

## EVALUACIÓN DE LA VISCOSIDAD EN DISOLUCIONES DE HEMOGLOBINA HUMANA: UNA REVISIÓN

### VISCOSITY IN HUMAN HEMOGLOBIN SOLUTIONS: A REVIEW

Néstor J. Rodríguez-de la-Cruz<sup>1,2\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8136-2710>

Claudia C. García-Cruz<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0009-0008-8186-2783>

Yamirka Alonso-Geli<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-7683-0615>

Yulianela Mengana-Torres<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8838-3784>

Manuel A. Lores-Guevara<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1949-180X>

<sup>1</sup>Escuela de Física. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Santo Domingo. Zona Universitaria, Distrito Nacional, Santo Domingo, República Dominicana

<sup>2</sup>Laboratorios de Metrología. Instituto Dominicano para la Calidad, Gazcue, República Dominicana

<sup>3</sup>Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [yulianela.torres@gmail.com](mailto:yulianela.torres@gmail.com), [yulianela.mengana@uo.edu.cu](mailto:yulianela.mengana@uo.edu.cu)

Recibido: 31 de marzo de 2025 Aprobado: 15 de junio de 2025

### RESUMEN

La viscosidad de la hemoglobina humana es un parámetro novedoso para evaluar clínicamente patologías que modifican la reología sanguínea. En este trabajo de revisión se analizan sus valores en disoluciones de concentración cercana a la intracelular y suspensiones de glóbulos rojos, así como los fundamentos teóricos y métodos experimentales utilizados en su determinación, para crear referencias útiles en el desarrollo de nuevas aplicaciones médicas o en el empleo de las existentes. Se incluyen determinaciones realizadas con viscosimetría (capilar, rotacional, “cuerpo descendente”), resonancia paramagnética electrónica (RPE) y resonancia magnética nuclear (RMN). Los métodos más adecuados para evaluar la viscosidad en disoluciones de hemoglobina son la viscosimetría (6 mPa.s, 37 °C) y la relajación magnética nuclear (11 mPa.s, 20 °C). La RPE y los restantes métodos basados en RMN estiman valores de micro-viscosidad (1,5 mPa.s-2,0 mPa.s) que pueden corregirse para obtener la viscosidad de la disolución.

**Palabras clave:** viscosidad; hemoglobina; glóbulos rojos; EPR; NMR.

### ABSTRACT

Hemoglobin (Hb) viscosity is a high-novelty parameter used for the clinical evaluation of pathologies in which the blood rheology is modified. In this revision work we analyze its values in solutions of Hb with near-intracellular concentration and in red blood cells (RBC) suspensions, as well as the theoretical basis and the experimental methods designed for its determination, to create references to be used in the development of new medical applications and during the use of the already created methodologies. Experimental evaluations, using viscometry (capillary, rotational and “falling body”), paramagnetic electronic resonance (EPR) and nuclear magnetic resonance (NMR), have been included. The most proper methods to evaluate Hb viscosity are viscometry (6 mPa. s, 37 °C) and nuclear magnetic relaxation (11 mPa. s, 20 °C). EPR and the other NMR-based methods estimate the micro-viscosity (1,5 mPa. s-2,0 mPa. s) and can be corrected to evaluate Hb viscosity.

**Keywords:** viscosity; hemoglobin; red blood cells; EPR; NMR.

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la viscosidad dinámica absoluta de la sangre total ( $\eta_{ST}$ ),<sup>(1,2)</sup> provoca efectos negativos en la hemodinámica humana,<sup>(3,4,5)</sup> incluyendo el síndrome de hiperviscosidad sanguínea,<sup>(6,7)</sup> y puede contribuir a la fisiopatología de diferentes enfermedades o condiciones clínicas como: policitemia, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple, leucemia, artritis reumatoidea, asma, accidentes vasculares encefálicos, enfermedades cardiovasculares, anemia drepanocítica (AD), diabetes mellitus, enfermedades infecciosas, embarazo, fumadores y vida en grandes alturas.<sup>(8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19)</sup> La  $\eta_{ST}$  se incrementa con el aumento del hematocrito ( $H$ ), la viscosidad dinámica absoluta del plasma sanguíneo ( $\eta_P$ ), y la agregación de los glóbulos rojos (GR); así como con la disminución de la deformabilidad celular y la temperatura; decreciendo exponencialmente con el incremento de la velocidad de corte.<sup>(20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30)</sup>

La deformabilidad celular<sup>(26)</sup> en la sangre, está determinada por la deformabilidad de los GR: los glóbulos blancos (GB) son rígidos y no deformables, debido a su núcleo y al contenido granular de su citoplasma;<sup>(31)</sup> sin embargo, como el conteo de los eritrocitos es mucho mayor que el de los GB,<sup>(31)</sup> los primeros dominan el aporte a la deformabilidad celular sanguínea.<sup>(6)</sup> Para valores de  $H > 0,50$ , la sangre se mantiene fluida gracias a la deformabilidad característica de los GR, sin ella la sangre podría ser un gel para valores de  $H = 0,70$ .<sup>(7)</sup> Es por ello, que en la AD, donde los GR son rígidos, la  $\eta_{ST}$  se incrementa a bajos valores de  $H$ , causando hipertensión arterial.<sup>(7)</sup>

La deformabilidad celular depende del tamaño y la forma de los eritrocitos, la composición de la membrana celular y la estructura de su citoesqueleto, la velocidad de eritropoyesis, la edad celular, traumas previos sufridos por la célula, la temperatura (por ejemplo, en casos de hipotermia) y de la viscosidad de la disolución de hemoglobina (Hb) intracelular ( $\eta_{Hb}$ ).<sup>(29,31)</sup> Por ello, es importante evaluar la  $\eta_{Hb}$ , ya que su incremento disminuye la deformabilidad de los GR, aumenta los valores de  $\eta_{ST}$  y deteriora el estado clínico de los pacientes o individuos con las enfermedades o condiciones mencionadas arriba.

La  $\eta_{Hb}$  ha sido estudiada, utilizando aproximaciones teóricas y métodos experimentales, basados en

viscosimetría (capilar, rotacional y de cuerpo descendente), resonancia paramagnética electrónica (RPE) y resonancia magnética nuclear (RMN).<sup>(32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45)</sup> Conocer estos resultados es imprescindible para la selección y uso de los métodos para emplear durante la evaluación clínica de un paciente o individuo, y para el desarrollo de nuevas aplicaciones médicas; sin embargo, estos resultados están dispersos en la literatura, y su análisis requiere un conocimiento especializado y experticias en el tema. Este trabajo de revisión reúne y analiza, críticamente, los reportes en la literatura relacionados con la  $\eta_{Hb}$ , incluyendo elementos teóricos y experimentales, para evaluar cuáles son los métodos más adecuados para la determinación de este parámetro físico durante aplicaciones médicas.

## DESARROLLO

### Viscosidad en las disoluciones de proteínas

Para la descripción de la viscosidad dinámica absoluta ( $\eta$ ) en disoluciones de proteínas ( $\eta_{pr}$ ) se han propuesto diversas ecuaciones empíricas y semiempíricas que describen su variación en un amplio rango de concentraciones ( $c$ ).<sup>(20,32)</sup> A partir de los valores de la viscosidad del solvente ( $\eta_0$ ) y el volumen parcial ocupado por las moléculas de proteína ( $\varphi$ ), la  $\eta_{pr}$  ha sido descrita por diversas ecuaciones:

$$\eta_{pr} = \eta_0 (1 - 1.35\varphi)^{-2.5} \quad (1)$$

$$\eta_{pr} = \eta_0 \left[ \frac{1.82\varphi^2}{(1 - 1.35\varphi)^3} \right] \quad (2)$$

$$\eta_{pr} = \eta_0 [1 + 2.5\varphi + 2.635\varphi^2 + \dots] \quad (3)$$

$$\eta_{pr} = \eta_0 [1 + 2.5\varphi] \quad (4)$$

$$\varphi = \frac{N_A Vc}{M} \quad (5)$$

donde:

$\varphi$ ,  $N_A$ : número de Avogadro.

$V$ : volumen de una de las moléculas de proteína.

