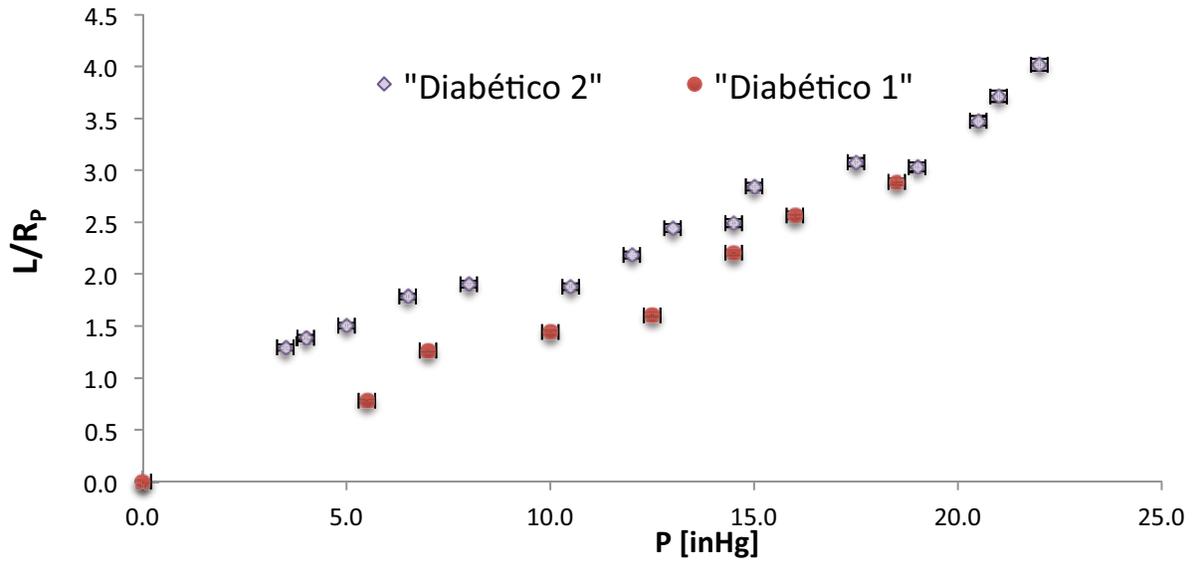
Gráfica 11. Curva estrés-esfuerzo para el eritrocito 1 de paciente con DMT2



