



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Desarrollo de una plataforma biomimética para el estudio de la captación de glóbulos rojos infectados con *Plasmodium falciparum* en el bazo.**

**Emilia Belén Sousa**

Director de Tesis: **Dr. Nicolás Andrés Saffioti**

Codirectora de Tesis: **Dra. Cora Lilia Alvarez**

Lugar de trabajo: **IQUIFIB (UBA-CONICET)**

A photograph of a handwritten signature in black ink, appearing to read "Nicolás Saffioti".

Firma director

A photograph of a handwritten signature in black ink, appearing to read "Cora Lilia Alvarez".

Firma de la codirectora

A photograph of a handwritten signature in black ink, appearing to read "Emilia Belén Sousa".

Firma de la tesisista

**Junio 2023**

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
1.1. Glóbulos rojos y el bazo.....	8
1.1.1. Función fisiológica de glóbulos rojos.....	8
1.1.2. Citoesqueleto de GRs.....	8
1.1.3. GRs y su relación con la vasculatura.....	10
1.1.4. Ciclo de vida de los GRs.....	10
1.1.5. Bazo, estructura general y función.....	11
1.1.6. Circulación esplénica.....	13
1.2. Malaria.....	14
1.2.1. Ciclo de vida de malaria.....	14
1.2.2. Patología de malaria en el ser humano.....	16
1.2.3. Crecimiento de Plasmodium en los GRs.....	16
1.2.4. Relación malaria-bazo.....	17
1.3. Eriptosis.....	18
1.4. Microfluídica.....	18
1.4.1. Principios básicos de mecánica de fluidos.....	19
1.4.2. Técnicas de microfabricación.....	20
1.4.3. Uso de microfluídica en sistemas vivos/ Organ on a chip.....	20
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Obtención de glóbulos rojos.....	22
3.2. Tinción fluorescente de GRs.....	22
3.2.1. Tinción con Hoechst.....	22
3.2.2. Cargado de GRs con BCECF - AM.....	23
3.2.3. Tinción con PKH-26.....	23
3.2.4. Tinción con Fluo-4 AM.....	24
3.3. Generación de GRs calentados.....	24
3.4. Generación de GRs eriptóticos.....	24
3.5. Cultivo de <i>P. falciparum</i> .....	25
3.6. Fabricación de dispositivos de microfluídica.....	25
3.7. Cuantificación captación GR sanos y tratados en chips de microfluídica que imitan al bazo.....	28
3.8. Cuantificación deformabilidad de GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan a los capilares.....	29
3.9. Análisis de datos.....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Optimización de la tinción de GRs con BCECF-AM.....	31
4.2. Cuantificación de la captación GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan al bazo.....	32
4.2.1. Dinámica de la retención de GRs en el dispositivo que emula bazo.....	32

4.2. 2 Retención GR sometidos a calentamiento (GRc).....	33
4.2.3. Retención de GRs eriptoticos (GRe).....	35
4.2.4. Retención de GRi con <i>P. falciparum</i> .....	36
4.3. Cuantificación deformabilidad de GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan a los capilares.....	38
4.3.1. Cuantificación índice de deformación GRs.....	39
4.4 Correlación del grado de captación con el tamaño del parásito o la sensibilidad al sorbitol.....	41
4.4.1. Correlación del grado de captación de GRi con el tamaño del parásito.....	41
4.4.2. Correlación del grado de captación de GRi con la sensibilidad al sorbitol.....	42
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>48</b>
Fabricación de dispositivos de microfluídica.....	48
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>49</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su excelencia educativa, que no solo implicó un crecimiento profesional sino también personal.

A los investigadores que forman parte del laboratorio de Pablo Schwarzbaum, en especial a Cora y Nicolás, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en un excelente laboratorio. Les agradezco por su apoyo, orientación y dedicación a lo largo de todo el proyecto de la tesina. También, le quiero agradecer a Reni por ser una muy buena compañera de laboratorio.

