

## **Hematologia i microreologia eritrocitària després d'una prova d'esforç màxim**

## **Hematología y microrreología eritrocitaria tras una prueba de esfuerzo máximo**

---

Calvo, M.\*; Peinado, V. I.\*\*; Viscor G.\*\*

\* Centre d'Estudis de l'Alt Rendiment Esportiu. Direcció General de l'Esport, Generalitat de Catalunya.

\*\* Unitat de Fisiologia, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia

---

---

### **RESUM**

S'han estudiat algunes variables hematològiques i el comportament microreològic eritrocitari en un grup d'homes sans abans i després de ser sotmesos a una prova d'esforç màxim. Es detectà una hemoconcentració significativa (Hc: 42,8 → 45,9; Hb: 15,4 → 16,5; Osm<sub>plasma</sub>: 304,5 → 322,5), y una acidificació (pH: 7,394 → 7,197; Lactat: 2,1 → 10,0) sanguínia després de l'esforç. Malgrat l'augment d'osmolalitat plasmàtica, de la qual caldria esperar que induís un descens en el volum eritrocitari, no es van detectar alteracions en aquest paràmetre (VCM: 81,5 → 83,4). Es trobà una lleugera variació en la corba de fragilitat osmòtica dels eritròcits, indicant una menor resistència (major hemòlisi) després de la realització de la prova d'esforç. No es detectaren diferències en la deformabilitat eritrocitària. La modificació en la resistència osmòtica eritrocitària es pot interpretar com una resposta adaptativa cel·lular a la variació patida per l'osmolalitat del medi intern durant l'exercici (causada probablement per pèrdues hídriques). La variació en la tensió màxima suportable per la membrana de l'eritròcit no sembla que sigui suficient per comprometre la deformabilitat eritrocitària i, per tant, la capacitat d'aquestes cèl·lules per perfondre adequadament els teixits amb una demanda elevada d'oxigen.

#### **Paraules clau**

Exercici, hemoreologia, hemoconcentració, deformabilitat eritrocitària, fragilitat osmòtica eritrocitària.

---

---

### **RESUMEN**

Se han estudiado algunas variables hematológicas y el comportamiento microrreológico eritrocitario en un grupo de varones sanos antes y después de ser sometidos a una prueba de esfuerzo máximo. Se detectó una significativa hemoconcentración (Hc: 42,8 → 45,9; Hb: 15,4 → 16,5; Osm<sub>plasma</sub>: 304,5 → 322,5), y una acidificación (pH: 7,394 → 7,197; Lactato: 2,1 → 10,0) sanguínea tras el esfuerzo. A pesar del aumento de osmolalidad plasmática, que cabría esperar indujese un descenso en el volumen eritrocitario, no se detectaron alteraciones en este parámetro (VCM: 81,5 → 83,4). Se halló una ligera variación en la curva de fragilidad osmótica de los eritrocitos, indicando una menor resistencia (mayor hemólisis) tras la realización de la prueba de esfuerzo. No se detectaron diferencias en la deformabilidad eritrocitaria. La modificación en la resistencia osmótica eritrocitaria puede interpretarse como una respuesta adaptativa celular a la variación sufrida por la osmolalidad del medio interno durante el ejercicio (debida probablemente a pérdidas hídricas). La variación en la tensión máxima soportable por la membrana del eritrocito no parece ser suficiente para comprometer la deformabilidad eritrocitaria y, por tanto, la capacidad de estas células para perfundir adecuadamente los tejidos con elevada demanda de oxígeno.

#### **Palabras clave**

Ejercicio, hemorreología, hemoconcentración, deformabilidad eritrocitaria, fragilidad osmótica eritrocitaria.

---

## Introducció

Es considera el sistema càrdio-vascular com a factor limitant essencial del rendiment físic, almenys pel que fa a l'exercici a nivell aeròbic, ja que determina el cabdal sanguini i, consegüentment, la capacitat d'aportació d'oxigen als teixits.

El flux sanguini és determinant per dues variables regulables fisiològicament: la despesa cardíaca i la resistència perifèrica. La primera d'elles està sotmesa, fonamentalment, al control neuroendocrí del treball desenvolupat per la bomba cardíaca, mentre que la segona respon a mecanismes de regulació reflexa, generalitzada o local, del diàmetre dels vasos sanguinis. Però no tan solament la geometria dels vasos intervé en les alteracions en el flux sanguini sinó que el comportament reològic de la sang també té una importància cabdal. La viscositat sanguínia ve determinada per diversos factors com la concentració i la composició proteica del plasma, l'hematòcrit i la deformabilitat i l'agregabilitat eritrocitària (Cokelet, 1980; Chien, 1981).

Actualment es qüestiona si la realització d'exercici físic pot induir canvis en la viscositat sanguínia i si això pot comprometre o limitar d'alguna manera l'aportació d'oxigen als teixits perifèrics.

Nombrosos treballs (Martin et al., 1985; Maughan et al., 1985; Vandewalle et al., 1988) relacionen la pèrdua hídrica, causa de l'increment consegüent de l'hematòcrit i l'osmolaritat plasmàtica, amb un augment de la viscositat sanguínia després de la realització d'exercici físic. Altres estudis, tanmateix, no troben modificació en aquests paràmetres (Reinhart et al., 1983, 1989). L'estudi de la deformabilitat eritrocitària ha aportat dades contradictòries ja que, mentre que en alguns casos s'ha descrit una disminució després de la pràctica d'exercici físic (Reinhart et al., 1983), en altres no s'han pogut detectar alteracions significatives (Vandewalle et al., 1988).