Gráfica 12. Curva estrés-esfuerzo para el eritrocito 2 de paciente con DMT2

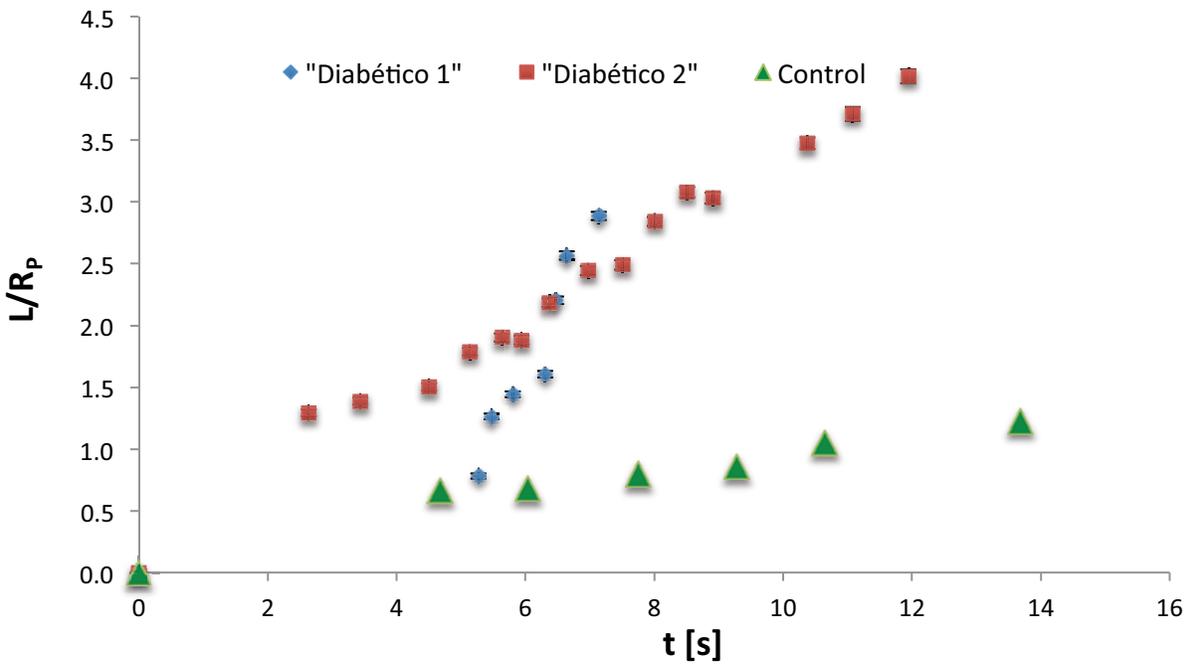


Gráfica 13. Esfuerzo vs presión aplicada en ambos casos de pacientes con DM

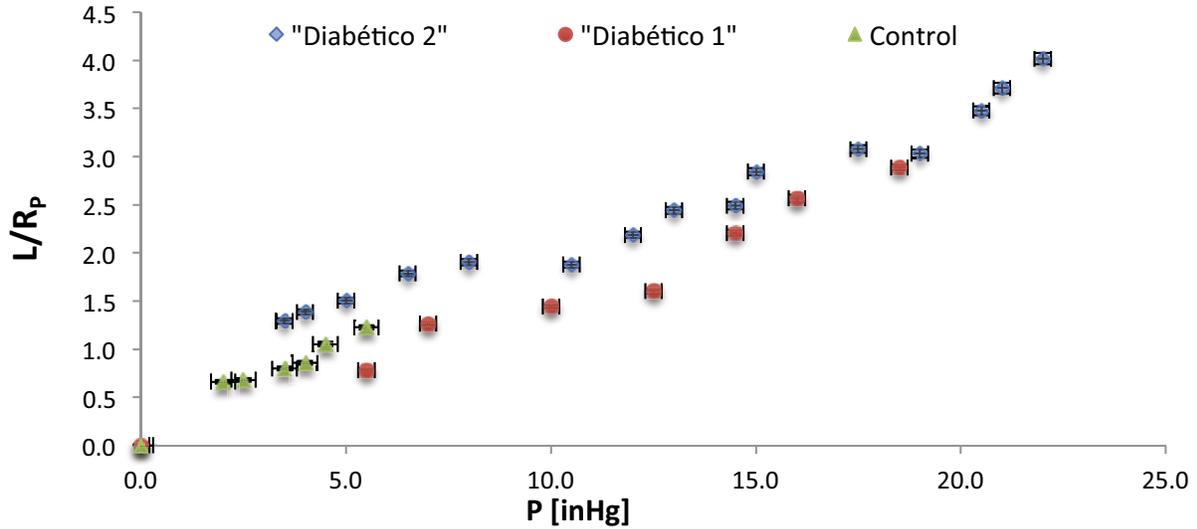


#### 4.2.3 Comparación entre el caso control y el diabético

Gráfica 14. Casos con DM vs Control

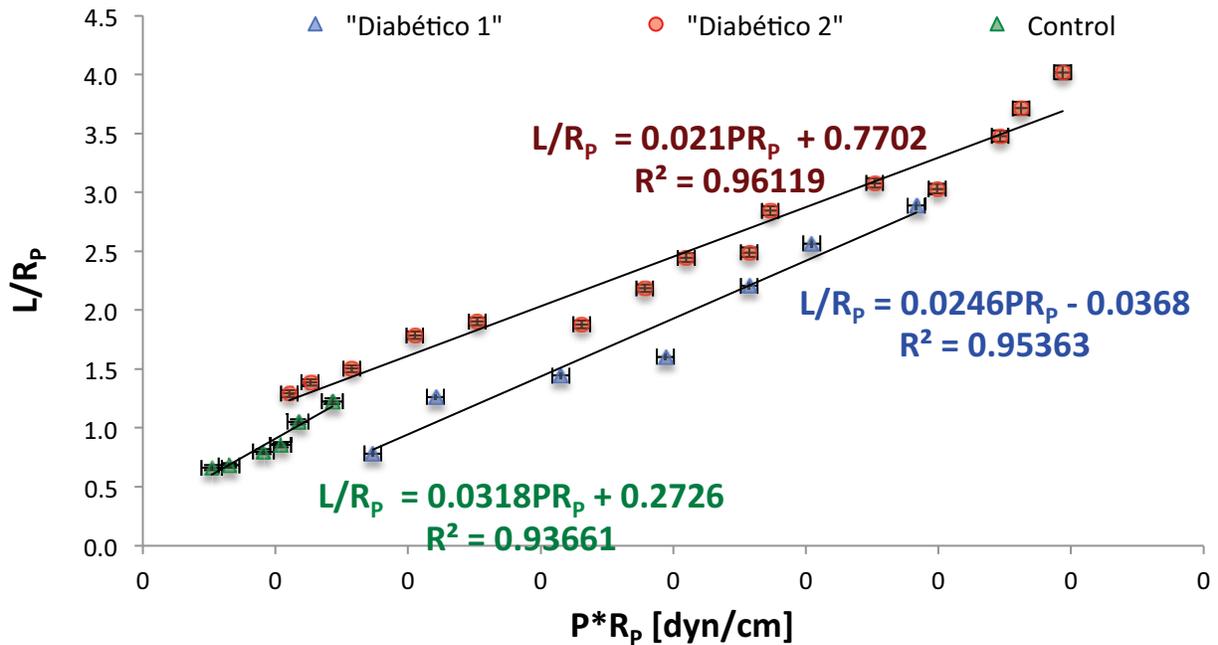


Gráfica 15. Comparación de la presión requerida para succionar un eritrocito en el caso diabético y control.



De acuerdo a las gráficas anteriores, se puede deducir que al tiempo  $t$  y a la presión  $P$ , la deformabilidad en los eritrocitos de pacientes con DM es mayor que en el caso del eritrocito perteneciente al sujeto sano. En la siguiente gráfica, se observa que la presión requerida para aspirar al eritrocito de pacientes con DMT2 es de  $5 \pm 1$  veces más grande que en sujetos control, lo cual indica un aumento en la rigidez de la membrana.

Gráfica 16. Comparación de curvas estrés-esfuerzo (DMT2 y control).



# CAPÍTULO 5

---

## DISCUSIÓN

La DMT2 es un desorden metabólico que depende de factores de riesgo ambientales y sociales en los que el individuo se desarrolla, además de ciertos elementos genéticos que puedan predisponerlo. Durante el curso natural de la enfermedad, la sangre se vuelve más viscosa y menos filtrable, comparada con la de los sujetos sanos, debido al incremento de la agregación de los eritrocitos y la propensión de los leucocitos a adherirse a las paredes capilares. El factor común a los cambios celulares es la alta concentración de glucosa. El efecto de la deficiencia de los tejidos para asimilar a la glucosa sanguínea por falta de insulina afecta a todas las células, en particular a las células de la sangre. La función del eritrocito está centrada en el transporte de gases, desde los pulmones a los tejidos como es el caso del  $O_2$  y desde los tejidos al pulmón, como es el caso del  $CO_2$ . Las altas concentraciones permanentes de glucosa afectan al eritrocito ya que glucosilan tanto proteínas externas de membrana como proteínas intracelulares, tales como la hemoglobina, que es la proteína más abundante del eritrocito. La glucosilación no reversible de las proteínas de la membrana aumenta la viscosidad de la misma alterando sus propiedades reológicas, como se registró en este estudio [4].

## CITOMETRÍA DE FLUJO

La deformabilidad del eritrocito se manifiesta por la fragilidad osmótica del mismo, que se asocia, a su vez, con las propiedades electorcinéticas de la membrana y afecta directamente la macro y la microcirculación. La fragilidad osmótica es una medida de la susceptibilidad que la membrana tiene a lisarse cuando se encuentra inmersa en un medio hipotónico y se incrementa en pacientes diabéticos con angiopatías, indicando que los eritrocitos de pacientes con DV son más frágiles que los pacientes con DM y los sujetos control [113], esta es una de las razones por las cuales el eritrocito de pacientes con DM puede modificar su forma de manera irreversible, como se encontró en los resultados citométricos.

En este estudio, la selección de poblaciones de eritrocitos por citometría de flujo revela poblaciones diferentes entre individuos sanos y en pacientes con DMT2 en diferentes condiciones. El sólo patrón citométrico indica la presencia de poblaciones anormales de eritrocitos en la sangre de pacientes con DM. El paso obligado de célula por célula en el citómetro de flujo elimina el factor de agregación, debido a la dilución de la muestra, por lo que las poblaciones heterogéneas observadas en los pacientes con DM, independientemente del curso de la enfermedad (con medicamento o sin ellos), se expresa en diferentes tamaños y granulosidad, lo que indica la complejidad interna del eritrocito dando origen a estados intermedios de poblaciones (Figura 76-79), mientras que los eritrocitos de los individuos sanos se agrupan mayoritariamente en una población (Figura 75).

En el resultado citométrico, se puede observar un corrimiento hacia la derecha en la población más abundante en el caso de los eritrocitos de pacientes diabéticos, comparada con los sujetos control, indicando un aumento de tamaño en el eritrocito. También se observa que entre los mismos pacientes diabéticos insulino dependientes, tratados con glibencamida y aquellos sin tratamiento médico, existen diferencias en cuanto a las poblaciones de tamaño: hay un aumento de otras poblaciones, indicando la presencia de más tamaños de eritrocitos, lo cual corresponde a lo ya reportado en la literatura. En cuanto a complejidad, la población mayoritaria se asemeja a los sujetos control, sin embargo hay un aumento de otras formas complejas del eritrocito como es observable en los sujetos diabéticos sin tratamiento médico.

A su vez, las alteraciones membranales están asociadas con una disminución en el potencial de membrana, lo cual va a permitir un aumento en la agregación de los eritrocitos. La membrana contiene proteínas y glicoproteínas cargadas negativamente, que crean un potencial repulsivo entre las células y previene su agregación durante su flujo por la sangre. Por lo tanto, si este potencial permanece constante, la fluidez también lo hace. Pero si el potencial disminuye progresivamente mediante la introducción de cationes, la estabilidad del sistema cambia progresivamente, de una simple aglomeración a un fluido en forma de gel. En sujetos control, el potencial de membrana es de  $-37.24 \pm 1.5mV$ ; pero en pacientes diabéticos disminuye a  $-28.44 \pm 1.5mV$ , y, más aún, en aquellos con daño vascular  $-22.21 \pm 1.21mV$ . Los cambios en este potencial son consistentes con el decremento de la fluidez de membrana en eritrocitos de pacientes con DM. Por lo tanto, la agregación de los glóbulos rojos es un factor predisponente para el DV, ya que impide la efectiva circulación sanguínea porque se ocluyen capilares pequeños produciendo su ruptura [127].