A mis amigos que conocí en la facultad, con los cuales no solo compartí largas horas de cursada y estudio, sino también una hermosa amistad.

A mis amigas de toda la vida.

A mis abuelos, tíos y primos.

En especial, a mi hermano, por su amistad. A mi mamá y papá por su amor incondicional y apoyo en todos mis proyectos.

## RESUMEN

Los glóbulos rojos (GRs) son las células encargadas de llevar oxígeno a los tejidos, para lo que deben circular libremente por el torrente sanguíneo. El bazo es un órgano que posee una zona llamada pulpa roja con una circulación particular que posee cordones y senos venosos conectados por pequeñas angosturas llamadas fenestraciones. Cuando los GRs atraviesan la pulpa roja deben deformarse para atravesar las fenestraciones y retornar al torrente sanguíneo. Si los GRs son menos deformables quedan retenidos en las fenestraciones y son fagocitados por macrófagos.

La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium* que realizan su ciclo asexual en el interior de los GRs humanos. El crecimiento del parásito afecta al GR infectado (GRI) haciéndolo menos deformable y provocando cambios en la membrana plasmática. La menor deformabilidad de los GRI induce su retención en la pulpa roja del bazo y disminuye su capacidad de sobrevivir en el hospedador. A pesar de la importancia del bazo en la infección por malaria, aún se desconocen los mecanismos por los cuales los GRI se vuelven menos deformables y son captados en el bazo.

En este trabajo nos propusimos estudiar la deformabilidad y retención de los GRI en el bazo utilizando dispositivos de microfluídica. Nuestro objetivo fue estudiar si la captación en el bazo de los GRI está determinada por el tamaño de los parásitos o por su grado de maduración. Además estudiamos 2 tratamientos que disminuyen la deformabilidad de los GRs sanos: exposición a 45°C y exposición a ionomicina.

Por un lado, se optimizó el uso de un dispositivo que imita la circulación de la pulpa roja del bazo a través de incorporar pequeñas angosturas en un canal de microfluídica. Los GRs fueron inyectados en el canal y se cuantificó el número de GRs retenidos en las angosturas por microscopía de epifluorescencia. Se observó que los GRs calentados o incubados con ionomicina se retuvieron más que los GRs que no sufrieron tratamiento. Además, los GRI se retuvieron significativamente más que los GR no infectados. No se observó una correlación entre el grado de retención de GRI con el tamaño de los parásitos o la proporción de parásitos en estado anillo.

Por otro lado, utilizamos un dispositivo de microfluídica que se compone de varios canales con angosturas en serie que inducen una deformación similar a la que los GRs sufren en los vasos sanguíneos más estrechos de la circulación. A partir del análisis de las imágenes de los GRs deformados al momento de atravesar las angosturas se pudo estimar la deformabilidad de los GRs. Nuestro resultados mostraron que tanto los GRI, como los GR calentados o incubados con ionomicina eran menos deformables que los GRs no tratados.

Podemos concluir que los dispositivos de microfluídica permitieron medir los cambios en la deformabilidad y retención en angosturas de GRI de manera similar a como ocurre *in vivo*. El

tamaño del parásito no parece ser determinante de la retención, por lo que otros factores del parásito serían los responsables de la menor deformabilidad de GRI y su captación en el bazo.

**Title: Development of a biomimetic platform for the study of the uptake of red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* in the spleen.**

**ABSTRACT**

Red blood cells (RBCs) are responsible for the transport of oxygen from the lungs to tissues, requiring free circulation throughout the bloodstream. The spleen has a zone called the red pulp region, which has a distinct circulation including venous sinuses and cords interconnected by narrow slits called gaps. As RBCs go through the red pulp, they need to deform to pass through these gaps and return to the bloodstream. RBCs with reduced deformability may become trapped in these gaps to be removed by macrophages.