Atès que la deformabilitat eritrocitària es troba íntimament relacionada amb la capacitat de distensió de la membrana de l'hemàtia, els assaigs de resistència osmòtica proporcionen informació addicional sobre la funcionalitat i el comportament microreològic dels eritròcits. Robertson et al., (1988) trobaren una correlació entre fragilitat osmòtica eritrocitària i la fracció envellida de la població eritrocitària després d'una cursa de llarga distància.

L'interès de l'estudi de la microreologia eritrocitària es basa en la hipòtesi que l'exercici físic podria induir tant la mobilització de poblacions immadures d'hematies (amb una menor deformabilitat i, consegüentment, més fràgils), com accelerar el segrestament de les de més edat en la circulació esplènica o induir la seva hemòlisi per acció mecànica. En qualsevol cas, el resultat seria la modificació cap a un acerb eritrocitari amb un comportament reològic diferent a les poblacions normals. Creiem que aquests fenòmens, implicats en l'hemòlisi intravascular, han

## Introducción

Se considera al sistema cardiovascular como factor limitante esencial del rendimiento físico, al menos en lo relativo al ejercicio a nivel aeróbico, puesto que determina el caudal sanguíneo y por consiguiente la capacidad de aporte de oxígeno a los tejidos.

El flujo sanguíneo está determinado por dos variables regulables fisiológicamente: el gasto cardíaco y la resistencia periférica. La primera de ellas está sometida, fundamentalmente, al control neuroendocrino del trabajo desarrollado por la bomba cardíaca mientras que la segunda responde a mecanismos de regulación refleja, generalizada o local, del diámetro de los vasos sanguíneos. Pero no tan sólo la geometría de los vasos interviene en las alteraciones en el flujo sanguíneo sino que también el comportamiento reológico de la sangre tiene una importancia capital. La viscosidad sanguínea viene determinada por diversos factores como la concentración y composición proteica del plasma, el hematocrito y la deformabilidad y agregabilidad eritrocitaria (Cokelet, 1980; Chien, 1981).

En la actualidad se cuestiona si la realización de ejercicio físico puede inducir cambios en la viscosidad sanguínea y si esto puede poner en compromiso o limitar de algún modo el aporte de oxígeno a los tejidos periféricos.

Numerosos trabajos (Martin et al., 1985; Maughan et al., 1985; Vandewalle et al., 1988) relacionan la pérdida hídrica, causa del consiguiente incremento del hematocrito y de la osmolaridad plasmática, con un aumento de la viscosidad sanguínea tras la realización de ejercicio físico. Otros estudios, sin embargo, no hallan modificación en tales parámetros (Reinhart et al., 1983, 1989). El estudio de la deformabilidad eritrocitaria ha aportado datos contradictorios, pues mientras que en algunos casos se ha descrito una disminución tras la práctica de ejercicio físico (Reinhart et al., 1983), en otros no han podido detectarse alteraciones significativas (Vandewalle et al., 1988).

Dado que la deformabilidad eritrocitaria se halla íntimamente relacionada con la capacidad de distensión de la membrana del hemátie, los ensayos de resistencia osmótica proporcionan información adicional sobre la funcionalidad y el comportamiento microreológico de los eritrocitos. Robertson et al. (1988) hallaron una correlación entre fragilidad osmótica eritrocitaria y la fracción envejecida de la población eritrocitaria tras una carrera de larga distancia.

El interés del estudio de la microreología eritrocitaria se basa en la hipótesis de que el ejercicio físico podría tanto inducir la movilización de poblaciones inmaduras de hematies (con una menor deformabilidad y consiguientemente más frágiles), como acelerar el secuestro de las de mayor edad en la circulación esplènica o inducir su hemólisis

**Tabla 1. Características físicas y antropométricas del grupo estudiado**

	Edad (años)	Talla (cm)	Peso corporal (kg)	Horas de actividad física semanal
Media	31.8	176.3	80.0	4.0
Error estándar	3.5	2.4	1.3	0.7

de ser considerats en l'estudi de l'"anèmia de l'esportista" juntament amb altres mecanismes que ja han estat assenyalats com a factors etiològics d'aquesta entitat: disminució dels dipòsits de ferro, expansió del volum plasmàtic o descens en la producció d'eritropoietina.

Fins ara els estudis hemoreològics realitzats es basen en proves físiques de durada llarga i mitjana i, sovint, durant el desenvolupament d'una competició on la realització de l'exercici es troba sumada a la fatiga que li és pròpia. És difícil, a més, realitzar un control precís de balanç hidrosalí en aquestes circumstàncies.

L'objectiu d'aquest estudi consisteix a determinar si hi ha canvis en els valors hematològics bàsics i el comportament microreològic de l'hematia després de la realització d'una prova escalonada màxima d'esforç.

## Material y métodos

L'estudi fou realitzat en quatre homes sans amb un nivell d'activitat física mitjana de 4h/setmana. Els individus realitzaren una prova màxima d'esforç triangular sobre cinta ergomètrica (Jaeger).

Després d'un escalfament inicial de 4 minuts, a velocitat de 8 Km/h i pendent del 2,5%, s'incrementà la velocitat 2 Km/h cada minut. Hom donà la prova per finalitzada quan els subjectes arribaren a l'extenuació (entenenent com a tal el moment en què han estat incapaços de continuar la cursa a la càrrega de treball imposada).