$M$ : masa molecular.

valor de  $c$ : se expresa en g/L.<sup>(33)</sup>

La ecuación (3) está concebida para grandes valores de  $\varphi$  y la 4 para pequeños valores de  $\varphi$  y disoluciones extremadamente diluidas.<sup>(32)</sup> Todas estas ecuaciones consideran a las moléculas de proteína como esferas, y en el caso de la ecuación (4), conocida como

ecuación de Einstein, se desprecian las interacciones hidrodinámicas de largo rango.<sup>(32)</sup>

Sin embargo, la ecuación más empleada (ya que incluye todo el rango de valores de  $c$ ), se basa sobre la teoría desarrollada por Mooney para la viscosidad de partículas esféricas y rígidas, suspendidas en un medio continuo de viscosidad  $\eta_0$ :<sup>(20,32,33)</sup>

$$\eta_{pr} = \eta_0 \exp \left[ \frac{2,5\varphi}{1 - k\varphi} \right] \quad (6)$$

donde:

$k$ : Crowding Factor.<sup>(20,34)</sup>

El crowding factor tiene en cuenta el hecho de que en la disolución, un grupo de moléculas que ocupa un volumen parcial  $\varphi$ , obliga al resto de las moléculas a ocupar un volumen parcial  $1 - k\varphi$ . Este parámetro depende de las dimensiones de las moléculas de la disolución, y por ello solo tiene en cuenta las interacciones de primer orden. Para el caso de dilución extrema ( $\varphi$  tiende a cero), la ecuación (6) se reduce a la ecuación de Einstein.

Ross y Minton<sup>(20)</sup> modificaron (generalizaron) esta ecuación para disoluciones de Hb, cambiando el factor 2.5 por un parámetro  $\nu$ , que tiene en cuenta la desviación de la geometría esférica, e introduciendo el concepto de viscosidad intrínseca de la proteína ( $[\eta] = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$ , cuando  $c$  tiende a cero), tal que:

$$\eta_{pr} = \eta_0 \exp \left[ \frac{[\eta]c}{1 - \frac{k}{\nu}[\eta]c} \right] \quad (7)$$

Esta generalización resuelve el problema relacionado con la estimación exacta de  $\varphi$ ,<sup>(20)</sup> que se debe a la presencia de una capa de hidratación alrededor de las moléculas de proteínas y al cambio de la misma con el valor de  $c$ . Para el caso de disoluciones de Hb, se han reportado valores de  $[\eta] = 0,036$  dL/g y  $[\eta] = 0,0277$  dL/g,  $\frac{k}{\nu} = 0,4$  y  $\frac{k}{\nu} = 0,432$ ,  $\nu = 2,5 - 4,8$  (con valores más probables en el rango 3,7-3,9) y  $\nu = 3,8 \pm 0,5$ , así como,  $k = 1,48 - 1,62$ ,  $k = 1,08 - 2,07$  y  $k = 2,27 \pm 0,23$ .<sup>(20)</sup>

Endre y Kuchel<sup>(32)</sup> propusieron determinar el valor de  $\varphi$  como  $\varphi = \bar{v}c$ , donde  $\bar{v}$  es el volumen parcial específico de la proteína con un valor de  $0,7546 \frac{mL}{g}$  en el caso de la Hb,<sup>(32)</sup> para escribir la ecuación (6) de la siguiente forma:<sup>(20,33)</sup>

$$\eta_{pr} = \eta_0 \exp \left[ \frac{\nu\varphi}{1 - k\varphi} \right] \quad (8)$$

Monkos reescribió la ecuación (7) de la siguiente forma:<sup>(33)</sup>

$$\eta_{pr} = \eta_0 \exp \left[ \frac{Ac}{1 - Bc} \right] \quad (9)$$

donde:  $A = \bar{v}\nu$  y  $B = \bar{v}k$  ( $\bar{v} = \frac{N_A V}{M}$ )

Según esta experiencia, la ecuación (9) aventaja a las restantes, es decir, a las ecuaciones (1)-(8), por las siguientes razones: no es una ecuación empírica, tiene en cuenta las desviaciones de la geometría esférica para las moléculas que componen la muestra y para ajustar un conjunto de datos experimentales de  $\eta_{pr}$  versus  $c$ , no se requiere conocer los valores de  $[\eta]$ ,  $k$  o  $\nu$  como ocurre en las ecuaciones (6)-(8). Además, en el caso de la ecuación (9), este es un ajuste de más calidad al ser biparamétrico, e igualmente permite

determinar  $\frac{k}{\nu} = \frac{B}{A}$ .<sup>(33)</sup> Del análisis combinado de las ecuaciones (6) y (8), es posible observar que  $A = [\eta]$ .<sup>(33)</sup> Las ecuaciones (6)-(8) son equivalentes. De hecho, Lores Guevara y colaboradores, emplearon la ecuación (6) en 2006<sup>(34)</sup>, y la (8) en 2025<sup>(35)</sup> en trabajos similares.

Otra opción para analizar la dependencia entre la viscosidad y la concentración en disoluciones de proteínas, consiste en expandir en series de potencia las ecuaciones (8) o (9), formulaciones generalizadas de Mooney, y limitar esta expansión hasta el segundo orden, de donde puede obtenerse:<sup>(33)</sup>

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c + k_2[\eta]^3 c^2 \quad (10)$$

$$k_1 = \frac{1}{2} \left( 2 \frac{k}{\nu} + 1 \right) \quad (11)$$

$$k_2 = \frac{1}{6} \left( 6 \frac{k^2}{\nu^2} + 6 \frac{k}{\nu} + 1 \right) \quad (12)$$

donde:

$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$ : viscosidad específica.

$k_1$ : coeficiente de Huggins.

Esta formulación es estrictamente válida a bajas concentraciones.<sup>(33)</sup> En el caso de la Hb, los valores de  $k_1$  están alrededor de 0,89, lo cual coincide con lo obtenido en modelos de esferas penetrables.<sup>(33)</sup>

Si se emplea un gráfico log-log para representar la dependencia entre la  $\eta_{sp}$  y el producto  $[\eta]c$  se van a observar dos comportamientos lineales en las regiones diluida y concentrada. Van a existir dos transiciones: una entre las regiones diluida y semidiluida a una concentración  $c^*$ , y otra entre las regiones semidiluida y concentrada a una concentración  $c^{**}$ .<sup>(33)</sup>

La pendiente del comportamiento lineal en la zona diluida ( $[\eta]c < [\eta]c^*$ ) es menor que la pendiente del comportamiento lineal observado en la zona concentrada ( $[\eta]c > [\eta]c^{**}$ ).<sup>(33)</sup>

En la región semidiluida ( $[\eta]c^* < [\eta]c < [\eta]c^{**}$ ), la relación entre la viscosidad relativa ( $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$ ) y  $c$  queda establecida por la ecuación de Lefebvre.<sup>(33)</sup>

$$\ln \eta_r = 2a[\eta]c^* \left(\frac{c}{c^*}\right)^{\frac{1}{2a}} - (2a - 1)[\eta]c^* \quad (13)$$

donde:

$a$ : exponente de Mark-Houwink.<sup>(33)</sup>

Este exponente toma valores de  $a = 0$  para partículas esféricas rígidas,  $a = 0,5 - 1$  para polímeros flexibles, y  $a = 1,7$  para cilindros largos rígidos.<sup>(33)</sup> Para el caso de disoluciones acuosas de Hb, se obtienen valores de  $a = 0,3$ , lo cual indica que las moléculas de Hb se pueden considerar partículas *cuasi* esféricas rígidas, en concordancia con el modelo de Ross y Minton de 1977.

Las ecuaciones (9)-(13) pueden ser muy útiles para caracterizar una disolución de proteínas, y para el desarrollo de aplicaciones médicas concretas. A partir de las ecuaciones (10)-(13), se pueden obtener los valores de  $k_1$  y del coeficiente de Mark-Houwink, que pueden aportar datos sobre las características geométricas y estructurales de las moléculas de proteína. La ecuación (9) fue utilizada por Rodríguez de la Cruz y colaboradores,<sup>(35)</sup> para el desarrollo de un método, basado en relajación magnética protónica (RMP), para determinar  $\eta_{Hb}$ .