Malaria is caused by *Plasmodium* parasites. The parasites develop their asexual cycle inside human RBCs. The parasite's growth adversely affects the infected RBCs (iRBCs) by decreasing their deformability and inducing alterations in the plasma membrane. These changes vary depending on the parasite's stage of development. Due to their decreased deformability, iRBCs are sequestered within the spleen's red pulp, hampering their survival in the host. Despite the spleen's relevant role in malaria infection, the mechanisms underlying the reduced deformability of iRBCs and their capture in the spleen remain elusive.

Our objective was to investigate the deformability and retention of iRBCs in the spleen using microfluidic devices. We aimed to determine if the capture of iRBCs in the spleen is influenced by the parasite size or stage. Furthermore, we examined the impact of two treatments that decrease RBCs deformability: exposure to 45°C or incubation with ionomycin.

To accomplish these objectives, we optimized the use of a microfluidic device that emulates the circulation of the spleen's red pulp. The device incorporates narrow gaps into a microfluidic channel to mimic the gaps of the spleen red pulp circulation. RBCs were injected into the channel, and the cell retention in the gaps was quantified using epifluorescence microscopy. We observed that both heated and ionomycin-treated RBCs exhibited a higher retention rate compared to untreated RBCs. Moreover, iRBCs demonstrated significantly greater retention than uninfected RBCs. However, no discernible correlation was observed between the degree of iRBC retention and either parasite size or the proportion of iRBCs in the ring forms in the sample.

In parallel, we employed a microfluidic device comprising multiple channels with sequential restrictions designed to induce deformation similar to that experienced by RBCs in the narrowest blood vessels during circulation. By analyzing images captured during the transit of RBCs through these restrictions, we were able to estimate the deformability of RBCs. Our results demonstrated a reduced deformability in iRBCs, RBCs subjected to heat, or RBCs incubated with ionomycin when compared to untreated RBCs.

In conclusion, the implementation of microfluidic devices allowed the assessment of changes in deformability and retention of iRBCs within narrow slits, closely resembling conditions encountered in real tissues. Our findings suggest that parasite size does not play a decisive role in spleen retention. Consequently, other parasite-related factors are likely responsible for the diminished deformability of iRBCs and their subsequent capture within the spleen.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Glóbulos rojos y el bazo**

#### **1.1.1. Función fisiológica de glóbulos rojos**

Los glóbulos rojos (GRs) también conocidos como eritrocitos, son un tipo de célula responsable del transporte de gases y nutrientes por el torrente sanguíneo en los organismos vertebrados y algunos invertebrados (Glomski & Tamburlin, 1990). Sus características principales como tamaño, forma y cantidad varían dependiendo de la especie (Barbalato & Pillarisetty, 2022).

Los GRs maduros de casi todas las especies de peces, anfibios, reptiles y aves tienen forma ovalada, conservan su núcleo y orgánulos durante toda su vida. Por el contrario, los GRs circulantes definitivos de mamíferos carecen de núcleo y orgánulos (Götting & Nikinmaa, 2015).

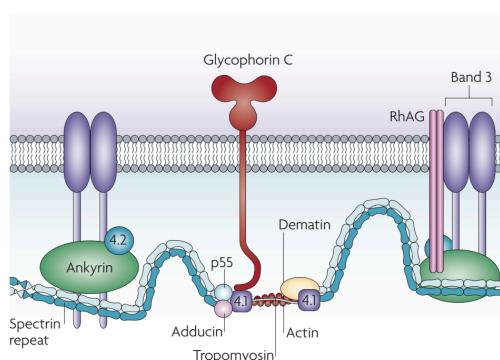
#### **1.1.2. Citoesqueleto de GRs**

La membrana plasmática de los GRs no es una estructura estática, sino por el contrario, muy dinámica (Mohandas, 2016), que permite la deformación celular. La deformabilidad es una propiedad fundamental para el transporte de gases hacia los tejidos, dado que permite a los GRs modificar su forma para atravesar capilares de diámetro más pequeño que la misma célula. Una menor deformabilidad de los GRs podría relacionarse con los defectos en la circulación que se observan en muchas patologías (Wang & Popel, 1993). En condiciones fisiológicas, los GRs se encuentran en forma de disco bicónvexo con unas dimensiones aproximadas de 8 µm de diámetro y 2 µm de grosor, y son capaces de atravesar capilares con diámetros no superiores a 3-5 µm (Tomaiuolo, 2014). Numerosos estudios han identificado tres características principales que regulan la capacidad que poseen los GRs para deformarse: (1) la geometría celular, en particular alta relación superficie/ volumen, (2) la viscosidad citoplasmática determinada por la concentración de hemoglobina intracelular; y (3) la deformabilidad de la membrana (Mohandas & Gallagher, 2008).