Es realitzà un control electrocardiogràfic abans, durant i després de la realització de la prova i una anàlisi de gasos respiratoris cada 30 segons mitjançant un ergoanalitzador Oxycon 4 (Mijnhardt)

por acción mecánica. En cualquier caso, el resultado sería la modificación hacia un acerbo eritrocitario con un comportamiento reológico diferente a las poblaciones normales. Creemos que estos fenómenos, implicados en la hemólisis intravascular, deben ser considerados en el estudio de la "anemia del deportista", junto a otros mecanismos que ya han sido señalados como factores etiológicos de esta entidad: disminución de los depósitos de hierro, expansión del volumen plasmático o descenso en la producción de eritropoyetina.

Hasta el presente, los estudios hemorreológicos realizados se basan en pruebas físicas de larga y media duración y, con frecuencia, durante el desarrollo de una competición donde la realización del ejercicio se halla sumada al estrés propio de la misma. Es difícil, además, realizar un control preciso del balance hidrosalino en tales circunstancias.

El objetivo del presente estudio consiste en determinar si existen cambios en los valores hematológicos básicos y en el comportamiento microrreológico del hematite tras la realización de una prueba de esfuerzo escalonada máxima.

## Material y métodos

El estudio fue realizado en 4 varones sanos con nivel de actividad física medio de 4h/semana. Los sujetos realizaron una prueba de esfuerzo triangular máxima sobre cinta ergométrica (Jaeger).

Tras un calentamiento inicial de 4 minutos, a velocidad de 8 Km/h y pendiente del 2,5%, se incrementó la velocidad 2 Km/h cada minuto. La prueba se dio por finalizada cuando los sujetos alcanzaron la extenuación (entendiendo como tal

**Tabla 2. Parámetros ventilatorios, frecuencia cardíaca y rendimiento en la prueba**

	$\dot{V}O_{2\text{máx}}$ (mL/kg/min)	$f_{C\text{máx}}$ (lat/min)	$\dot{V}E_{\text{máx}}$ (L/min)	$f_{R\text{máx}}$ (ciclos/min)	$R_{\text{máx}}$	$vel_{\text{máx}}$ (km/h)	tdp (min)
Media	54.72	189.2	129.6	51.25	1.11	17.0	7.98
Error estándar	3.23	11.9	7.5	3.0	0.03	1.0	0.47

Tabla 3. Valores hematológicos

	PRE		POST
Recuento hematíes ( $\cdot 10^6$ )	5.25 $\pm$ 0.15	*	5.51 $\pm$ 0.10
Hemoglobina (g/dL)	15.38 $\pm$ 0.40	**	16.46 $\pm$ 0.27
Hematocrito (%)	42.75 $\pm$ 1.14	**	45.88 $\pm$ 0.89
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	81.45 $\pm$ 1.29	NS	83.36 $\pm$ 1.49
HCM (pg)	29.29 $\pm$ 0.38	NS	29.89 $\pm$ 0.34
CHCM (%)	35.99 $\pm$ 0.54	NS	35.88 $\pm$ 0.38
Osmolalidad plasma (mOsm/kg)	304.5 $\pm$ 4.5	**	322.5 $\pm$ 1.9
Lactato (mmol/L)	1.48 $\pm$ 0.21	**	10.02 $\pm$ 0.34
pH (sangre venosa)	7.402 $\pm$ 0.016	**	7.197 $\pm$ 0.015

NS: Diferencias no significativas, \*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$

amb analitzador paramagnètic d'oxigen (Servomex) i analitzador de captador de raigs infraroigs per a l'anhídric carbònic (Mijnhardt). Les condicions ambientals, temperatura, humitat relativa i pressió baromètrica, foren determinades i l'analitzador de gasos fou calibrat, amb mostres de gasos de concentracions conegudes, prèviament a la realització de cada prova.

Les mostres de sang (2 ml) foren obtingudes per punció venosa, amb els subjectes asseguts, 5 minuts abans i immediatament després de la realització de la prova. La sang extreta es mantingué en tubs amb EDTA-K en bany de gel immediatament fins el seu processament. Així mateix, s'obtingué mostres de 20  $\mu\text{l}$  de sang capil·lar arterialitzada del lòbul del pavelló auricular per a l'anàlisi de lactat (mitjançant capil·lars amb heparina, fluorur i nitrit). Totes les determinacions hemàtiques foren portades a terme abans de transcórrer 60 minuts des de l'extracció de la mostra.

Foren portades a terme les següents determinacions hematològiques: recompte eritrocitari (Coulter Counter ZF), hematòcrit (micromètode), hemoglobina (mètode espectrofotomètric de Drabkin, 1935), càlcul dels índexs hematimètrics, osmolaritat plasmàtica (microosmòmetre crioscòpic Advanced 2MO), pH sanguini (Radiometer BMS3 Mk2) i lactat (micromètode electroenzimàtic, Analox P-LM<sub>4</sub>).

La deformabilitat eritrocitària fou assajada pel mètode de microfiltració de suspensions d'eritròcits a través de membranes de policarbonat. Un volum de 50  $\mu\text{L}$  de la mostra de sang fou diluïda en 10 mL de medi de suspensió (123mM NaCl, 4mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM glucosa, 20 mM HEPES, 0,25% BSA i ajustat a pH=7.4) prèviament filtrat (Millipore 0,48  $\mu\text{m}$ ) amb la finalitat d'eliminar la interferència de partícules en l'assaig de filtració. El dispositiu de microfiltració era constituït per un portafiltres (Nuclepore PTO13) ajustat a una xeringa de 2 mL. Les membranes (Nuclepore 110412) utilitzades presentaven porus de format homogeni

el moment en que han sido incapaces de continuar la carrera a la carga de trabajo impuesta).