### Métodos experimentales utilizados para evaluar la $\eta_{Hb}$

Los valores de  $\eta_{Hb}$ , en el interior de los GR o en muestras diluidas propiamente, han sido estimados o medidos, empleando diferentes métodos experimentales.<sup>(32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45)</sup>

### Determinaciones de $\eta_{Hb}$ empleando Viscosimetría

La Viscosimetría Rotacional se ha empleado a 37 °C, para determinar  $\eta$  en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular, utilizando disoluciones salinas como solvente ( $\eta_0 = 0,7$  a  $0,8$  mPa. s), como se puede ver en la tabla 1, para obtener valores en el rango: 5,91 a 6,12 mPa.s.<sup>(20)</sup> La Viscosimetría Capilar permitió obtener valores de  $\eta = 5,55$  mPa. s (Tabla 1) en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intraeritrocitaria, a 37 °C, utilizando disolución salina como solvente ( $\eta_0 = 0,76$  mPa. s).<sup>(32)</sup> También, con Viscosimetría Capilar, empleando agua como solvente y  $T=25^\circ\text{C}$ , se han reportado valores de  $\eta=3,83$  mPa.s, para disoluciones de Hb de concentración intracelular.<sup>(33)</sup>

**Tabla 1-** Valores de  $\eta$ , determinados por Viscosimetría, en disoluciones de Hb a concentraciones cercanas a la intracelular y temperaturas de 25 °C, 37 °C y 37,5 °C, según literatura

Solvente	Método	T(°C)	c(g/L)	$\eta$	$\eta$ (mPa. s)
Agua destilada	Viscosímetro Ostwald	de37,5	250	46,1	31,9
Disolución salina isotónica, ( $\eta_0 = 0,8$ mPa.s)	Viscosímetro rotacional	37	315	7,388	5,91
Disolución salina isotónica en agua deuterada ( $\eta_0 = 0,76$ mPa.s)	Viscosímetro Ostwald	de37	318	7,311	5,55
Disolución salina ( $\eta_0 = 0,7$ mPa.s)	Modelo moléculas rígidas <i>cuasi</i> esféricas	de37	322,5	8,74	6,12
Agua ( $\eta_0 = 0,891$ mPa.s)	Viscosímetro capilar Microviscosímetro Ubbelohde	25	322,5	4,29	3,83

Se realizaron estimaciones indirectas de la  $\eta_{Hb}$  intracelular, a partir de mediciones de Viscosimetría Rotacional en muestras de sangre total y plasma:<sup>(26)</sup>

$$\frac{\eta_{ST}}{\eta_p} = \left( 1 - H \left[ \frac{\left( \frac{\eta_{Hb}}{\eta_p} + 0,4 \right)}{\left( \frac{\eta_{Hb}}{\eta_p} + 1 \right)} \right] \right)^{-2,5} \quad (14)$$

Estas estimaciones reportaron valores entre 2 mPa. s y 100 mPa. s, en dependencia de la velocidad de corte

empleada.<sup>(26)</sup> Otra opción para estimar  $\eta_{Hb}$  empleando la ecuación (14), es estimar  $\eta_{ST}$  a partir de parámetros hematológicos comúnmente determinados en los laboratorios clínicos.<sup>(12,27,28)</sup>

Los valores de  $\eta_{Hb}$  determinados experimentalmente empleando viscosimetría (Tabla 1), coinciden con los valores teóricos obtenidos, utilizando las ecuaciones de la (6)-(9). En particular; si se emplea la ecuación (9), utilizando los valores de  $A$  y  $B$  reportados por Monkos,<sup>(33)</sup> y para  $\eta_0$  los valores tabulados para el agua, se obtienen valores de  $\eta_{Hb}=5,35$  mPa.s para concentración intracelular (322,5 g/L) a 37 °C. Sin embargo, los métodos de viscosimetría son frecuentemente grandes consumidores de muestra y de tiempo de experimento; precisan de un lavado especializado del instrumento de medición entre determinaciones; en ocasiones (como el caso de la viscosimetría capilar) realizan determinaciones indirectas de  $\eta$ , y frecuentemente, la medición depende de la pericia del experimentador.<sup>(18,19,24,35,36)</sup> Estas limitaciones reducen su aplicabilidad en la medicina porque los hacen más invasivos, y limitan el número de estudios para realizar en un día de trabajo.

### Estimaciones de $\eta$ en disoluciones de Hb y en el interior de GR empleando RPE

La RPE<sup>(16,20,34,38)</sup> emplea radicales nitroxilos como sondas, para estimar el valor de  $\eta$  tanto en disoluciones de Hb, como en el interior de los GR.<sup>(16,20,32,34,38,40,41)</sup> Para ello, se calcula el tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ) de la sonda, a partir de su espectro de RPE (figura 1) de acuerdo con<sup>(20,34,36)</sup>

$$\tau_r = \Pi \Delta H_0 \left( \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right) \quad (15)$$

donde:

$\Delta H_0$  y  $h_0$ : ancho y amplitud de la línea central.

$h_{-1}$ : amplitud de la línea de alto campo.

$\Pi$ : constante que depende del tipo de radical nitroxilo empleado y sus interacciones hiperfinas y de Zeeman.

A partir del valor de  $\tau_r$  se estima el valor de  $\eta$ , empleando una curva de calibración previamente construida ( $\eta = m\tau_r + n$ ) en disoluciones de viscosidad conocida (Glicerol o sucrosa),<sup>(16,20)</sup> donde  $m$  y  $n$  son la pendiente y el intercepto, respectivamente.

Lores y colaboradores<sup>(34,36,40,41,43)</sup> reportaron valores estimados de  $\eta$  de  $2,14 \pm 0,06$  mPa.s y  $1,99 \pm 0,05$  mPa.s en muestras de hemoglobina A (HbA) y hemoglobina S (HbS), respectivamente, a concentraciones cercanas a la intracelular y a 36 °C, utilizando como sonda el 4-Maleimido-Tempo (4-MAL) asociado con el Glutation (GSH): 4-MAL-GSH (tabla 2). Endre y Kuchel sistematizaron en su trabajo de 1986<sup>(32)</sup> las estimaciones de  $\eta_{Hb}$  reportadas en muestras de GR (en condiciones de isotonicidad), a temperaturas entre 18 °C y 37 °C, empleando como sonda los radicales nitroxilos Tempamine y Maleimido asociado con GSH (Mal-5-GSH).<sup>(32)</sup> Se reportaron valores de  $\eta_{Hb}$  en el rango 2,5 mPa. s - 5 mPa. s (tabla 2).

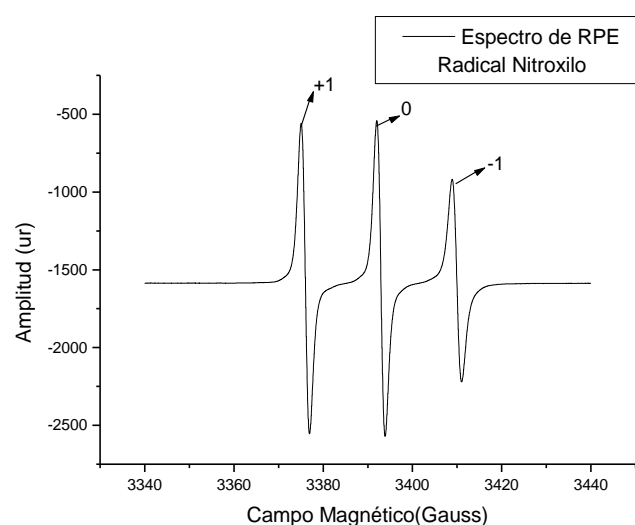


Fig. 1- Espectro del 4-MAL-GSH disuelto en HbA (concentración intraeritrocitaria) a 36 °C<sup>(29,32)</sup>

Tabla 2- Valores estimados de  $\eta$  en disoluciones de Hb (concentraciones cercanas a la intracelular) y en el interior de GR en condiciones de isotonicidad a temperaturas entre 18 °C y 37 °C

Muestra estudiada	Sonda utilizada	T(°C)	$\eta$ (mPa. s)
HbA	4-MAL-GSH	36	$2,14 \pm 0,06$
HbS	4-MAL-GSH	36	$1,99 \pm 0,05$
GR	MAL-5-GSH	37	2,5
GR	MAL-5-GSH	20	$4,45 \pm 0,16$
GR	Tempamine	18	$4,45 \pm 0,16$
GR	Tempamine	25	$4,9 \pm 1,8$
GR	Tempamine	21	3,3

Los valores de  $\eta_{Hb}$  obtenidos empleando RPE (tabla 2), subestiman los valores obtenidos empleando viscosimetría (capilar, rotacional y de cuerpo descendente (tabla 1), así como los valores teóricos obtenidos empleando las ecuaciones de la (6) a la (9), lo cual está relacionado con el pequeño tamaño de las sondas empleadas (radicales nitroxilos) y su capacidad limitada a la estimación de la microviscosidad o viscosidad en su entorno inmediato.<sup>(32)</sup> Lores-Guevara y colaboradores<sup>(34)</sup> demostraron en 2006, que el empleo de una sonda de mayor tamaño (Carbonmonoxihemoglobina+4-Maleimido-Tempo) puede solucionar este inconveniente, obteniendo valores de  $\eta_{Hb} \sim 5$  mPa.s para la HbA y HbS de concentración cercana a la intracelular a 36 °C. Además, el equipamiento de RPE necesario para estas determinaciones es significativamente costoso, y su precio se encuentra en el rango del precio de los equipos médicos muy caros.