Se ha propuesto que las alteraciones en las proteínas de la membrana debidas a la glucosilación y al estrés oxidativo resultante, son algunas de las causas por las cuales la membrana tiende a lisarse con mayor facilidad. Como es el caso del daño producido a la anquirina, proteína de anclaje de la membrana al citoesqueleto, que forma el complejo de unión entre la espectrina y la proteína de banda 3 (Figura 44). Ésta disminuye un 67.4% en pacientes diabéticos y un 84.7% en aquellos con daño vascular. Esta proteína es muy importante, ya que juega un rol específico en la organización del citoesqueleto, así como su integridad, transporte iónico y mantenimiento de la polaridad y estabilidad celular en muchos procesos. La reducción significativa de la anquirina puede deberse al aumento del estrés oxidativo producido por la glucosilación, que resulta en un daño a la membrana porque los radicales libres reaccionan con los electrones de los lípidos en la membrana, dañándola y volviéndola más susceptible a la degradación de sus proteínas [127]. Esto se relaciona directamente con las alteraciones en la forma del eritrocito, como se observó en los resultados citométricos en el aumento de otras formas eritrocitarias más complejas.

Los eritrocitos son susceptibles al incremento en la peroxidación de lípidos cuando están expuestos a un estrés oxidativo significativo, y esto sucede en la DM2 debido a que hay una disminución en los agentes antioxidantes. Esto aumenta la rigidez de la membrana, disminuyendo la deformabilidad del eritrocito. Tanto la peroxidación lipídica y la glucosilación de las proteínas causan una reducción de las actividades de las enzimas, alterando la estructura y función de las membranas, llevando a la disfunción celular [128]. Esto se ve reflejado en la citometría, debido a las alteraciones membranales que sufren los eritrocitos de los pacientes con DM.

La Hb glucosilada es un parámetro que se determina en los diabéticos para determinar el grado de daño vascular. En sujetos control, la Hb glucosilada se encuentra dentro de los límites normales, mientras que en los pacientes diabéticos con un pobre control de la glucosa tiene un aumento de aproximadamente 50% del valor control [129], lo cual está relacionado directamente con las concentraciones altas de glucosa en sangre. El aumento de la hemoglobina glucosilada está relacionado con el envejecimiento del eritrocito y éste, a su vez, con los cambios morfológicos de los eritrocitos de pacientes con DM que originan glóbulos con morfología irregular o equinocitos [130]. Estas formas son menos susceptibles a la deformación y más susceptibles a la agregación [131]. Otro factor que también predispone al aumento de las diversas formas no funcionales del eritrocito es la hipercolesterolemia asociada a la hiperglucemia que produce morfologías de equinocitos que tienen una función disminuida en el intercambio gaseoso y en sus propiedades reológicas [132].

## **ASPIRACIÓN CON MICROPIPETAS**

En las patologías caracterizadas por la disminución en el flujo sanguíneo están involucradas alteraciones reológicas, como aumento en la viscosidad de la sangre, que, a su vez, está asociada a los cambios reológicos de las células que la componen, principalmente de los eritrocitos, ya que son los más abundantes [133]. Hay factores tanto intra como extracelulares que modifican estas propiedades en los eritrocitos y empeoran su circulación en la red capilar; entre los factores externos tenemos la concentración de algunos metabolitos en el plasma: lípidos, colesterol o proteínas [134]. El colesterol se encuentra elevado en pacientes que padecen DM complicada con vasculopatías, en concentraciones por arriba de 200 *mg/dL*, aumentando la viscosidad sanguínea y la rigidez celular. Como los eritrocitos son incapaces de sintetizar lípidos y proteínas, su composición lipídica varía de acuerdo a los cambios que tienen las proteínas y los lípidos en el plasma. La hipercolesterolemia eleva la viscosidad interna y la rigidez de la membrana eritrocitaria, que es un factor importante en la deformabilidad del eritrocito [135].

En el presente estudio, los eritrocitos (discocitos) de pacientes con DMT2 requieren de una presión de succión para deformarse de 4 a 6 veces mayor que la requerida para los eritrocitos de individuos sanos, lo que indica una membrana rígida. Una observación que no está representada en los resultados de este estudio por condiciones del video, es la falta de reversibilidad de la deformación del eritrocito de paciente con DMT2, observándose que al liberar la presión (succión) el eritrocito pierde su forma bicóncava, lo que sugiere una lesión estructural con pérdida de la función cuando los eritrocitos cruzan el lecho capilar.

El aumento en la rigidez de la membrana disminuye la actividad de las proteínas encargadas de mantener un equilibrio iónico en el eritrocito, aumentando las concentraciones de calcio intracelular. Este aumento induce la proteólisis y la agregación de proteínas, resultando en un cambio en la viscosidad del citoplasma y una modificación en la interacción de las proteínas del citoesqueleto con las de la membrana plasmática, lo que a su vez impacta a las propiedades elásticas de la membrana [136], como es observado cualitativamente en este trabajo al comparar las presiones requeridas para deformar el eritrocito de un paciente diabético con el sujeto sano.

El efecto de la hiperglucemia sobre las proteínas de membrana del eritrocito y la glucosilación de la hemoglobina son un índice importante para pronosticar el compromiso reológico que experimentan los eritrocitos [137]. Además del efecto de lípidos y proteínas aumentados en el plasma sobre la viscoelasticidad de los eritrocitos, en el caso de los pacientes con DMT2, la hiperglucemia prolongada aumenta la viscosidad de la sangre en un 25% [138].

La baja capacidad de la Hb glucosilada de fijar O<sub>2</sub>, interviene en el estrés oxidativo que se ha demostrado en eritrocitos de pacientes con DM a través de un aumento en el malondialdehído (MDA, que es un indicador de peroxidación de los lípidos y daña a la membrana de forma estructural y funcional), y en la disminución en la concentración del glutatión (GSH, que se encarga de proteger a la membrana de las especies reactivas como el oxígeno [139]). El estrés oxidativo contribuye junto con el desequilibrio electrolítico al daño de las proteínas y pérdida de la función, ya que en los pacientes diabéticos los niveles de sodio intracelular y de potasio sérico están aumentados significativamente comparados con los sujetos control, debido a que la función de la bomba ( $Na^+/K^+$ )ATPasa está disminuida, y esto es inversamente proporcional a la concentración sistólica de calcio, ya que ésta se encarga de mantener el gradiente de concentración entre el sodio y el potasio a través de la membrana: exporta tres iones de sodio intracelular e importa dos iones de potasio extracelular [140]. Al disminuir su actividad, se ocasiona un desequilibrio iónico (por la acumulación de sodio en el interior del eritrocito con la subsecuente acumulación de iones de calcio libres en el exterior), y aceleración del envejecimiento de la membrana, indicando pérdida de deformabilidad en eritrocitos diabéticos [141].

La elasticidad, asociada a la deformabilidad de los eritrocitos (discocitos) de pacientes con DMT2 insulino dependientes estudiados en este trabajo es de 30-52% más grande que en el caso control, lo que indica que el sistema membrana-citoesqueleto de los eritrocitos de pacientes con este padecimiento es más elástico que el caso control. Sin embargo, estos eritrocitos pierden sus propiedades elásticas luego de la deformación, ya que se rebasa su límite elástico, comportándose posteriormente de forma plástica hasta lograr su ruptura. Así que sólo es posible considerarlos elásticos durante la deformación, como se observa en la pendiente de las curvas estrés-esfuerzo para los tres casos.