Se realizó un control electrocardiográfico antes, durante y tras la realización de la prueba y análisis de gases respiratorios cada 30 segundos mediante un ergoanalizador Oxycon 4 (Mijnhardt) con analizador paramagnético de oxígeno (Servomex) y analizador de captación de rayos infrarrojos para el anhídrido carbónico (Mijnhardt). Las condiciones ambientales, temperatura, humedad relativa y presión barométrica, fueron determinadas y el analizador de gases fue calibrado, con muestras de gases de concentraciones conocidas, previamente a la realización de cada prueba.

Las muestras de sangre (2 ml) fueron obtenidas por punción venosa, con los sujetos sentados, 5 minutos antes e inmediatamente después de la realización de la prueba. La sangre extraída se mantuvo en tubos con EDTA-K en baño de hielo inmediatamente hasta su procesamiento. Así mismo, se obtuvieron muestras de 20  $\mu\text{l}$  de sangre capilar arterializada del lóbulo del pabellón auricular para el análisis del lactato (mediante capilares con heparina, fluoruro y nitrito). Todas las determinaciones hemáticas se llevaron a cabo antes de transcurridos 60 minutos desde la extracción de la muestra.

Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones hematológicas: recuento eritrocitario (Coulter Counter ZF), hematocrito (micrométodo), hemoglobina (método espectrofotométrico de Drabkin, 1935), cálculo de los índices hematimétricos, osmolaridad plasmática (microosmómetro crioscópico Advanced 3MO), pH sanguíneo (Radiometer BMS3 Mk2) y lactato (micrométodo electroenzimático, Analox P-LM<sub>4</sub>).

La deformabilidad eritrocitaria se ensayó por el método de microfiltración de suspensiones de eritrocitos a través de membranas de policarbonato. Un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de sangre se diluyó en 10 mL de medio de suspensión (123mM NaCl, 4mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 6mM glucosa, 20 mM HEPES, 0,25% BSA y ajustado a pH=7.4) previamente filtrado (Millipore 0,48  $\mu\text{m}$ ) con el fin de eliminar la interferencia de partículas en el ensayo de filtración. El dispositivo de microfiltración estaba constituido por un portafiltros (Nuclepore PTO13) ajustado a una jeringa de 2mL. Las membranas (Nuclepore 110412) utilizadas presentaban poros de tamaño homogéneo con 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se utilizó un gradiente de presión positiva de filtración de 5 cmH<sub>2</sub>O y para valorar el flujo de filtración se cronometró el tiempo transcurrido para la filtración del volumen (0,2 mL) determinado entre dos señales en la jeringa. Se realizaron dos controles de paso del medio de suspensión, libre de partículas, a través de cada membrana antes de la filtración de la muestra que garantizaron la estricta calibración del dispositivo de filtración.

En la clínica, debido a la falta de estandarización de los ensayos de microfiltración eritrocitaria, po-

amb 3 µm de diàmetre. S'utilitzà un gradient de pressió positiva de filtració de 5 cmH<sub>2</sub>O i, per valorar el flux de filtració, es cronometrà el temps transcorregut per a la filtració del volum (0,2 mL) determinat entre dos senyals en la xeringa. Foren realitzats dos controls de pas del mitjà de suspensió, lliure de partícules, a través de cada membrana abans de la filtració de la mostra que garantiren l'estricta calibració del dispositiu de filtració.

En la clínica, a causa de la manca d'estandardització dels assaigs de microfiltració eritrocitària, poques vegades les dades de diversos laboratoris es poden fer comparables. A més, acostumen a utilitzar-se diversos índexs per expressar la deformabilitat eritrocitària. En aquest estudi hem calculat les tres formes d'expressió de la deformabilitat o filtrabilitat eritrocitària utilitzats més extensament:

1. L'índex directe de filtrabilitat (ID) recomanat per Chien (1977), calculat com a quocient entre el temps (Ts) de pas de la suspensió d'eritròcits i temps (Tm) de pas de la solució de suspensió lliure de partícules (ID=Ts/Tm).

2. L'índex de rigidesa de Hanss (1983), el qual té en compte les diferències en concentració de cèl·lules de cada assaig en funció de l'hematòcrit (Hc) de la mostra de sang i del factor de dilució (Fd) a la qual se l'ha sotmès, i s'expressa com:

$$IR = \frac{T_s - T_m}{T_m H_c F_d}$$

3. El temps mitjà de pas de les cèl·lules a través d'un porus de la membrana (T<sub>cp</sub>) segons Kikuchi (1983)

$$T = \frac{\frac{1+h}{V_p a} (T_{cp} - \frac{a+l}{V_p})}{AdS}$$

on

V<sub>p</sub>: velocitat de la columna de mitjà de suspensió que travessa un porus; aquesta pot ser estimada mitjançant el temps de pas de la suspensió lliure de cèl·lules (V<sub>p</sub>=T<sub>m</sub>/AdS); a: longitud que ocupa una hematia mentre travessa el porus; es pot calcular també (a=MCV/S) en funció del volum cel·lular (MCV) i de l'àrea de la secció transversal d'aquesta (S). Reordenant l'equació podem expressar-la de la manera següent:

on

$$T_{cp} = \left[ \left( T_s - \frac{1}{T_m} \right) \frac{MCV}{S h} + \left( \frac{MCV}{S} + l \right) \frac{1}{T_m} \right] \frac{1}{AdS}$$