### Estimaciones de $\eta_{Hb}$ obtenidas a partir de los valores del tiempo de relajación magnética protónica longitudinal ( $T_1$ ) del $^{13}\text{C}$ , perteneciente a moléculas fisiológicas disueltas en el interior de los GR

La estimación de  $\eta_{Hb}$  en suspensiones de GR y disoluciones de concentración intracelular (lisados), se realiza a partir de la determinación del valor de  $T_1$  de núcleos de  $^{13}\text{C}$ , pertenecientes a moléculas fisiológicas, como la glicina y el GSH marcado con Glicina, que se encuentran disueltas en el interior de los eritrocitos.<sup>(32,36,43,44)</sup>

Para tener estas moléculas en el interior de los GR, estos son apropiadamente incubados con moléculas de Glicina, las cuales difunden al interior de las células marcando el 50 % del GSH intracelular y permaneciendo libre un por ciento mayoritario de ellas.<sup>(32,44)</sup> Se obtiene el espectro de RMN correspondiente al  $^{13}\text{C}$  en suspensiones de eritrocitos o en lisados, y se trabaja con el pico perteneciente a la Glicina o con el del GSH marcado con Glicina. Es más común trabajar con el pico de la Glicina, pues al ser de mayor amplitud (mayor concentración molecular), requiere experimentos menos consumidores de tiempo (menos promediaciones). Empleando la secuencia de pulsos de Radiofrecuencias (RF) conocida como Inversión por Recuperación,<sup>(36,38,42,46)</sup> se determina experimentalmente el valor de  $T_1$ , y se calcula el valor

del  $\tau_r$  (Glicina o Glicina + GSH), según la siguiente ecuación:<sup>(44)</sup>

$$\frac{1}{T_1} = \frac{N\hbar^2\gamma_H^2\gamma_C^2}{r^6}\tau_r \quad (16)$$

donde:

N: número de protones directamente enlazados al núcleo de  $^{13}\text{C}$  en las moléculas de Glicina o Glicina-GSH.

$\hbar$ : constante de Dirac (constante de Planck dividida por  $2\pi$ ).

$\gamma_H$  y  $\gamma_C$ : razones giromagnéticas del protón y el carbono 13, respectivamente.

$r = 0,109$  nm: distancia entre los núcleos de carbono y los protones interactuantes.<sup>(44)</sup>

Con este valor de  $\tau_r$ , se obtiene el valor estimado de  $\eta_{Hb}$  con el método de RMN, utilizando el conocido modelo de Debye:<sup>(32,44)</sup>

$$\eta = \tau_r \frac{3kT}{4\pi r_0^3} \quad (17)$$

donde:

$k$ : constante de Boltzman.

$T$ : temperatura absoluta en kelvin.

$r_0$ : radio de la molécula de Glicina o Glicina-GSH.

Esta ecuación es válida si se considera geometría esférica, y puede variar si cambia la geometría de las moléculas fisiológicas empleadas;<sup>(32)</sup> sin embargo, la geometría esférica es la más empleada.<sup>(32,44)</sup>

Para determinar los valores del parámetro geométrico  $r_0$ , las moléculas de Glicina o Glicina-GSH son disueltas en una disolución extremadamente diluida (disolución salina, de BSA o glicerol), y se procede a medir la  $\eta$ , utilizando Viscosimetría (un viscosímetro de Ostwald generalmente) y el  $T_1$ . Con el valor de  $T_1$  se calcula  $\tau_r$  empleando la ecuación (16) y, con los valores de  $\tau_r$  y de  $\eta$ , se determinan los valores de  $r_0$  utilizando la ecuación (17), es decir, 0,18 nm para la Glicina y 0,29 nm para la Glicina-GSH.<sup>(32,44)</sup>

Con este método se obtienen valores estimados de  $\eta_{Hb}$ , que son aproximadamente dos veces los valores de  $\eta$  del agua pura a la temperatura correspondiente (tabla 3); por ejemplo:  $1,43 \pm 0,23$  mPa. s y  $1,36 \pm 0,04$  mPa. s, empleando Glicina-GSH y Glicina como sondas, respectivamente;<sup>(44)</sup> así como, 1,41 mPa. s empleando Glicina (352 g/L de concentración intracelular de la Hb),<sup>(32)</sup> todos determinados a 37 °C. También fue posible estimar valores de  $\eta_{Hb}$  de  $1,83 \pm$

0,46 mPa. s, empleando Glicina-GSH y  $1,70 \pm 0,05$  mPa. s, empleando Glicina en lisados a 37 °C.<sup>(44)</sup>

**Tabla 3-** Valores estimados de  $\eta$  determinados a partir del  $T_1$  del  $^{13}\text{C}$  en lisados y en el interior de GR, en condiciones de isotonicidad, a 37 °C

Medio	Sonda	T(°C)	$\eta$ (mPa. s)
GR	Glicina	37	$1,36 \pm 0,04$
GR	Glicina-GSH	37	$1,43 \pm 0,23$
lisados	Glicina	37	$1,70 \pm 0,05$
lisados	Glicina-GSH	37	$1,83 \pm 0,46$
GR	Glicina	37	1,41

Los valores de  $\eta_{Hb}$  obtenidos a partir de los valores de  $T_1$  de núcleos de  $^{13}\text{C}$  de moléculas fisiológicas disueltas en el citoplasma de los GR (tabla 3), subestiman los resultados experimentales obtenidos utilizando viscosimetría (capilar, rotacional y de cuerpo descendente, según tabla 1) y los valores teóricos obtenidos empleando las ecuaciones de la (6) a la (9). Al igual que en el caso de la RPE, se considera que este desempeño negativo se debe al tamaño de la sonda empleada (Glicina y Glicina-GSH).<sup>(32)</sup> Además, el método utilizado es experimentalmente complejo, consumidor de tiempo y precisa de equipamiento (espectrómetro de RMN) caro para su realización.

### Estimaciones de la $\eta_{Hb}$ obtenidas a partir de los experimentos de dispersión en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular

Los comportamientos de la velocidad de relajación magnética protónica longitudinal ( $R_1 = \frac{1}{T_1}$ ) en función de la frecuencia de resonancia ( $f_0 = \frac{\gamma_H B_0}{2\pi}$ ,  $B_0$ : campo magnético externo constante aplicado) permiten obtener el valor de  $\tau_r$  de las macromoléculas en disoluciones de proteínas.<sup>(36,42,43,46)</sup> Para ello, se ajustan los comportamientos experimentales como el observado en la figura 2, empleando determinadas y convenientes funciones matemáticas,<sup>(36,42,43,46)</sup> de las cuales la más usada fue desarrollada por Hallenga y Koenig en 1976, y se conoce comúnmente, como función Cole-Cole:<sup>(42,46)</sup>

$$R_1(\omega_0) = R_{1w}^{bulk} + D + \frac{A \left( 1 + \left( \frac{\omega_0}{2\pi\nu_c} \right)^2 \cos\left(\frac{\pi\epsilon}{4}\right) \right)}{1 + 2 \left( \frac{\omega_0}{2\pi\nu_c} \right)^2 \cos\left(\frac{\pi\epsilon}{4}\right) + \left( \frac{\omega_0}{2\pi\nu_c} \right)^4} \quad (18)$$

$$\tau_r = \frac{\sqrt{3}}{6\pi\nu_c} \quad (19)$$

donde:

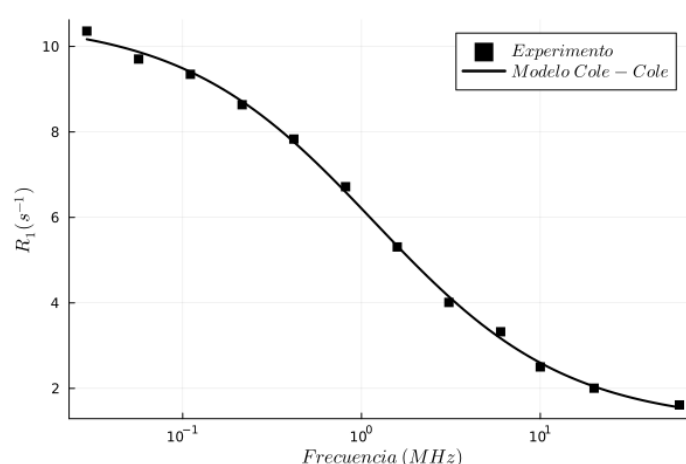
$R_{1w}^{bulk}$ : velocidad de relajación magnética longitudinal de los protones del agua libre (no enlazada) en la disolución.

A, D,  $\epsilon$  y  $\nu_c$ : parámetros que se obtienen a partir del ajuste.