En las gráficas de deformación contra tiempo y contra presión, se observa que los eritrocitos control necesitan presiones más bajas y tiempos más largos para deformarse lo mismo que un eritrocito de paciente diabético. al tiempo t la deformación es mayor en el caso de los eritrocitos de pacientes con DMT2, comparada con el caso control. Esta dependencia en el tiempo indica la presencia de la componente viscosa, que se relaciona con la teoría.

Muchos estudios se han realizado con diversas metodologías en la búsqueda por los principios teóricos que sirvan para implementar la tecnología diagnóstica temprana que asocie a las propiedades reológicas del eritrocito a la enfermedad vascular primaria o secundaria a patologías crónicas como la DM [142, 143]. Aspiración con micropipetas, deformación con campos eléctricos, pinzas ópticas [144], proveen información cuantitativa acerca de la elasticidad en condiciones estáticas. Pero independientemente de la aproximación metodológica, el resultado en el caso de la DM complicada con vasculopatías, resulta en un aumento de la rigidez de membrana de los eritrocitos (discocitos), con un aumento de la viscosidad plasmática y celular, así como una alteración en las propiedades elásticas del eritrocito, de tal manera que éste las pierde luego de una deformación [145].

Todos los factores mencionados que alteran las propiedades reológicas del eritrocito confirman el compromiso de determinar tempranamente el grado de daño celular antes de ser instalada la enfermedad vascular irreversible [146]. Actualmente hay poca información cualitativa y ninguna información cuantitativa concluyente acerca de la pérdida de deformabilidad de los eritrocitos asociada con DMT2 que pueda ser útil para desarrollar un método diagnóstico de carácter preventivo que apoye a disminuir el riesgo de la instalación clínica del daño vascular con isquemia [147].

En este estudio, se desarrolló una técnica que puede medir cualitativamente el comportamiento elástico y la deformabilidad de eritrocitos en condiciones estáticas, que permiten hacer comparaciones entre poblaciones de eritrocitos de diversas formas y en condiciones diferentes.

# ABREVIATURAS

<b>CS</b>	Complejo de Suspensión
<b>CU</b>	Complejo Unión
<b>DCV</b>	Daño cardiovascular
<b>DCeV</b>	Daño cerebrovascular
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMG</b>	Diabetes Mellitus Gestacional
<b>DMT1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>DV</b>	Daño Vascular
<b>EAOP</b>	Enfermedad Arterial Obstructiva Periférica
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbA</b>	Hemoglobina Adulta
<b>HbA1</b>	Hemoglobina Glucosilada
<b>ND</b>	Nefropatía Diabética
<b>NeD</b>	Neuropatía Diabética
<b>OVP</b>	Obstrucción vascular periférica
<b>RD</b>	Retinopatía Diabética

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diabetes gestacional [].	10
Figura 2. Disecciones anatómicas de Gunter Von Hagen [].	10
Figura 3. <b>(a)</b> Estructura ocular. <b>(b)</b> Arterias y venas de la retina [].	11
Figura 4. Ejemplo de aneurismas y ruptura de los capilares [11, ].	12
Figura 5. Comparación entre riñón sano y con enfermedad renal [].	13
Figura 6. Representación del daño vascular en el pie diabético [, ].	14
Figura 7. Neuropatía periférica (izquierda) y autonómica (derecha) [18].	14
Figura 8. Personas entre 35 y 64 años con DM y proyección a 30 años [].	15
Figura 9. Prevalencia estimada de diabetes [%] en personas de 20-79 años por región mundial, comparativa entre 2010 y 2030 [9].	15
Figura 10. Muertes atribuidas a la DM respecto al porcentaje total de muertes en el mundo [9]*	15
Figura 11. Prevalencia de DM en el mundo [%] (35 a 80 años de edad) [9].	16
Figura 12. Las áreas con línea representan las proporciones de muertes que están relacionadas con la diabetes, enfermedades cardiovasculares, tabaco, etc. [24].	16
Figura 13. Distribución porcentual de las defunciones de la población de 60 años y más por causa. Estadísticas de Mortalidad en México, 2007 [24]. Fuente: INEGI.	17
Figura 14. Porcentaje de las principales causas de morbilidad hospitalaria, población de 60 años y más, 2006. Fuente: SSA, DGIS. INEGI. [ ]	17
Figura 15. Fuente: INEGI. Estadísticas vitales, 2007. Base de datos [26].	18
Figura 16. Hematopoyesis. Ocurre en la médula ósea, la velocidad de producción está regulada por la eritropoyetina que secreta el riñón. Comienza por la célula madre pluripotencial, que forma diversas colonias, las cuales posteriormente se diferencian hasta llegar a las células maduras [].	19
Figura 17. Elementos formes de la sangre [].	20
Figura 18. Eritropoyesis. (a) Proeritroblasto; (b) Eritroblasto basófilo (última célula de este proceso con capacidad mitótica); (c) Eritroblasto policromático; (d) Eritroblasto ortocromático; (e) Reticulocito. ....	21
Figura 19 Eritrocito [ ]	22
Figura 20. Forma del eritrocito. El diámetro promedio del eritrocito es de 8µm; tiene un grosor máximo de 2.6-3µm y una distancia de 0.8-1µm entre las concavidades [, ].	24
Figura 21. Esquema representativo de las tres principales formas que adquiere el eritrocito cuando se somete a una diferencia de presiones. (a) hipertónica, (b) hipotónica, y (c) isotónica [].	25
Figura 22. Eritrocito en solución hipertónica (produce crenación o encogimiento del eritrocito) <b>(a)</b> , hipotónica (puede llegar a plasmólisis o hemólisis) <b>(b)</b> e isotónica (eritrocitos en equilibrio osmótico) <b>(c)</b> [].	25
Figura 23. Los Macroцитos tienen un diámetro mayor a 8.5µm y los Megalocitos mayor a 12µm (asociados con deficiencia de vitamina B12 y/o ácido fólico, trastornos hepáticos, etc.) Los Microцитos son de 6µm y están presentes en las anemias por su bajo contenido de Hb.[].	26
Figura 24. Equinocito. Presentan de 10 a 30 espículas simétricas que pueden convertirse en vesículas y desprenderse del glóbulo convirtiéndolo en esferoequinocito [ (izq), 51 (der)].	27