MCV: volum corpuscular mitjà, S: superfície de la secció transversal del porus (S=7 µm<sup>2</sup>), h: concentració real de cèl·lules segons l'hematòcrit i la

cas veces pueden hacerse comparables los datos de diversos laboratorios. Además suelen utilizarse diversos índices para expresar la deformabilidad eritrocitaria. En este estudio hemos calculado las tres formas de expresión de la deformabilidad o filtrabilidad eritrocitaria más extensamente utilizados:

1. El índice de filtrabilidad directo (ID) recomendado por Chien (1977), calculado como cociente entre el tiempo (Ts) de paso de la suspensión de eritrocitos y tiempo (Tm) de paso de la solución de suspensión libre de partículas (ID=Ts/Tm).

2. El índice de rigidez de Hanss (1983), el cual tiene en cuenta las diferencias en concentración de células de cada ensayo en función del hematocrito (Hc) de la muestra de sangre y del factor de dilución (Fd) a la que se ha sometido, y se expresa como:

$$IR = \frac{T_s - T_m}{T_m H_c F_d}$$

3. El tiempo medio de paso de las células a través de un poro de la membrana (T<sub>cp</sub>) según Kikuchi (1983)

$$T = \frac{\frac{1+h}{V_p a} (T_{cp} - \frac{a+l}{V_p})}{AdS}$$

donde

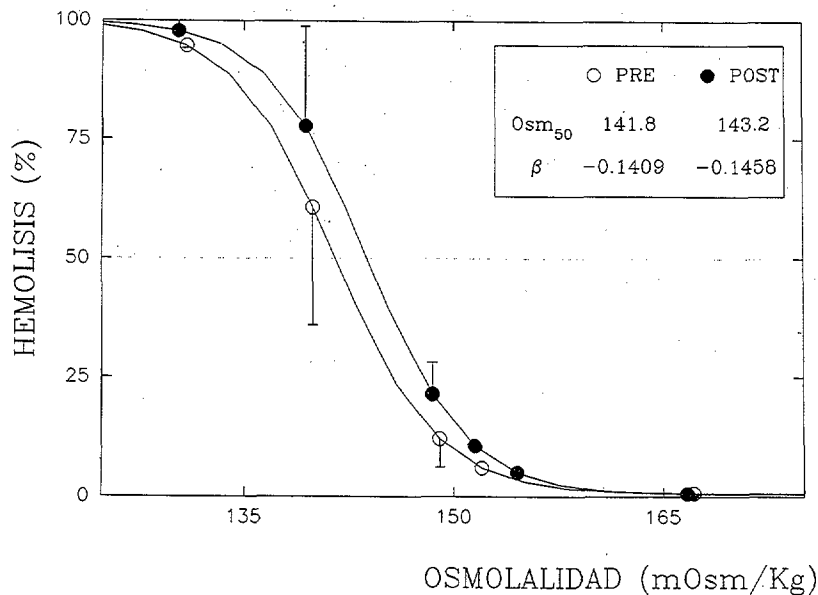
V<sub>p</sub>: velocidad de la columna de medio de suspensión que atraviesa un poro, ésta puede estimarse mediante el tiempo de paso de la suspensión libre de células (V<sub>p</sub> = T<sub>m</sub>/AdS); a: longitud que ocupa un hematíe mientras atraviesa el poro, puede calcularse también (a = MCV/S) en función del volumen celular (MCV) y del área de la sección transversal del mismo (S). Reordenando la ecuación podemos expresarla del siguiente modo

donde

$$T_{cp} = \left[ \left( T_s - \frac{1}{T_m} \right) \frac{MCV}{S h} + \left( \frac{MCV}{S} + l \right) \frac{1}{T_m} \right] \frac{1}{AdS}$$

MCV: volumen corpuscular medio, S: superficie de la sección transversal del poro (S=7 µm<sup>2</sup>), h: concentración real de células según el hematocrito y la dilución sufrida por la muestra de sangre (h=Hc·Fd), l: longitud del poro (l=10 µm), A: área útil de filtración de la membrana (A=0,8 cm<sup>2</sup>), d: densidad de poros en la membrana (d=1,4·10<sup>7</sup> poros/cm<sup>2</sup>).

La fragilidad osmótica eritrocitaria se estudió por medio de la incubación de 25 µL de sangre en 3 mL de un banco de soluciones salinas tamponadas con concentraciones decrecientes (Viscor & Palomeque, 1982). Estas soluciones se prepararon



dilució patida per la mostra de sang ( $h=Hc \cdot Fd$ ),  $l$ : longitud del porus ( $l=10 \mu m$ ),  $A$ : àrea útil de filtració de la membrana ( $A=0,8 \text{ cm}^2$ ),  $d$ : densitat de porus en la membrana ( $d=1,4 \cdot 10^6 \text{ porus/cm}^2$ ).