Los valores estimados de  $\eta_{Hb}$  se obtienen a partir de  $\tau_r$ , empleando la ecuación (17), siendo  $r_0$  el radio de la molécula de proteína (aproximadamente  $3,2 \cdot 10^{-9}$  m para la Hb). En trabajos recientes<sup>(42,43)</sup> de este grupo de investigación, se determinaron los valores de  $\tau_r$  para moléculas de Hb humana, en disoluciones de concentración cercana a la intracelular y a 37 °C. Los valores de viscosidad estimados en estas muestras, a partir de estos valores de  $\tau_r$  y utilizando la ecuación (17), se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4-** Valores de  $\tau_r$  y  $\eta_{Hb}$  estimados en muestras de disolución de Hb de concentración intracelular utilizando la dispersión de  $1/T_1$  en función de la frecuencia de resonancia

Muestra	$\tau_r$ ( $10^{-8}$ s)	$\eta_{Hb}$ (mPa. s)
HbA	6,01	1,87
HbA	4,10	1,28
HbA	6,73	2,10
HbA	4,34	1,35
HbA	4,10	1,28
HbA	4,11	1,28
HbA	6,37	1,99
HbS	3,57	1,11
HbS	3,84	1,20
Valor Medio	4,80	1,50
Desviación Estándar	1,21	0,39



**Fig. 2-** Estudios del comportamiento de la velocidad de relajación magnética protónica longitudinal en función de la frecuencia de resonancia en disoluciones de HbA y HbS de concentración cercana a la intracelular y a 37 °C

**Leyenda:** El ajuste se realizó con el conocido método Cole-Cole.

Los valores de  $\eta_{Hb}$ , obtenidos a partir de los estudios de dispersión de la relajación magnética protónica longitudinal (tabla 4), subestiman los resultados experimentales obtenidos utilizando viscosimetría (capilar, rotacional y de cuerpo descendente, según la tabla 1), y los valores teóricos obtenidos empleando las ecuaciones de la (6) a la (9). Esto puede explicarse, porque las ecuaciones empleadas para el ajuste de los estudios de dispersión, son heurísticas, y no están respaldadas por la teoría de la relajación magnética protónica.<sup>(42)</sup> Lores-Guevara y colaboradores, recientemente dieron la sugerencia del empleo de otros modelos de ajuste, que se basan completamente en la teoría de la relajación magnética protónica, y que acercan los valores de  $\eta_{Hb}$  a los determinados, empleando viscosimetría, o mediante el uso de modelos teóricos de acuerdo con las ecuaciones (6)-(9).<sup>(42)</sup> Además, el método empleado precisa de equipamiento (relajómetro de campo ciclado) caro para su implementación.

### Estimaciones de $\eta_{Hb}$ obtenidas a partir de los experimentos de determinación del coeficiente de difusión traslacional del agua en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular

La relación entre la  $\eta$  de la disolución de proteínas y el coeficiente de difusión traslacional ( $D$ ) de las moléculas de agua en esta disolución está dada por la siguiente ecuación:<sup>(32)</sup>

$$\eta = \frac{kT}{6\pi Dr_0} \quad (20)$$

donde:

$r_0 = 1,4 \cdot 10^{-10}$  m: radio de la molécula de agua.<sup>(35)</sup>

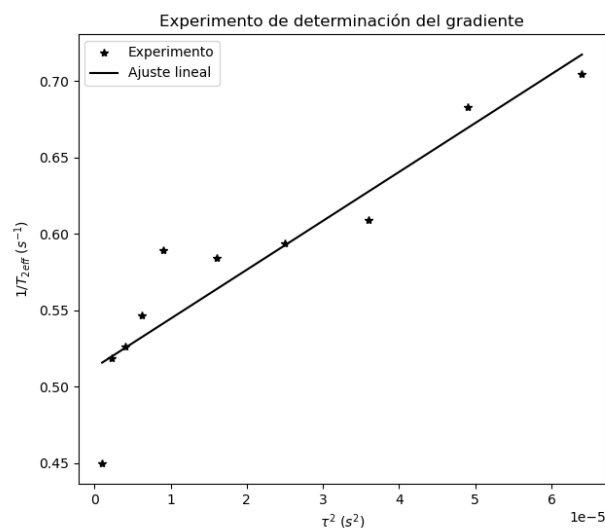
Para determinar a  $D$ , se emplea la secuencia de pulsos de RF de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)<sup>(35,36,37,38,39,42)</sup> en un experimento de relajación magnética protónica, diseñado para medir el tiempo de relajación magnética protónica transversal efectivo ( $T_{2eff}$ ), que no es más que el valor del tiempo de relajación magnética protónica transversal real ( $T_2$ ), afectado por la difusión del agua en un gradiente de campo magnético ( $G$ ):

$$\frac{1}{T_{2eff}} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma_H^2 G^2 D \tau^2}{3} \quad (21)$$

donde:

$\tau$ : separación entre los pulsos de RF de  $90^\circ$  y  $180^\circ$  en la secuencia CPMG.

A continuación, se grafica la dependencia experimental entre  $1/T_{2eff}$  y  $\tau^2$  (figura 3), y se implementa un ajuste lineal, donde la pendiente ( $m = \frac{\gamma_H^2 G^2 D}{3}$ ) permite el cálculo de  $D$  y el intercepto la estimación del valor de  $T_2$ . Estimaciones preliminares de  $\eta$  realizadas en el laboratorio, a  $T = 293$  K, en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular, permitieron obtener valores en el entorno de  $D = 0,83 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  y  $\eta_{Hb} = 1,64 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ .



**Fig. 3-** Determinación experimental del coeficiente de difusión traslacional del agua en una muestra de Hb de concentración 267 g/L a una temperatura de 293 K

Los valores de  $\eta_{Hb}$ , obtenidos a partir del coeficiente de difusión traslacional del agua, subestiman los resultados experimentales obtenidos utilizando viscosimetría (capilar, rotacional y de cuerpo descendente, tabla 1) y los valores teóricos obtenidos empleando las ecuaciones de la 6 a la 9.

### Estimaciones de $\eta_{Hb}$ obtenidas a partir de los valores experimentales de $T_2$

Lores-Guevara y colaboradores desarrollaron métodos, basados sobre la relajación magnética protónica para la determinación de  $\eta$  en disoluciones de proteínas.<sup>(18,19,35,36,37,39,43)</sup> En los mismos, se construyen curvas de calibración a partir de gráficos de la velocidad de relajación magnética protónica transversal ( $1/T_2$ ) en función de  $\eta$ , las cuales son empleadas en las determinaciones de  $\eta_p$ <sup>(18,37,45)</sup>,  $\eta_{Hb}$ <sup>(35,37,45)</sup> y la viscosidad dinámica absoluta del suero sanguíneo ( $\eta_s$ ).<sup>(19)</sup> En el caso de la  $\eta_{Hb}$ , se obtienen valores de  $11 \pm 2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  y  $17 \pm 7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  en muestras de Hb de concentración intracelular a  $20^\circ \text{C}$ , para

individuos aparentemente sanos y pacientes con drepanocitosis, respectivamente. Estos valores de  $\eta_{Hb}$  coinciden con los obtenidos teóricamente, empleando las ecuaciones (6) a la (9), para estas condiciones experimentales, y con las determinaciones experimentales realizadas utilizando un viscosímetro capilar de Ostwald.<sup>(35)</sup> Este método resuelve las limitaciones descritas en este trabajo para los métodos de viscosimetría, fundamentado aplicando la teoría de la relajación magnética protónica; emplea equipamiento tecnológico, cuyo costo es igual o inferior a equipos de rutina en el diagnóstico médico.<sup>(35)</sup> Por ello se recomienda este método, como el más adecuado para determinar la  $\eta_{Hb}$  y como una aplicación médica concreta.

### Estimaciones de $\eta_{Hb}$ obtenidas a partir del empleo de métodos microreológicos

Las técnicas microreológicas<sup>(29)</sup> son muy útiles en el estudio de medios biológicos, por el pequeño volumen de muestra que emplean (alrededor de 1 mL).<sup>(47-51)</sup> Briole y colaboradores<sup>(29)</sup> utilizaron en 2021 un arreglo experimental, en el cual se emplean partículas de poliestireno de 0,994  $\mu\text{m}$  de diámetro, que son disueltas en la muestra en estudio (Hb en este caso), de forma que ocupen menos del 1 % del volumen total, para posteriormente colocar dicha muestra en un microscopio de campo de brillo invertido (objetivo de inmersión en aceite, magnificación 100x, NA 1.3, profundidad del campo alrededor de 200  $\mu\text{m}$ ) que tiene acoplada una cámara rápida sCMOS. A esta instalación se acopla un software, que permite grabar durante 20 s el movimiento browniano de estas partículas a una velocidad de 100 Hz, y calcular parámetros que permiten determinar su coeficiente de difusión.

A partir de aquí, se emplea el modelo de Debye para evaluar  $\eta_{Hb}$ . Los valores de  $\eta_{Hb}$  obtenidos están en el rango entre 3,5 mPa. s y 20 mPa. s para concentraciones entre 25,5 g/dL y 38,5 g/dL, y temperaturas en el intervalo 15 a 42,5 °C. Estos valores coinciden con los determinados experimentalmente empleando viscosimetría (tabla 1), teniendo en cuenta las condiciones experimentales, y con las estimaciones teóricas realizadas empleando las ecuaciones de la (6) a la (9). Sin embargo, son métodos tecnológicamente complejos desde el punto de vista del equipamiento utilizado y de su implementación práctica, lo cual reduce sus posibilidades actuales de aplicación en la medicina.