Figura 25. Knizocito. Posee tres concavidades causadas por alteraciones en la membrana lipídica [].	27
Figura 26. Acantocito. Estructura densa e irregularmente contraída que se presenta cuando el eritrocito se expone a condiciones que modifican el contenido lipídico de la membrana [].	27
Figura 27. Estomatocito. La entrada de sodio excede la del potasio y la membrana gana cationes de agua que la hinchan. Esas invaginaciones cóncavas eventualmente forman vesículas en el interior de estomatocito [ (izq), 51 (der)].	28
Figura 28. Degmacitos [].	28
Figura 29. Esferocitos. Citoesqueleto incapaz de mantener la forma bicóncava por una alteración en la proteína que lo compone [].	28
Figura 30. Eliptocitos. Asociados con una anomalía en la composición bioquímica del citoesqueleto [].	29
Figura 31. Drepanocito [].	29
Figura 32. Dacrocito [].	29
Figura 33. Queratocitos y esquizocitos [].	29
Figura 34. Cuerpos de Heinz [].	30
Figura 35. Picnocitos [].	30
Figura 36. Bicapa lipoproteica, proteínas integrales y periféricas del eritrocito [66].	31
Figura 37. Esquema de la localización y posición de las proteínas de membrana (integrales y periféricas) [].	32
Figura 38. Proteína de Banda 3 [70].	33
Figura 39. Grupos sanguíneos presentes en el glucocalix del eritrocito [].	34
Figura 40. Glucoforina C []. Disposición de las terminales amino y carboxilo de la glucoforina en la bicapa lipídica.	34
Figura 41. Complejo unión formado por cadenas de espectrina y proteínas de anclaje [89].	35
Figura 42. Patrón electroforético de las proteínas de membrana del eritrocito [78].	36
Figura 43. Tetrámero de espectrina: consta de dos cadenas alfa y beta, situadas de forma antiparalela, unidas, en sus extremos, mediante la actina.	37
Figura 44. Unidad hexagonal del citoesqueleto y sus complejos de suspensión [88].	37
Figura 45. Izquierda: representación esquemática del complejo de suspensión anclado a la espectrina cerca de su centro. Está compuesto por la banda 3 que está ligada a la ankirina y que a su vez se ancla a la espectrina; la proteína 4.2, a la que se le unen la banda 3 y la ankirina; y por las glicoproteínas se unen a la banda 3, entre otras proteínas. Derecha: esquema del complejo de unión que contienen espectrina, F-actina y proteína de banda 4.1, así como las proteínas que se unen a la actina como tropomiosina, tropomodulina, aducina, etc. [70].	38
Figura 46. Distribución hexagonal con complejos unión. Los tetrámeros de espectrina (Sp4), la red de tres espectrinas (Sp6), los dobles filamentos del tetrámero de espectrina (2Sp4). En la figura de la derecha se representa esto de forma más ilustrativa [89].	38
Figura 47. Subunidades heptagonales y pentagonales del citoesqueleto [89].	39
Figura 48. Estructura de la hemoglobina [].	40
Figura 49. Productos de glucosilación avanzada. Esquema de reacción del proceso de glucosilación no enzimática de proteínas (A) Formación de la base de Schiff (B) Reordenamiento de Amadori. A través de	

una serie de reacciones complejas, los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc.).....	41
Figura 50. Representaciones de las formas lineal y cíclica de la D-glucosa. Las formas abiertas representan el 0.0002% del total de la glucosa en sangre, ya que son las menos estables []. Las dos últimas son glucopiranos alfa y beta, respectivamente. Son las más abundantes. ....	42
Figura 51. Unidad estructural de la proteína: Aminoácido []......	42
Figura 52. Enlace peptídico []......	43
Figura 53. Ejemplo de la aplicación de los tres tipos de estrés. Del lado izquierdo se observa un cuerpo en equilibrio (A), enseguida se le aplica un estrés compresivo y se ve que su tamaño se reduce (B); después un estrés extensional, donde su tamaño aumenta (C); y, finalmente, el de cizallamiento o estrés cortante, cuya fuerza es tangencial a la superficie (D). ....	47
Figura 54. Curva estrés-esfuerzo. Si se estira un bloque de uno de sus extremos con una fuerza F, el bloque disminuirá su tamaño en el plano xy por cantidades infinitesimales dx y dy. El coeficiente que relaciona el estrés aplicado y el esfuerzo resultante se denomina Módulo de elasticidad. ....	47
Figura 55. Curva estrés-esfuerzo para materiales elásticos.....	49
Figura 56. Aquí se muestran los dos principales radios de curvatura de un elemento de membrana (1R1 y 1R2), así como las tensiones respectivas en las diferentes direcciones de deformación. ....	50
Figura 57. Modelo de la aspiración de la membrana mediante una pipeta cilíndrica de radio RP. ....	50
Figura 58. Curva estrés-esfuerzo. Representa la diferencia de presiones requeridas para aspirar la membrana a una distancia L dentro de la pipeta. La curva se normaliza porque se quiere que sea independiente de Rp y $\mu$ , ya que se asume que ésta es constante [120].....	53
Figura 59. Curva de relajación. La relajación de la membrana es de forma exponencial, y la constante de tiempo respectiva se relaciona con la viscosidad y la elasticidad mediante $\tau = \eta\mu$ .....	53
Figura 60. Centrifugación de la sangre. <b>(a)</b> Rotor de ángulo fijo, <b>(b)</b> Las partículas recorren menos distancia, permitiendo un tiempo de centrifugación relativamente corto.....	57
Figura 61. Separación de los componentes de la sangre. <b>(a)</b> La muestra se colocó con Ficoll-Hypaque 2:1, <b>(b)</b> Luego de la centrifugación, los componentes de la sangre se separaron en bandas: Leucocitos (arriba), granulocitos (en medio), y eritrocitos (abajo).....	57
Figura 62. Esquema del sistema hidrodinámico del citómetro [115]. ....	59
Figura 63. Esquema del punto de interrogación [115]. <b>(A)</b> Cuando la célula pasa a través del punto de interrogación crea un pulso cuya amplitud depende del tamaño de la célula o partícula que esté atravesando el haz. Posteriormente la señal regresa a cero. (Para el caso de fluorescencia, se toma la integral de la curva). <b>(B)</b> Modos en los que el haz emite, lo deseable es TEM 00, aunque es posible una mezcla de éste y TEM 01. <b>(C)</b> El pulso se traduce en una señal de voltaje, en la cual el usuario define una ventana temporal y un umbral. ....	60
Figura 64. Separación de la muestra mediante citometría de flujo [115].....	61
Figura 65. Distancia crítica [119]......	62
Figura 66. Esquema del análisis geométrico de la posición de la célula. ....	63
Figura 67. Equipo <i>Flaming/Brown Micropipette puller, Model P-97, Sutter Instrument CO</i> , utilizado para hacer las micropipetas []......	64
Figura 68. Esquema del ciclo de rompimiento del capilar []. ....	65

Figura 69. Foto (arriba) y esquema de la hechura de las micropipetas (abajo). La punta de ésta es cilíndrica.....	65
Figura 70. La punta de la pipeta se mide con un micrómetro ajustado al lente del microscopio []. Ésta debe medir de 2-3µm de diámetro interno, aproximadamente.....	66
Figura 71. Esquema detallado del sistema para sujetar a la pipeta.....	66
Figura 72. Esquema representativo de la colocación de la micropipeta para atrapar al eritrocito (izquierda). A la derecha se muestra una imagen tomada con la cámara de video acoplada al microscopio, usando el objetivo de 40x.....	67
Figura 73. (a) Comienzo de la succión, (b) Longitud crítica L y (c) Rompimiento de la membrana. PP y P0 son las presiones de la pipeta y del medio, respectivamente .....	67
Figura 74. Sistema de succión. Los puntos 1-7 corresponden a diferentes secciones transversales por donde pasa el aire succionado.....	68
Figura 75. <b>(a1-5)</b> Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). <b>(b1-5)</b> Histograma de dispersión lateral (tamaño). <b>(c1-5)</b> Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad). .....	71
Figura 76. Gráfica de los porcentajes correspondientes a la población más grande de cada caso control. El resto pertenece a otras formas eritrocitarias. ....	72
Figura 77. <b>(a1-2)</b> Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). <b>(b1-2)</b> Histograma de dispersión lateral (tamaño). <b>(c1-2)</b> Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad). ....	73
Figura 78. <b>(a1-2)</b> Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). <b>(b1-2)</b> Histograma de dispersión lateral (tamaño). <b>(c1-2)</b> Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad). ....	74
Figura 79. <b>(a1-4)</b> Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). <b>(b1-4)</b> Histograma de dispersión lateral (tamaño). <b>(c1-4)</b> Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad). ....	75
Figura 80. <b>(a1)</b> Gráfica de poblaciones por complejidad (eje vertical) y tamaño (eje horizontal). <b>(b1)</b> Histograma de dispersión lateral (tamaño). <b>(c1)</b> Histograma de dispersión hacia adelante (complejidad). .....	76
Figura 81. Medición del diámetro del eritrocito. ....	78
Figura 82. <b>(a)</b> Imagen analizada con INFINITY ANALYZE de Lumenera, <b>(b)</b> Imagen analizada con ImageJ, (c) En esta figura se trazaron dos líneas de las que se obtiene el perfil de valores de gris contra distancia en pixeles, para realizar el cociente respectivo. ....	78
Figura 83. Medición del diámetro del eritrocito. ....	84
Figura 84. <b>(a)</b> Imagen analizada con INFINITY ANALYZE de Lumenera, <b>(b)</b> Imagen analizada con ImageJ, (c) En esta figura se trazaron dos líneas de las que se obtiene el perfil. El número corresponde al eritrocito 1 y 2, respectivamente. En ambos casos se seleccionaron los fotogramas más definidos.....	85