La fragilitat osmòtica eritrocitària fou estudiada per mitjà de la incubació de 25  $\mu L$  de sang en 3 mL d'un banc de solucions salines tamponades amb concentracions decreixents (Viscor & Palomeque, 1982). Aquestes solucions foren preparades totes a partir d'una solució estoc de 2000 mOsm/Kg (0,9 NaCl, 62mM  $Na_2 HPO_4 \cdot 12H_2 O$ , 10 mM  $NaH_2 PO_4 \cdot H_2 O$ ) segons el procediment descrit per Try (1980). Les osmolaritats de les distintes solucions que componien el banc d'assaig quedaren compreses entre 27 i 226 mOsm/Kg. La incubació fou portada a terme a 37°C, en agitació moderada i continua durant 15 minuts. Un cop finalitzada la incubació s'afegí a cada un dels vials 3 mL de solució salina fisiològica (154mM NaCl) per tal de bloquejar el procés d'hemòlisi. El contingut dels vials d'incubació fou centrifugat (2000xg, 15 minuts). El grau d'hemòlisi fou valorat determinant l'absorbància a  $\lambda=540nm$  de tots els sobrenedants i s'expressà com a percentatge relacionant l'absorbància de cada un amb el valor màxim per a cada banc de proves, que sempre correspongué a l'incubació en la solució de menys osmolaritat.

Les diferències entre els paràmetres valorats abans i després de l'esforç foren avaluades mitjançant un test t de Student per a dades aparellades.

## Resultats

Les característiques físiques i antropomètriques, així com el nivell d'activitat foren semblants en els

todas a partir de una solució stock de 2000 mOsm/kg (0,9M NaCl, 62mM  $Na_2 HPO_4 \cdot 12H_2 O$ , 10 mM  $NaH_2 PO_4 \cdot H_2 O$ ) según el procedimiento descrito por Try (1980). Las osmolaridades de las distintas soluciones que componían el banco de ensayo quedaron comprendidas entre 27 y 226 mOsm/kg. La incubación se llevó a cabo a 37°C, en agitación moderada y continua durante 15 minutos. Una vez finalizada la incubación se añadieron a cada uno de los viales 3 mL de solución salina fisiológica (154mM NaCl) con objeto de bloquear el proceso de hemólisis. Se centrifugó (2000xg, 15 minutos) el contenido de los viales de incubación. El grado de hemólisis se valoró determinando la absorbancia a  $\lambda=540nm$  de todos los sobrenadantes y se expresó como porcentaje relacionado con la absorbancia de cada uno con el valor máximo para cada banco de pruebas, que siempre correspondió al incubado en la solución de menor osmolaridad.

Las diferencias entre los parámetros valorados antes y después del esfuerzo se evaluaron mediante un test t de Student para datos apareados.

## Resultados

Las características físicas y antropométricas, así como el nivel de actividad fueron similares en los sujetos sometidos a estudio (Tabla 1). Los datos ventilatorios y cardiovasculares obtenidos durante la realización de la prueba de esfuerzo se resumen en la Tabla 2. Los parámetros valorados: consumo máximo de oxígeno ( $V_{O_2 \text{ max}}$ ), frecuencia cardíaca máxima ( $f_{c \text{ max}}$ ), volumen espiratorio máximo ( $V_{E \text{ max}}$ ), frecuencia respiratoria máxima ( $f_{R \text{ max}}$ ), velocidad máxima alcanzada ( $V_{\text{max}}$ ) y duración de la prueba

subjectes sotmesos a estudi (Taula 1). Les dades ventilatòries i cardío-vasculars obtingudes durant la realització de la prova d'esforç queden resumides a la Taula 2. Els paràmetres valorats: consum màxim d'oxigen ( $V_{O_2 \text{ màx.}}$ ), freqüència cardíaca màxima ( $f_{c \text{ màx.}}$ ), volum espiratori màxim ( $V_{E \text{ màx.}}$ ), freqüència respiratòria màxima ( $f_{R \text{ màx.}}$ ), velocitat màxima assolida ( $v_{m \text{ màx.}}$ ) i durada de la prova (tdp) concordaven amb el nivell d'activitat física desenvolupat habitualment pels individus estudiats.

Els paràmetres hematològics abans i després de la realització de l'assaig els mostrem a la Taula 3: s'objectivà un augment, estadísticament significatiu, en el recompte d'hematies, hemoglobina, hematòcrit, osmolaritat plasmàtica, lactat i pH venós; mentre que els índex hematimètrics (VCM, HCM i CHCM) no patiren modificacions significatives.

Els valors dels diferents índexs de deformabilitat eritrocitària corresponents a les condicions basals i postesforç els presentem a la Taula 4. No es trobaren diferències estadísticament significatives entre les dues condicions experimentals en cap dels índexs.

Les corbes de fragilitat osmòtica dels eritròcits en ambdues condicions experimentals les presentem a la Figura 1, així com els paràmetres descriptius d'aquestes corbes. Aquestes variables permeten caracteritzar matemàticament les dues corbes de fragilitat osmòtica i establir comparacions estadístiques entre ambdues condicions experimentals. Aquests paràmetres corresponen a l'osmolaritat a la qual es produeix una hemòlisi en el 50% de la població eritrocitària ( $Osm_{50}$ ) i el pendent de la corba ( $\beta$ ).

Es trobà un augment estadísticament significatiu de la fragilitat osmòtica eritrocitària postesforç a 140 i 150 mOsm/Kg.

## Discussió

Els nostres resultats indiquen que, després de la realització de la prova triangular màxima, es va produir una hemoconcentració que pot ser atribuïda fonamentalment a pèrdues hídriques, sense descartar el paper actiu que l'exercici físic pot induir a través de mobilització esplènica o hematopoiètica. Així mateix s'observà una acidificació, associada a uns nivells elevats de lactat en sang.