## DISCUSIÓN

Puede apreciarse una concordancia entre los valores de  $\eta$  determinados en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular, a 37 °C, empleando viscosimetría rotacional<sup>(20)</sup> y capilar.<sup>(32)</sup> Es discordante el resultado obtenido por el profesor J. W. Harris en su conocido trabajo de 1950, donde empleando agua destilada como solvente,  $T = 37,5$  °C y  $c = 250$  g/L; reporta 39,1 mPa. s.<sup>(20)</sup>

En la determinación de  $\eta_{Hb}$  empleando viscosimetría, fue mucho más frecuente el uso de las viscosimetrías capilar y rotacional, que el empleo de la viscosimetría de cuerpo descendente (ver tabla 1). La viscosimetría de cuerpo descendente fue empleada frecuentemente para determinar  $\eta_{sp}$ ; como es el caso de los trabajos realizados por Allison ( $\eta_{sp} > 12,5$ ) en muestras de HbS oxigenadas (164 g/L, Buffer Fosfato Salino como solvente, pH = 7,35 y 37 °C) y por Malfa y Steinhart ( $\eta_{sp} \approx 0,8$ ) en muestras de HbS desoxigenadas (17,6 %, Buffer Fosfato Salino como solvente, pH = 7,5 y 37 °C) antes de la polimerización de la HbS.<sup>(20)</sup>

La presencia del agua en el solvente, incrementa ligeramente los valores de  $\eta_0$  desde el rango 0,7 mPa. s - 0,8 mPa. s hasta 0,891 mPa. s, y los valores de  $\frac{k}{v}$  desde 0,4 hasta 0,432, cuando  $T$  varía desde 37 °C hasta 25 °C. Sin embargo, provoca también el ligero decremento de los valores de  $[\eta]$  desde 0,036 dL/g hasta 0,0277 dL/g.<sup>(20, 32)</sup> Esto explica la disminución del valor de  $\eta$  desde 6,12 mPa. s a 37 °C hasta 3,83 mPa. s a 25 °C si se asume un efecto dominante de  $[\eta]$  en la ecuación (7).

Las estimaciones indirectas de  $\eta_{Hb}$ , a partir de las determinaciones experimentales de  $\eta_{ST}$  y  $\eta_p$ , muestran una dependencia con los valores de  $H$ ,<sup>(26)</sup> que no se corresponde con las ecuaciones de la (6) a la (9). Esto puede solucionarse, sustituyendo  $H$  por  $I_c$  en la ecuación (14), donde  $I$  es un coeficiente de inmovilización del fluido continuo.<sup>(26)</sup>

Por otro lado, en esta ecuación, la constante 2.5 no debe ser aplicada a discos bicóncavos (como es el caso de los GR), y existen dificultades teóricas para tener en cuenta las interacciones mutuas que afectan el flujo alrededor de cada célula y en el interior de estas.<sup>(26)</sup> Además, estas estimaciones tienen la desventaja, de no poder diferenciar las contribuciones a la  $\eta_{ST}$  correspondientes a la  $\eta_{Hb}$  y a la rigidez de la membrana celular.<sup>(32)</sup>

Las estimaciones de  $\eta$  realizadas con RPE en disoluciones de Hb<sup>(16,34)</sup> y en el interior de los GR<sup>(32)</sup>, empleando como sonda el Maleimido asociado al GSH y T= 36 °C -37 °C, son bastante cercanas. Por otro lado; las estimaciones de  $\eta$  realizadas en el interior de los GR, empleando Tempamine como sonda y T= 18-25 °C<sup>(32)</sup>, son estadísticamente coincidentes. Solo es discordante (relativamente baja) la estimación de  $\eta$  realizada en el interior de los GR, empleando Tempamine como sonda y T = 21°C.

Sin embargo, las estimaciones de  $\eta_{Hb}$  realizadas utilizando Maleimido asociado a GSH como sonda a T = 36 - 37 °C,<sup>(16,32,34)</sup> son menores que las determinaciones realizadas con viscosimetría.<sup>(20)</sup> Las estimaciones realizadas empleando Tempamine como sonda y T = 18 - 25 °C, aparentemente coinciden con las realizadas a 25 °C con viscosimetría,<sup>(33)</sup> sin embargo, debe considerarse que estas últimas emplearon agua como solvente, a diferencia de la disolución salina natural presente en el interior de los GR, lo cual provoca una disminución de  $\eta$  debido al decremento en  $[\eta]$ , analizado previamente.

Las estimaciones de  $\eta_{Hb}$  realizadas con RPE, empleando radicales nitroxilos como sonda,<sup>(16,32,34)</sup> se ven afectadas por algunos problemas experimentales: algunas sondas se particionan dentro de la membrana celular,<sup>(20,32)</sup> o restringen su movimiento (incrementan  $\tau_r$ ) en “Fantasmas” de eritrocitos, indicando probable asociación a la cara interna de la membrana.<sup>(32)</sup> Por otro lado, la señal de RPE de los radicales nitroxilos ubicados en el medio extracelular, debe ser eliminada mediante la adición a la muestra de sustancias paramagnéticas no fisiológicas altamente concentradas,<sup>(20)</sup> siendo también los propios radicales nitroxilos sustancias no fisiológicas.<sup>(32)</sup> Un problema adicional es, que las calibraciones que se utilizan para estimar  $\eta$  a partir del valor de  $\tau_r$ , se hacen empleando disoluciones de glicerol o sucrosa,<sup>(16,32,34)</sup> lo cual es incorrecto, ya que estas disoluciones son diferentes de la disolución en estudio.<sup>(32)</sup>

Es posible corregir con acierto, para concentraciones intracelulares, los valores de  $\eta_{Hb}$  obtenidos a partir de la relajación magnética longitudinal del  $^{13}\text{C}$ <sup>(32,44)</sup> para acercar los resultados a los determinados con viscosimetría.<sup>(32)</sup> Para ello, se hacen estudios de  $\eta$  en función de  $c$  utilizando viscosimetría ( $\eta = \eta_B$ ) y el método de RMN ( $\eta = \eta_n$ ), y se determinan los valores de  $\nu$  y  $k$ , ajustando los comportamientos experimentales ( $\eta$  en función de  $c$ ) a la ecuación (8) en cada caso ( $\nu_B$  y  $k_B$  para la viscosimetría,  $\nu_n$  y  $k_n$  para la RMN). Los valores corregidos pueden

obtenerse a partir de los estimados por RMN de la siguiente forma:<sup>(32)</sup>

$$\eta_B = (\eta_n)^\phi \quad (22)$$

$$\phi = \frac{\nu_B}{[\nu_n + \ln(\eta_n)[k_n - k_B]]} \quad (23)$$

Los valores de  $\eta$  estimados empleando el experimento de dispersión de RMN ( $1/T_1$  versus frecuencia de resonancia), en disoluciones de Hb de concentración cercana a la intracelular y a 37 °C, coinciden (o son bastante cercanos) con los estimados utilizando los métodos de RMN del  $^{13}\text{C}$ <sup>(32,44)</sup> y la evaluación de  $D$ , así como con los valores determinados empleando el método de RPE, que utiliza Maleimido asociado a GSH como sonda.<sup>(16,32,34)</sup> Sin embargo, estos valores son menores que las determinaciones realizadas empleando viscosimetría, y que las estimaciones teóricas como la mostrada en la tabla 1, o las realizadas empleando las ecuaciones de la (6) a la (9). En células intactas de plantas y animales, las mediciones basadas en RMN del  $\tau_r$  de las macromoléculas (a partir del experimento de dispersión) y el  $D$  de las moléculas de agua intracelular, indicaron que la viscosidad intracelular es solo alrededor de dos veces la viscosidad del agua pura a la temperatura correspondiente.<sup>(44)</sup> Estos resultados coinciden con los reportados en este trabajo.