## REFERENCIAS

---

- [1] Triana M., (2001). La hiperglucemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y
- [2] Gerich J. E., (1998). The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine Reviews*; 19 (4): 491-503.
- [3] Microangiopathy D. Medical Staff Conference. (1974): 404 – 412.
- [4] Riquelme B., et al., (2005). A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 62: 131-141.
- [5] Tirosh A., et al., (2005). Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *N. Eng. J. Med.* 353 (14): 1454-1462.
- [6] Riquelme B., et al., (2005). A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 62: 131-141.
- [7] (Imagen) <http://www.annblogs.com/dieta-para-diabetes-gestacional/>.
- [8] Petropoulos I., et al., (2007) Structural alterations of the erythrocyte membrane proteins in diabetic retinopathy, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245:1179-1188.
- [9] IDF Diabetes Atlas, 4ª ed. International Diabetes Federation, 2009.
- [10] Evans S., (1996). Diabetic retinopathy. *J. R. Soc. Med.*; 89: 230-231.
- [11] Records R., (1970). Pathogenesis of diabetic retinopathy. A review of current concepts. *Acta. Diabet. Lat.*; 7 (1): 1-54.
- [12] Grunwald, J. E., et al., (1996). Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus. *British J. of Ophthalmology*; 80: 327-331.
- [13] (Imagen) [http://usuarios.discapnet.es/ojo\\_oido/el\\_ojo\\_cuatro.htm](http://usuarios.discapnet.es/ojo_oido/el_ojo_cuatro.htm).
- [14] (Imagen) <http://www.galenusrevista.com/La-nefropatia-diabetica>.
- [15] Nayak B., et al., (2008). Determination of RBC membrane and serum lipid composition in trinidadian type II diabetics with and without nephropathy. *Vascular Health and Risk Management*; 4(4): 893-899.
- [16] (Imagen) [http://www.umm.edu/esp\\_imagepages/19713.htm](http://www.umm.edu/esp_imagepages/19713.htm).
- [17] Arora, S., (2010). Renal function in diabetic nephropathy. *World J. Diabetes*; 1(2): 48-56.
- [18] *The nerve damage of diabetes*. National diabetes information clearinghouse.
- [19] (Imagen) <http://diabetesstop.wordpress.com/2007/12/11/neuropatia-diabetica-lo-que-usted-puede-hacer-al-respecto/>.

- 
- [20] (Imagen) <http://blogtusalud.com/category/diabetes/>.
- [21] Sternberg T., et al., (2005). *Diabetic peripheral neuropathy: current concepts and treatment*. Northeast Florida medicine. Diabetes and Neuropathy; 23-26.
- [22] Cinar Y., et al. (2001). Blood Viscosity and Blood Pressure: Role of Temperature and Hyperglycemia. American Journal Of Hypertension; 14: 433-438.
- [23] (Imagen) <http://www.cienciorama.unam.mx/index.jsp?pagina=vida&action=vrArticulo &aid=251>
- [24] Mujeres y Hombres en México 2008. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) e Instituto Nacional de las Mujeres. (2008).
- [25] Mujeres y Hombres en México 2009. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) e Instituto Nacional de las Mujeres. (2009).
- [26] Mujeres y Hombres en México 2010. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) e Instituto Nacional de las Mujeres. (2009).
- [27] (Imagen) <http://www.eritropoyetina.com/biosintesis-y-funcion-biologica/>
- [28] Ramírez M. y Cornejo A. M., (2004). Fisiología de la hematopoyesis. *Pediatr. Integral*; VIII(5): 377-382.
- [29] (Imagen) <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/192088/113906/Blood -is-made-up-of-multiple-components-including-red-blood#>
- [30] Mayani, et al. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*; 2: 95-107.
- [31] Young B. et al. (2000). *Wheater's Histología Funcional: Texto y Atlas en Color*. Ed. Elsevier España, 4ª ed, Cap. 3, pp. 40
- [32] Shemin D. y Rittenberg D., (1946). The life span of the human red blood cell. *J. Biol. Chem*; 627-636.
- [33] Bransky A., et al., (2007). Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer. *Microvascular Research*; 73: 7-13.
- [34] (Imagen) <http://www.environmentalgraffiti.com/featured/images-inside-human-body-images/8292>
- [35] Thomas M. Fischer (2004) Shape Memory of Human Red Blood Cells. *Biophysical Journal*, 86:3304-3313.
- [36] Jay A. W. L. y Rowlands S., (1975). The stages of osmotic haemolysis. *J. Physiol*; 252: 817-832.
- [37] Hochmuth R. M., et al., (1973). Measurement of the elastic modulus for the red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.*; 13: 747-762.
- [38] Canham P. B. y Burton A. C., (1968). Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. *Circulation Research*, 22: 405-422.
- [39] Jay A. W L., (1975). Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on Cell Geometry. *Biophys. J.*; 15: 205-222.
- [40] (Imagen) <http://pharamcytimes.wordpress.com/category/human-anatomy-physiology/the-blood/>
- [41] Chandran, K. B., et al., (2007). *Biofluid Mechanics. The human circulation*. Ed. Taylor & Francis. Cap. 4, pp. 125.