Cal destacar especialment l'increment en osmolaritat plasmàtica, després de la realització de la prova d'esforç, detectat en aquest estudi, que resulta semblant al detectat per Robertson et al. (1988) després d'una cursa de 21.1 Km. Sorprenentment, malgrat un augment mitjà de quasi 20 mOsm/Kg, del qual caldria esperar en principi que inculs una disminució mesurable en el volum cel·lular, no foren detectades variacions significatives en els índexs hematimètrics Hem d'interpretar, per tant, que no hi hagueren variacions en el volum cel·lular ni en la concentració d'hemoglobina. El

(tdp), se hallaron en concordancia con el nivel de actividad física desarrollado habitualmente por los individuos estudiados.

Los parámetros hematológicos antes y después de la realización del ensayo se muestran en la Tabla 3: Se objetivó un aumento, estadísticamente significativo, en el recuento de hematies, hemoglobina, hematocrito, osmolaridad plasmática, lactato y pH venoso; mientras que los índices hematimétricos (VCM, HCM yCHCM) no sufrieron modificaciones significativas.

Los valores de los diferentes índices de deformabilidad eritrocitaria correspondientes a las condiciones basales y post-esfuerzo se presentan en la Tabla 4. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones experimentales, en ninguno de los índices.

Las curvas de fragilidad osmótica de los eritrocitos en ambas condiciones experimentales se presentan en la Figura 1, así como los parámetros descriptivos de dichas curvas. Estas variables permiten caracterizar matemáticamente ambas curvas de fragilidad osmótica y establecer comparaciones estadísticas entre ambas condiciones experimentales. Dichos parámetros corresponden a la osmolaridad a la que se produce una hemólisis en el 50% de la población eritrocitaria ( $Osm_{50}$ ) y la pendiente de la curva ( $\beta$ ).

Se halló un aumento estadísticamente significativo de la fragilidad osmótica eritrocitaria post-esfuerzo a 140 y 150 mOsm/Kg.

## Discusión

Nuestros resultados indican que tras la realización de la prueba triangular máxima, se produjo una hemoconcentración, que puede ser achacada fundamentalmente a pérdidas hídricas, sin descartar el papel activo que el ejercicio físico pueda inducir a través de movilización esplénica o hematopoyética. Así mismo se observó una acidificación, asociada a unos elevados niveles de lactato en sangre.

Especialmente destacable resulta el incremento en osmolaridad plasmática, tras la realización de la prueba de esfuerzo, detectado en este estudio, que resulta similar a la detectada por Robertson et al. (1988) tras una carrera de 21.1 Km. Sorprendentemente, a pesar de un aumento medio de casi 20 mOsm/Kg, del que cabría esperar en principio indujese una disminución mesurable en el volumen celular, no se detectaron variaciones significativas en los índices hematimétricos. Debemos interpretar, por lo tanto, que no hubieron variaciones en el volumen celular ni en la concentración de hemoglobina. El mecanismo por el cual se produce este fenómeno de ajuste del volumen eritrocitario invita a la especulación, sin embargo, no parece desatinado interrogarse acerca del papel que algunas hormonas de estrés, que sufren fuertes incremen-

mecanisme pel qual es produeix aquest fenomen d'ajustament del volum eritrocitari invita a l'especulació; tanmateix, no sembla fora de lloc que hom es demani sobre el paper que algunes hormones de fatiga, que pateixen forts increments en condicions de desenvolupament d'un esforç vigorós, com les catecolamines o el cortisol, poden jugar en aquesta qüestió.

Això no obstant, sí que s'aprecià una variació en la corba de fragilitat osmòtica eritrocitària. Així, després de la realització de la prova d'esforç, les hematies van presentar menys resistència al xoc hipotònic. Dit d'una altra manera, la membrana cel·lular d'aquests eritròcits resistí una tensió menor, originada per la turgència desenvolupada per la cèl·lula amb l'entrada passiva d'aigua. Si tenim en compte que el medi ambient d'aquestes cèl·lules tenia una osmolaritat més gran que en condicions basals, podem interpretar aquesta variació com una resposta adaptativa cel·lular a les condicions d'osmolaritat del plasma. Els eritròcits estudiats després de l'esforç, sotmesos a una osmolaritat plasmàtica més gran, resisteixen més malament el xoc hipotònic que no els eritròcits en condicions basals, ja que aquests es troben en condicions fisiològiques amb una osmolaritat plasmàtica més baixa.

Segons sembla, i tenint en compte els resultats dels assaigs de microfiltració eritrocitària, aquesta lleugera alteració en la membrana eritrocitària no arriba a comprometre la deformabilitat global de la cèl·lula. Conseqüentment, la capacitat de perfusió dels eritròcits en la microcirculació i en la circulació capil·lars no resultaria minvada i l'aportació d'oxigen als teixits en exercici mantindria un nivell d'eficiència adequat.

## Conclusions

Després de la realització d'una prova màxima d'esforç triangular, es detecta una hemoconcentració acompanyada d'un augment d'osmolalitat plasmàtica, sense que hi hagi canvis en els índexs hematimètrics.

Les hematies van presentar una menor resistència al xoc hipotònic després de l'esforç. Aquesta variació podria ser conseqüència d'una resposta adaptativa cel·lular a l'augment de l'osmolaritat plasmàtica induïda per l'exercici físic.

No s'han trobat canvis en la deformabilitat global de l'hemàtia cosa per la qual podem deduir que la seva funció transportadora d'oxigen no queda compromesa, malgrat una lleugera alteració en les propietats de la seva membrana.