El primer caso (estudios de dispersión) fue criticado porque las determinaciones de  $\tau_r$  van a estar dominadas, por el aporte a la relajación magnética protónica de los protones de una pequeña fracción de moléculas de agua irrotacionalmente enlazadas a las macromoléculas del medio intracelular.<sup>(16,32)</sup> Sin embargo, según esta opinión, este hecho garantiza precisamente que  $\tau_r$  se corresponda con el tiempo de correlación rotacional de la macromolécula, y pueda ser relacionado con la  $\eta$  del medio intracelular a través del modelo de Debye.<sup>(32,35)</sup> Por otro lado, las estimaciones de  $\eta$  intracelular basadas en la restricción del movimiento del agua (valores de  $D$ ), son controversiales debido al debate sobre la cantidad de agua vecinal en células intactas, así como, la cuestión del acceso de toda el agua celular a iones y pequeñas moléculas.<sup>(20)</sup>

Debido al pequeño tamaño de las sondas utilizadas (radicales nitroxilos, Glicina, Glicina-GSH), las estimaciones de  $\eta$  realizadas con los métodos de Resonancia Magnética (RPE y RMN basada en el  $T_1$

del  $^{13}\text{C}$ ), coinciden con la viscosidad de la disolución a bajas concentraciones, pero difieren marcadamente para altas concentraciones.<sup>(32)</sup> Por este mismo motivo, los valores estimados se corresponden con el entorno cercano de la sonda, y no con la  $\eta$  de la disolución, donde dicha sonda se encuentra disuelta (la cual generalmente se determina empleando viscosimetría), y por ello se conocen como valores de microviscosidad.<sup>(32,44)</sup>

Los valores de  $\eta_{Hb}$  determinados a partir de la medición de  $T_2$  <sup>(35,36,37,39)</sup> coinciden con los determinados en la literatura, empleando viscosimetría<sup>(20,33)</sup> y técnicas microreológicas.<sup>(47)</sup> También coinciden con estimaciones teóricas como la mostrada en la tabla 1, o las realizadas empleando las ecuaciones de la (6) a la (9). Además, este método resuelve las limitaciones propias de la viscosimetría como: los excesivos valores del volumen de muestra y/o el tiempo de experimento, la necesidad de lavar el instrumento entre determinaciones, la evaluación indirecta de  $\eta$  y la dependencia de la habilidad del experimentador. Por ello, se recomienda este método para la determinación de  $\eta_{Hb}$  durante procedimientos médicos, al considerar que minimiza la invasividad y maximiza el número de casos para estudiar en un día de trabajo. Las evaluaciones de  $\eta_{Hb}$  son de mucha utilidad para determinar  $\eta_{ST}$  <sup>(1,3,4,5,8,9,11,21,30,45)</sup> y para evaluar el cociente  $\eta_{Hb}/\eta_P$  en muestras de sangre total, el cual permite evaluar los perfiles dinámicos del movimiento de los GR en el flujo sanguíneo.<sup>(29,45,46,47,48,49,50,51)</sup>

## CONCLUSIONES

La viscosidad dinámica absoluta en disoluciones de hemoglobina se rige por el modelo generalizado de Mooney, y su dependencia con la concentración ha permitido establecer varios parámetros como el factor de forma, el crowding factor, el coeficiente de Huggings y el exponente de Mark-Houwink, que permiten evaluar la forma, las dimensiones y la penetrabilidad de las macromoléculas. Los métodos experimentales más adecuados para determinar la viscosidad de la hemoglobina son los de viscosimetría (capilar y rotacional) y el método basado en relajación magnética protónica transversal, los cuales reportan valores de 6 mPa. s a 37 °C y 11 mPa. s a 20 °C, respectivamente, ya que ambos coinciden estadísticamente en sus determinaciones y concuerdan con las estimaciones teóricas basadas en las ecuaciones generalizadas de Mooney. El método

basado en relajación magnética protónica transversal, es el más adecuado para aplicaciones médicas porque resuelve las limitaciones tecnológicas de la viscosimetría y su costo se encuentra en el rango de los equipos médicos relativamente baratos. Los métodos alternativos (basados en RPE y RMN) permiten estimar valores menores (1,5 mPa. s - 2 mPa. s) relacionados con el entorno más cercano de la sonda empleada y no con la disolución. Es posible corregir los valores estimados por los métodos alternativos (al menos los estimados con el  $T_1$  del  $^{13}\text{C}$ ) para obtener los valores de viscosidad de la disolución.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los diferentes centros a los que pertenecen y sus respectivas universidades y organismos que financian y brindan sus infraestructuras, para el desarrollo de este trabajo. De igual forma, desean plasmar su gratitud al FNRS del Reino de Bélgica, por su apoyo a la consecución de las mediciones de dispersión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valerio-de arruda, M. *et al.* "Etandarization for obtaining blood viscosity: a systematic review", *European Journal of Hematology*. 2021, **106**(5), 597-605. ISSN: 0902-4441 <https://doi.org/10.1111/ejh.13594>
2. Huamaní, C. *et al.* "Importancia de la medición de la viscosidad sanguínea: retos y limitaciones", *Acta Médica del Peru*. 2023, **40**(2), 161-166. ISSN: 1728-5917 <http://dx.doi.org/10.35663/amp.2023.402.2398>
3. Abbasian, M. *et al.* "Effects of different non-newtonian models on unsteady blood flow hemodynamics in patient-specific arterial models with in-vivo validation", *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2020, **186**, 105-185. ISSN: 1872-7565 <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105185>
4. Popel, A. S.; Johnson, P. C. "Microcirculation and hemorrheology", *Annu. Rev. Fluid. Mech.* 2005, **37**, 43-69. ISSN: 0066-4189 <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933>
5. Ciancaglini, C. "Hidrodinamia de la circulación vascular periférica normal y patológica", *Revista Costarricense de Cardiología*. 2004, **6**(2), 43-61. ISSN: 1409-4142.
6. Blanco-Santos, Y.; Areces-López, A.; Gámez-Pérez, A. "Síndrome de hiperviscosidad:

características fisiopatológicas y clínicas”, *Revista Científico Estudiantil de la Universidad de Ciencias Médicas de la Habana*. 2020, **59**(278), e840. ISSN: 1729-6935.

7. Gertz, M. A. “Acute hyperviscosity: síndromes and management”, *Blood*. 2018, **132**(13), 1379-1385. ISSN: 0006-4971 <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-46816>

8. Celik, T. *et al.* “Whole blood viscosity and cardiovascular diseases: a forgotten old player of the game”, *Medical Principles and Practice*. 2016, **25**(5), 499-500. ISSN: 1011-7571 <https://doi.org/10.1159/000446916>

9. Cekirdekci, E. I.; Bugan, B. “Whole blood viscosity in microvascular angina and coronary artery disease: significance and utility”, *Rev. Port. Cardiol.* 2020, **39**(1), 17-23. ISSN: 2174-2049 <https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.04.008>

10. Furukawa, K. *et al.* “Increased blood viscosity in ischemic stroke patients with small artery occlusion measured by an electromagnetic spinning sphere viscometer”, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2016, **25**(11), 2762-2769. ISSN: 1052-3057 <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.031>

11. Song, S. H. *et al.* “Elevated blood viscosity is associated with cerebral small vessel disease in patients with acute ischemic stroke”, *BMC Neurol.* 2017, **17**(1), 20. ISSN: 1471-2377 <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0808-3>

12. Huamaní, C. *et al.* “Prediction of blood viscosity based on usual hematological parameters in a clinically healthy population living in a high-altitude city”, *High Alt. Med. Biol.* 2021, **23**(1), 78-84. ISSN: 1557-8682 <https://doi.org/10.1089/ham.2021.0165>

13. Sloop, G. *et al.* “The role of blood viscosity in infectious diseases”, *Cureus*. 2020, **12**(2), e7090. ISSN: 2168-8184 <https://doi.org/10.7759/cureus.7090>

14. Chen, G. *et al.* “Regulation of blood viscosity in disease prevention and treatment”, *Chin. Sci. Bull.* 2012, **57**, 1946-1952. ISSN: 0023-074X <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5165-4>

15. Jiehui, S. *et al.* “Blood viscosity in subjects with type 2 Diabetes Mellitus: roles of hyperglycemia and elevated plasma fibrinogen”, *Front. Physiol.* 2022, **13**, 827428. ISSN: 1664-042X <https://doi.org/10.3389/phys.2022.827428>

16. Kucukal, E. *et al.* “Whole blood viscosity and red blood cell adhesion: potential biomarkers for targeted and curative therapies in sickle cell disease”, *Am. J.*

*Hematol.* 2020, **95**(11), 1246-1256. ISSN: 1096-8652 <https://doi.org/10.1002/ajh.25933>

17. Ajayi, O. I.; Famodu, A. A.; Oviasu, E. “Fibrinogen concentration: a marker of cardiovascular disorders in nigerians”, *Turk. J. Haematol.* 2007, **24**(1), 18-22. ISSN: 1308-5263.