- 
- [42] Hach T., et al. (2008). C-Peptide and Its C-Terminal Fragments Improve Erythrocyte Deformability in Type 1 Diabetes Patients. *Exp. Diab. Research*; 1-6.
- [43] Mitchison J. M. y Swann M. M. (1954). The mechanical properties of the cell surface. I. The cell elastimeter. *Journal of Experimental Biology*; 31, 3: 443-461.
- [44] Fung Y. C. B. y Tong P., (1968). Theory of the sphering of red blood cells. *Biophys. J.*; 8:175-198.
- [45] (Imagen) [http://en.wikipedia.org/wiki/Red\\_blood\\_cell](http://en.wikipedia.org/wiki/Red_blood_cell)
- [46] Adams K. H., (1973). Mechanical deformability of biological membranes and the sphering of the erythrocyte. *Biophys. J.*; 13: 209-216.
- [47] (Imagen) <http://148.204.160.158/polilibros/fisicoquimica/COLIGATIVAS/PRESION%20OSMOTICA.htm>
- [48] Yang Z-C, et al., (2007). Asymmetric dimethylarginine reduced erythrocyte deformability in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microvasc. Res.*; 73: 131-136.
- [49] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-UN6yzaVI/AAAAAAAAAEY/b72gE8x31p0/s1600-h/macrocitos.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-UN6yzaVI/AAAAAAAAAEY/b72gE8x31p0/s1600-h/macrocitos.jpg)
- [50] Yasuda Y., et al., (1984). Scanning electron microscopy studies of erythrocytes in spinocerebellar degeneration. *J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*; 47: 269-274.
- [51] Lim G., et al., (2002). Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayers couple hypothesis from membrane mechanics. *PNAS*; 99(26): 16766-16769.
- [52] Turchetti V., (1997). Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clin. Hemo. and Microcirc.*; 17: 209-215.
- [53] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-U5D\\_CxGI/AAAAAAAAAEo/33SngRDWoRU/s1600-h/equinocito.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-U5D_CxGI/AAAAAAAAAEo/33SngRDWoRU/s1600-h/equinocito.jpg)
- [54] (Imagen) [http://3.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-Z2XFgvoI/AAAAAAAAAGo/j6ilDxracSw/s1600-h/knizocito\\_r01\\_c01.jpg](http://3.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-Z2XFgvoI/AAAAAAAAAGo/j6ilDxracSw/s1600-h/knizocito_r01_c01.jpg)
- [55] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-VB4\\_\\_1-I/AAAAAAAAAEw/rBjhG3y4UVU/s1600-h/acantocito.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-VB4__1-I/AAAAAAAAAEw/rBjhG3y4UVU/s1600-h/acantocito.jpg)
- [56] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-VUr-4z4I/AAAAAAAAAE4/Oi8dwbPqJhA/s1600-h/estomatocito\\_r02\\_c01.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-VUr-4z4I/AAAAAAAAAE4/Oi8dwbPqJhA/s1600-h/estomatocito_r02_c01.jpg)
- [57] (Imagen) [http://3.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-Vfx8UJkI/AAAAAAAAAFa/9UZaUmEHBe4/s1600-h/degmacito.jpg](http://3.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-Vfx8UJkI/AAAAAAAAAFa/9UZaUmEHBe4/s1600-h/degmacito.jpg)
- [58] (Imagen) [http://1.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-VtPvzjTI/AAAAAAAAAFI/OLNcK38rcWA/s1600-h/esferocito\\_r02\\_c01.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-VtPvzjTI/AAAAAAAAAFI/OLNcK38rcWA/s1600-h/esferocito_r02_c01.jpg)
- [59] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-Wts0sOII/AAAAAAAAAFg/MWOTKdQzTkU/s1600-h/ovalocito.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-Wts0sOII/AAAAAAAAAFg/MWOTKdQzTkU/s1600-h/ovalocito.jpg)
- [60] (Imagen) [http://1.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-XzJ7Xv\\_I/AAAAAAAAAFw/48GVO80rDEk/s1600-h/depranocito.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-XzJ7Xv_I/AAAAAAAAAFw/48GVO80rDEk/s1600-h/depranocito.jpg)

- 
- [61] (Imagen) [http://1.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-X\\_SICIH/AAAAAAAAAF4/Yqq4d5eMvz0/s1600-h/dacrocito.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-X_SICIH/AAAAAAAAAF4/Yqq4d5eMvz0/s1600-h/dacrocito.jpg)
- [62] (Imagen) [http://2.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-YeyZtZWI/AAAAAAAAAGI/grhrnWoCRc4/s1600-h/queratocito\\_r1\\_c1.jpg](http://2.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-YeyZtZWI/AAAAAAAAAGI/grhrnWoCRc4/s1600-h/queratocito_r1_c1.jpg)
- [63] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-ZD2QTyNI/AAAAAAAAAGY/A\\_sRjXnh1hw/s1600-h/cuerpos\\_heinz.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-ZD2QTyNI/AAAAAAAAAGY/A_sRjXnh1hw/s1600-h/cuerpos_heinz.jpg)
- [64] (Imagen) [http://4.bp.blogspot.com/\\_wiwb1\\_jfo6U/Se-aXhQgh5I/AAAAAAAAAG4/S3nHCvKjc8Q/s1600-h/picnocitos.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wiwb1_jfo6U/Se-aXhQgh5I/AAAAAAAAAG4/S3nHCvKjc8Q/s1600-h/picnocitos.jpg)
- [65] Steck T. L., (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.*; 62: 1-19.
- [66] Arce H. A. y Vallescusa B. R., (2005). Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter*; 21: 3.
- [67] Vélez H., et al. *Fundamentos de Medicina: Hematología*. †. Corporación de Investigaciones Biológicas, 6ª ed. Cap. 9, pp. 74.
- [68] Wrong O., et al., (2002). Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and southeast asian ovalocytosis. *Kidney International*; 62:10-19.
- [69] Wang D. N., (1994). Band 3 protein: structure flexibility and function. *FEBS Letters*; 346: 26-31.
- [70] Salomao M., et al., (2008). Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *PNAS*; 105(23): 8026-8031.
- [71] Arce H. A. y Vallescusa B. R. (2007). Purificación de la proteína banda 3 de eritrocitos humanos (AE 1). *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter*; 3: 1.
- [72] (Imagen) [http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/2000439/Mi-sangre\\_-tu- sangre.html](http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/2000439/Mi-sangre_-tu- sangre.html).
- [73] Herrera M. y Estrada M., (2002). Esferocitosis hereditaria: aspectos clínicos, bioquímicos y moleculares. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.*; 18(1): 7-24.
- [74] (Imagen) <http://www.ciencianews.com.br/doencaeritro/Eritrocito%20%20-%2014/Eritrocitonormal.htm>
- [75] Puszkin S., et al., (1978). Erythrocyte actin and spectrin: interaction with muscle contractile and regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*; 513: 205-220.
- [76] Luna E. y Hitt A., (1992). Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*; 258: 955-964.
- [77] An X., et al., (1996). Modulation of Band-3-Ankyrin Interaction by Protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties. *J. Biol. Chem.*; (27)52:33187-33191.
- [78] Khanna R., et al., (2002). Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. *PNAS*; 99(10): 6637-6642.
- [79] Canham P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theoret. Biol.*; 26: 61-81.
- [80] Adams K. H., (1973). A theory of the shape of the red blood cell. *Biophys. J.*; 13: 1049-1053.

- 
- [81] Pinder J. C., et al., (1977). Control of interaction of spectrin and actin by phosphorylation. *Nature*; 270: 22-29.
- [82] Harwig J. y DeSisto M., (1991). The cytoskeleton of the Resting Human Blood Platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J. Cell Biol.*; (112)3:407425.
- [83] Alloisio N., et al., (1990). The Red Cell Skeleton and its Genetic Disorders. *Molec. Aspects Med.*; 11: 161-241.
- [84] Byers T. J., D. Branton, (1985). Visualization of the protein associations in the erythrocyte-membrane skeleton. *PNAS. USA.*; 82: 6153-6157.
- [85] Tinley L. G. y Detmers P., (1975). Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin: evidence for a nonfilamentous form of these two molecules in situ. *J. Cell Biol.*; 66: 508-520.
- [86] Picart C., et al. (2000). Actin Protofilament Orientation in Deformation of the Erythrocyte Membrane Skeleton. *Biophys. J.*; 79: 2987-3000.
- [87] Li J., et al., (2005). Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte. *Biophys. J.*; 88: 3707-3719.
- [88] Zhu, Q., et al., (2007). A hybrid model for erythrocyte membrane: a single unit of protein network coupled with lipid bilayer. *Biophys. J.*; 93: 386-400.
- [89] Liu, S. C., et al., (1987). Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte-membrane skeleton. *J. Cell Biol.*; 104: 527-536.
- [90] An X. L., et al., (2002). Shear-Response of the Spectrin Dimer-Tetramer Equilibrium in the Red Blood Cell Membrane. *J. Biol Chem*; 277: 31796-31800.
- [91] Li J., et al., (2007). Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Biophysics*; 12: 4937-4942.
- [92] Hardison R. C., (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist and bacteria. *PNAS*; 93: 5675-5679.
- [93] (Imagen) <http://centros.edu.xunta.es/iesbreamo/galeria/displayimage.php?album=119&pos=2>
- [94] (Imagen) <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Alpha-D-glucopyranose-2D-skeletal.png>,  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:D-glucose-chain-2D-Fischer.png>,  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:D-glucose-chain-2D-skeletal-numbers.png>,  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Beta-D-glucopyranose-2D-skeletal.png>
- [95] (Imagen) <http://www.wikidict.de/en/toplist/es/Amino%C3%A1cidos>
- [96] (Imagen) <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/enlace%20peptidico.html>
- [97] González F., et al., (2000). La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al día internacional*; 3(2): 1-17.
- [98] Miller J. A, Gravalles E., Bunn F. H. (1980) Nonenzymatic Glycosilation of Erythrocyte Membrane Proteins. *J. Clin. Invest.* 65:896-901.
- [99] Zhang Q., et al., (2008). Proteomic profiling of nonenzymatically glycosylated proteins in human plasma and erythrocyte membranes. *J. Proteome. Res.*; 7(5): 2025-2032.