## Agraïments

Agraïm R. Balius-Matas, A. Estruch, C. Javierre, G. Rodas, Dr. J.L. Ventura i A. Zamora, la seva participació en la realització d'aquest estudi.

Tabla 4. Índices de deformabilidad eritrocitaria

	PRE		POST
T <sub>m</sub> (seg)	8.30 ± 0.21	NS	8.46 ± 0.16
T <sub>i</sub> (seg)	15.72 ± 0.68	NS	16.67 ± 0.31
ID	1.89 ± 0.05	NS	1.97 ± 0.03
IR	2.08 ± 0.12	NS	2.12 ± 0.06
Tcp (mseg)	67.2 ± 3.2	NS	67.5 ± 1.9

NS: Diferencias no significativas

tos en condiciones de desarrollo de un vigoroso esfuerzo, como catecolaminas o cortisol puedan jugar en esta cuestión.

Sin embargo, sí se apreció una variación en la curva de fragilidad osmótica eritrocitaria. Así, tras la realización de la prueba de esfuerzo, los hematíes presentaron una menor resistencia al choque hipotónico. Dicho de otro modo, la membrana celular de estos eritrocitos resistió una tensión menor, originada por la turgencia desarrollada por la célula con la entrada pasiva de agua. Si tenemos en cuenta que el medio ambiente de estas células tenía una osmolaridad mayor que en condiciones basales, podemos interpretar esta variación como una respuesta adaptativa celular a las condiciones de osmolaridad del plasma. Los eritrocitos estudiados tras el esfuerzo, sometidos a una mayor osmolaridad plasmática, resisten peor el choque hipotónico que los eritrocitos en condiciones basales ya que éstos se encuentran en condiciones fisiológicas con una osmolaridad plasmática más baja.

Al parecer, y teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de microfiltración eritrocitaria, esta ligera alteración en la membrana eritrocitaria no llega a comprometer la deformabilidad global de la célula. Por consiguiente, la capacidad de perfusión de los eritrocitos en la microcirculación y en la circulación capilar no resultaría mermada y el aporte de oxígeno a los tejidos en ejercicio mantendría un adecuado nivel de eficacia.

## Conclusiones

Tras la realización de una prueba de esfuerzo triangular máxima, se detecta una hemoconcentració acompanyada de un aumento de osmolaridad plasmàtica, sin que existan canvis en els índexs hematimètrics.

Los hematíes presentaron una menor resistencia al choque hipotónico tras el esfuerzo. Esta varia-



ción podría ser consecuencia de una respuesta adaptativa celular al aumento de la osmolaridad plasmática inducida por el ejercicio físico.

No se han encontrado cambios en la deformabilidad global del hematíe, de lo que puede deducirse que su función transportadora de oxígeno no queda comprometida, a pesar de una ligera alteración en las propiedades de su membrana.

### Agradecimientos

Agradecemos a R. Balias-Matas, A. Estruch, C. Javierre, G. Rodas, Dr. J.L. Ventura y A. Zamora, su participación en la realización de este estudio.

## Bibliografía

- CHIEN, S.: Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. *Blood Cells* 3: 71-79, 1977.
- CHIEN, S.: Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scan J. Clin. Invest.* 41 Suppl. 156: 7-12, 1981.
- COKELET, G.R.: Rheology and hemodynamics. *Ann. Rev. Physiol.* 42: 311-324, 1980.
- DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H.: Spectrophotometric studies V. A technique for the analysis of undiluted blood and concentrated hemoglobin solution. *J. Biol. Chem.* 112: 105-115, 1935.
- HANSS, M.: Erythrocyte filtrability measurement by the initial flow rate method. *Biorheology* 20: 199-211, 1983.
- KIKUCHI Y.; ARAI, T.; KOYAMA, t.: Improved filtration method for red cell deformability measurement. *Med. Biol. Engrn. Comput.* 21: 270-276, 1983.
- MARTIN, D.G.; FERGUSON, E.W.; WIGUTOFF, S.; GAWNE, T.; SCHOOMAKER, E.B.: Blood viscosity responses to maximal exercise in endurance-trained and sedentary female subjects. *J. Appl. Physiol.* 59: 348-353, 1985.
- MAUGHAN, R.J.; WHITING, P.H.; DAVIDSON, R.J.L.: Estimation of plasma volume changes during marathon running. *Br. J. Sports Med.* 19: 138-141, 1985.
- REINHART, W.H.; BÄRTS, P.; STRAUB, P.W.: Red blood cell morphology after a 100-Km run. *Clin. Lab. Haemat.* 11: 105-110, 1989.
- REINHART, W.H.; STÄUBLI, M.; STRAUB, P.W.: Impaired red cell filterability with elimination of old RBC during a 100 Km race. *J. Appl. Physiol.* 54: 827-830, 1983.
- ROBERTSON, J.D.; MAUGHAN, R.J.; DAVIDSON, R.J.L.: Changes in red cell density and related indices in response to distance running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 264-269, 1988.
- TRY, K.: Lineation of the osmotic fragility curve of erythrocytes. *Scand. J. Haematol.* 24: 157-161, 1980.
- VANDEWALLE, H.; LACOMBE, C.; LELIÈVRE, J.C.; POIROT, C.: Blood viscosity after a 1-h submaximal exercise with and without drinking. *Int. J. Sports Med.* 9: 104-107, 1988.
- VISCOR, G.; PALOMEQUE, J.: Method for determining the osmotic fragility curves of erythrocytes in birds. *Lab. Anim.* 16: 48-50, 1982.