18. Lores-Guevara, M. A. *et al.* “Plasma dynamic viscosity determined by NMR”, *Applied Magnetic Resonance*. 2018, **49**(10), 1075-1083. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1026>

19. Mengana-Torres, Y. *et al.* “Dynamic viscosity of blood serum determined using proton magnetic relaxation”, *Applied Magnetic Resonance*. 2024, **55**(5), 527-536. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-024-01644-0>

20. Szabó, E.; Baka, E. Z.; Tamás, K. “Shear rate induced viscosity change of human blood samples and blood mimicking fluids”, *Acta of bioengineering and biomechanics*. 2024, **26**(1), 99-107. ISSN: 1509-409X <https://doi.org/10.37190/abb-02405-2024-03>

21. Malomuzh N. P. *et al.* “Characteristic changes in the density and shear viscosity of human blood plasma with varying protein concentration”. *Ukrainian Journal of Physics*. 2020, **2**, 151. ISSN: 4372-400X <https://doi.org/10.15407/ujpe65.2.151>

22. Nader, E. *et al.* “Blood rheology: key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise”, *Frontiers in physiology*. 2019, **10**, 1329. ISSN: 1664-042X <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01329>

23. Trejo-Soto, C.; Hernández-Machado, A.; Mussi, V. “Normalization of blood viscosity according to the hematocrit and the shear rate”, *Micromachines (Basel)*. 2022, **13**(3), 357. ISSN: 2072-666X. <https://doi.org/10.3390/mi13030357>

24. Rosencranz, R.; Bogen, S. A. “Clinical laboratory measurement of serum, plasma and blood viscosity”, *Pathology Patterns Reviews*. 2006, **125**(Suppl 1), S78-S86. ISSN: 1542-2305 <https://doi.org/10.1309/FFF7U8RRPK26VAPY>

25. Hund, S. J.; Kameneva, M. V.; Antaki, J. F. “A quasi-mechanical mathematical representation for blood viscosity”, *Fluids*. 2017, **2**(1), 10. ISSN: 2311-5521 <https://doi.org/10.3390/fluids2010010>

26. Sirs, J. A. “Erythrocyte Flexibility and Whole-blood Viscosity”. In: Lowe, G.D.O.; Barbenel, J.C.; Forbes, C.D. (eds). *Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability*. London: Springer, 1981. ISBN: 9781447131052, [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3105-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3105-2_2)

27. Carallo, I. C. *et al.* "The effect of HDL cholesterol on blood and plasma viscosity in healthy subjects", *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2013, **55**(2), 223-229. ISSN: 1386-0291 <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1624>
28. Carallo, I. C. *et al.* "Influence of blood lipids on plasma and blood viscosity", *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2014, **57**(3), 267-274. ISSN: 1386-0291 <https://doi.org/10.3233/CH-131705>
29. Briole, A.; Podgorski, T.; Abou, B. "Molecular rotors as intracellular probes of red blood cell stiffness", *Soft Matter*. 2021, **17**, 4525. ISSN: 1744-683X <https://doi.org/10.1039/d1sm00321f.hal-03169249v2>
30. Mehri, R.; Mavriplis, C.; Fenech, M. "Red blood cell aggregates and their effect on non-newtonian blood viscosity at low hematocrit in a two-fluid low shear rate microfluidic system", *Plos One*. 2018, **3**(7), e0199911. ISSN: 1932-6203 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199911>
31. Glenn, A.; Catherine, E.; Armonstrong, E. "Physiology of red and white blood cells", *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2019, **20**(3), 170-174. ISSN: 1472-0299 <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.01.001>
32. Endre, Z. H.; Kuchel, P. W. "Viscosity of concentrated solutions and of human erythrocyte cytoplasm determined from NMR measurement of molecular correlation times. The dependence of viscosity on cell volume", *Biophysical Chemistry*. 1986, **24**, 337-356. ISSN: 1873-4200 [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(86\)85039-6](https://doi.org/10.1016/0301-4622(86)85039-6)
33. Monkos, K. "Viscometric study of human, bovine, equine and ovine haemoglobin in aqueous solution", *International journal of biological macromolecules*. 1994, **16**(1), 31-35. ISSN: 0141-8130 [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90008-6)
34. Lores-Guevara, M. A. *et al.* "EPR study of the hemoglobin rotational correlation time and microviscosity during the polymerization of hemoglobin S", *Applied Magnetic Resonance*. 2006, **30**(1), 121-128. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/BF03166986>
35. Rodríguez-de la Cruz, N. J. *et al.* "Dynamic viscosity of hemoglobin solutions determined by transverse proton magnetic relaxation", *Hemoglobin*. 2025, **49**(3), 172-177. ISSN: 0363-0269 <https://doi.org/10.1080/03630269.2025.2493949>
36. Lores-Guevara, M. A. *Aplicaciones médicas de la Relajación Magnética Nuclear*. 1<sup>era</sup> Edición. Santiago de Cuba: Ediciones Universidad de Oriente, 2023. ISBN: 978-959-207-731-7
37. Mengana-Torres, Y. *et al.* "Determination of dynamic viscosity in samples of blood plasma and hemoglobin solution using nuclear magnetic resonance", *International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology*. 2019, **4**(2), 25-30. ISSN: 2575-5889 <https://doi.org/10.116480.11648/ijbbmb.20190402.12>
38. Cabal-MIRABAL, C. *et al.* "Assessment of contribution of curie-spin mechanism in proton relaxation during aggregation process of hemoglobin S", *Applied Magnetic Resonance*. 2020, **51** (12), 1647-1652. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-020-01241-x>
39. Mengana-Torres, Y. *et al.* "Procedimiento experimental para determinar la viscosidad dinámica utilizando la velocidad de relajación protónica", *Revista Cubana de Química*. 2024, **36**(3). e-ISSN: 2224-5421.
40. Cabal-Mirabal, C. A. *et al.* "Kinetics studies of complex biomedical process by magnetic resonance. cuban experiences", *Applied Magnetic Resonance*. 2018, **49**(6), 589-598. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-018-0985-2>
41. Lores- Guevara, M. A.; García-Naranjo, J. C.; Cabal-Mirabal, C. A. "MR relaxation studies of hemoglobin aggregation process in sickle cell disease: application for diagnostics and therapeutics", *Applied Magnetic Resonance*. 2019, **50**(4), 541-551. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1104-0>
42. Lores-Guevara, M. A. *et al.* "Proton MRD profile analysis in intracellular hemoglobin solutions: a three sites exchange model approach", *Applied Magnetic Resonance*. 2022, **53**, 387-399. ISSN: 1613-7507 <https://doi.org/10.1007/s00723-021-01452-w>
43. Lores-Guevara, M. A. *et al.* "Estudio de la anemia drepanocítica empleando resonancia magnética: potenciales aplicaciones médicas", *An. Acad. Cienc. Cuba*. 2025, **15**(1), e2896. ISSN: 2304-0106 <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/2896>
44. Endre, Z. H.; Chapman, B. E.; Kuchel, P. W. "Intra-erythrocyte microviscosity and diffusion of specifically labelled [glycyl-alpha-<sup>13</sup>C] glutathione by using <sup>13</sup>C NMR", *Biochemical Journal*. 1983, **216**(3), 655-660. ISSN: 0264-6021 <https://doi.org/10.1042/bj2160655>
45. Lores-Guevara, M. A. *et al.* "Nuevo método para determinar la viscosidad en plasma sanguíneo y

solución de hemoglobina”, *Rev. Cubana Hematol. Lnmunol. Hemoter.* 2018, **33**(S1). ISSN: 1561-2996 <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/artcle/ve/w/652>

46. Buniak K. “Fast field cycling relaxometry: application of hemoglobin solutions using the Three Tau Model”. Master Thesis Dissertation on Medical Physics. University of Surrey, 2024.

47. Menzel, F. *et al.* “Communication versus waterproofing: the physics of insect cuticular hydrocarbons”, *The Journal of experimental biology.* 2019, **222**, jeb210807. ISSN: 0022-0949 <https://doi.org/10.1242/jeb.210807>

48. Mauer, J. *et al.* “Flow-induced transitions of red blood cell shapes under shear”, *Phys. Rev. Lett.* 2018,

**121**, 118103. ISSN: 1079-7114 <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.121.118103>

49. Minetti, C. *et al.* “Dynamics of a large population of red blood cells under shear flow”, *Journal of Fluid Mechanics.* 2019, **864**, 408-448. ISSN: 0022-1120 <https://doi.org/10.1017/jfm.2019.42>

50. Losserand, S.; Coupier, G.; Podgorski, T. “Migration velocity of red blood cells in microchannels”, *Microvascular research.* 2019, **124**, 30-36. ISSN: 0026-2862 <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.02.003>

51. Shen, Z. *et al.* “Inversion of hematocrit partition at microfluidic bifurcations”, *Microvascular research.* 2016, **105**, 40-46. ISSN: 0026-2862 <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.12.009>

## DECLARACIÓN CONFLICTO DE INTERESES

Los autores expresan que no hay conflictos de intereses en el manuscrito presentado

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

**Manuel Arsenio Lores Guevara:** revisión de la literatura. Análisis crítico, escritura del borrador del manuscrito.

**Néstor Juan Rodríguez de la Cruz:** revisión y actualización de la literatura. Análisis crítico, corrección del manuscrito.

**Claudia Camila García Cruz:** revisión y corrección del manuscrito.

**Yamirka Alonso Geli:** revisión del manuscrito.

**Yulianela Mengana Torres:** revisión y corrección del manuscrito.