- 
- [100] Anderson D. R., et al., (1977). Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane: Involvement of spectrin, transglutaminase, and membrane-bound protease. *J. Biol. Chem.*; 252 (19): 6617-6623.
- [101] Evans, E. A., (1973). New membrane concept applied to the analysis of fluid shear and micropipette deformed red blood cells. *Biophys. J.*; 13: 941-954.
- [102] Evans E. A., (1973). A new material concept for the red cell membrane. *Biophys. J.*; 13: 926-940.
- [103] Rand R. P., (1964). Mechanical properties of the red cell membrane. II. Viscoelastic breakdown of the Membrane. *Biophys. J.*; 4: 303-316
- [104] Evans E. A. y Hochmuth, R. M., (1976). Membrane viscoplastic flow. *Biophys. J.*; 16: 13-26.
- [105] Evans E. A. y Hochmuth, R. M., (1976). Membrane Viscoelasticity. *Biophys. J.*; 16: 1-11.
- [106] Evans E. A., (1976). Constitutive relation for red cell membrane. *Biophys. J.*; 16: 597-600.
- [107] Skalak R., et al., (1973). Strain energy function of red blood cell membranes. *Biophys. J.*; 13: 245-264.
- [108] Chien S., et al., (1978). Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane. *Biophys. J.*; 24: 463-487.
- [109] Rakow A. L. y Hochmuth R. M. (1975) Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocyte membrane. *Biophys. J.*; 15: 1095-1100.
- [110] Boyum A., (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J. Clin. Lab. Invest.*; 97: 77-89.
- [111] Munteanu L. y Dinu A., (2004). Fractionation of granulocytes from whole human blood by centrifugation. *Practical hints. Romanian J. Biophys.*; 14(1-4):53-58.
- [112] Ficoll-Paque PLUS. For in vitro isolation of lymphocytes. Handbooks from Amersham Biosciences.
- [113] Linderkamp O., Meiselman H. J. (1982) Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density separated human red cells. *Blood*. 59:1121-1127.
- [114] Piagnerelli M., et al., (2007). Assesment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J. Clin. Pathol.*; 60: 549-554.
- [115] Robinson J., (2004). Flow Cytometry. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*; 630-640.
- [116] Manual part number: 11-11032-01, (2000). Introduction to flow cytometry: a learning guide. BD. Biosciences.
- [117] Chan C., et. al., (2008). Statistical mixture modeling for cell subtype identification in flow cytometry. *National Institute of Health*; 73(8): 693-701.
- [118] Rahman, M. (2006). Introduction to flow cytometry: principles, data analysis, protocols, troubleshooting. AbD Sterotec.
- [119] Yao B., et al., (2004). A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Lab. Chip.*; 4: 603-607.
- [120] Evans E. A. y La Celle P. L., (1975). Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Biophys. J.*; 45: 29-43.

- 
- [121] (Imagen) <http://www.meyerinst.com/sutter/micropipette/index.htm>.
- [122] Operation Manual P-97. Flaming brown micropipette puller. Sutter instrument company.
- [123] Jay A. W L., (1973). Viscoelastic properties of the human red blood cell membrane. I. Deformation, volume loss, and rupture of red cells in micropipettes. *Biophys. J.*; 13: 1166-1182.
- [124] (Imagen) <http://www.tritechresearch.com/ndl-forge.html>.
- [125] Rand R. P. y Burton A. C., (1964). Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophys. J.*; 4: 115-135.
- [126] Walther G., et al., (2009). Automatic clustering of flow cytometry data with density-based merging. *Advances un Bioinformatics*; 1-7.
- [127] Adak S., et al., (2008). Dynamic and electrokinetic behavior of erythrocyte membrane in diabetes mellitus and diabetic cardiovascular disease. *Bioch. Et Biophys. Acta* 1780; 108-115.
- [128] Murugan P. y Pari L., (2007). Influence of tetrahydrocurcumin on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in experimental type 2 diabetic rats. *J. Ethnopharmacology*; 113: 479-486.
- [129] Bilan P. y Klip A., (1990). Glycation of the human erythrocyte glucose transporter in vitro and its functional consequences. *Biochem. J.*; 268: 661-667.
- [130] Sutera S. P., et al., (1985). Age-related changes in deformability of human erythrocytes. *Blood*; 65 (2): 275-282.
- [131] Noji S., et al., (1987). Spin label study of erythrocyte deformability.  $Ca^{2+}$ -induced loss of deformability and the effects of stomatocytogenic reagents on the deformability loss in human erythrocytes in shear flow. *J. Biophys. Soc.*; 52: 221-227.
- [132] Turchetti V., et al., (1998). *Evaluation of erythrocyte morphology as deformability index in patients suffering from vascular diseases, with or without diabetes mellitus: correlation with blood viscosity and intra-erythrocytic calcium*. *Clin. Hemo. and Microcirc.*; 18: 141-149.
- [133] Young I., et al., (2008). Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J. Diabetes Science and Technology.*; 2 (6): 1130-1138.
- [134] Babu N. y Singh M., (2004). Influence of hyperglycemia on aggregation deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clin. Hemo. and Microcirc.*; 31: 273-280.
- [135] Ercan M., et al., (2002). The effects of cholesterol levels on hemorheological parameters in diabetic patients. *Clin. Hemo. and Microcirc.*; 26: 257-263.
- [136] Shin S., et al., (2007). Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J. of Exp. Biol.*; 45: 121-128.
- [137] Miller J., et al., (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.*; 65: 896-901.
- [138] Mokken F. Ch., et al, (1992) The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann. Hematol*; 64: 113-122.
- [139] Shin S., et al., (2007). Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type2 diabetes mellitus. *Clin. Hemo. and Microcirc.*; 36: 253-261.

- 
- [140] Vague P., et al., (2004). C-peptide, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, and Diabetes. *Experimental Diab. Res.*; 5: 37-50.
- [141] Budak Y., et al. (2004). Erythrocyte membrane anionic charge in type 2 diabetic patients with retinopathy. *BMC Ophthalmology.*; 4: 14.
- [142] Caimi G. y Lo Presti R., (2004). Techniques to evaluate erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Acta Diabetol.*; 41:99-103.
- [143] Fornal M., et al., (2006). Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin. Hemo. And Microcirc.*; 35: 273-276.
- [144] Bronkhorst G., et al., (1995). A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys. J.*; 69: 1666-1673.
- [145] Tsukada K., et al. (2001). Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high speed video camera system. *Microvasc. Res.*; (61): 231-239.
- [146] Korol A., et al., (2008). Diabetic erythrocytes test by correlation coefficient. *The Open Medical Informatics Journal*; 2: 105-111.
- [147] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>