La membrana plasmática de los GRs está compuesta por glicocálix (rGC) en la superficie externa, colesterol y fosfolípidos presentes en la bicapa lipídica (Mohandas & Gallagher, 2008). Las proporciones de colesterol y fosfolípidos son iguales en peso, sin embargo los fosfolípidos están dispuestos asimétricamente a un lado y al otro de la bicapa (Mohandas & Gallagher, 2008). La membrana de los GRs es una estructura compuesta por una bicapa

lipídica adherida a una red de proteínas citoesqueléticas entre las que se encuentra la espectrina que se une a la membrana a través de complejos de proteínas citoplasmáticas e integrales de membrana. La espectrina está formada por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que se unen formando heterodímeros. La red de espectrina de los GRs difiere completamente de las redes tridimensionales de actina comunes a otros tipos de células animales. Así también, la membrana del GR posee dos complejos esenciales, el de anquirina y el 4.1R (figura 1), los cuales conectan varias proteínas integrales en la bicapa fosfolipídica con los heterodímeros  $\alpha/\beta$  de espectrina subyacentes a la bicapa lipídica (Mohandas, 2016). Por otro lado, la proteína integral de membrana más abundante en los GRs, llamada banda 3 (SLC4A1), es una glicoproteína que se une al citoesqueleto de la membrana mediante interacciones con la proteína 4.2 y la anquirina. Este complejo con banda 3 es necesario para mantener la forma y la integridad de los GRs (Thiagarajan y col., 2021). Cerca de la membrana de los GRs hay quinasas y fosfatases que alteran las propiedades de la espectrina y otras proteínas asociadas (Zhang & Brown, 2008).

En cuanto a la composición lipídica de la membrana, en la hemicapa externa se localizan predominantemente fosfatidilcolina y la esfingomielina, mientras que en la hemicapa interna se encuentra en mayor parte fosfatidiletanolamina y fosfatidilsérina (PS), junto con los constituyentes fosfoinosítidos menores (Zwaal & Schroit, 1997). El mantenimiento de la distribución asimétrica de los fosfolípidos, en particular la localización exclusiva de PS y fosfoinosítidos en la hemicapa interna, tiene varias implicaciones funcionales (Mohandas & Gallagher, 2008). Las interacciones con las proteínas esqueléticas, la espectrina y la proteína 4.1R, tanto la PS como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) pueden regular la función mecánica de la membrana (An y col., 2005).



**Figura 1| Representación esquemática de la membrana de los GRs.** La membrana es una estructura compuesta por moléculas lipídicas anfifílicas ancladas a una red elástica bidimensional de proteínas del citoesqueleto a través de sitios de anclaje (proteínas transmembrana) en la bicapa lipídica. Los dímeros de espectrina están unidos para formar

tetrámeros y generar cadenas del lado citoplasmático de la membrana (*Spectrin repeat*). Estas cadenas en sus colas forman complejos con oligómeros de actina que están estabilizados por la proteína 4.1R y otras moléculas. Las interacciones que conectan el esqueleto subyacente con la membrana incluyen el complejo banda 3-anquirina-espectrina y el complejo ternario entre la proteína 4.1R, p55 y glicoforina C. Tomado de (Maier y col., 2009).

### **1.1.3. GRs y su relación con la vasculatura**

El endotelio es un tejido que forma el revestimiento celular interno de los vasos sanguíneos. Las células endoteliales (CE) no son inertes, sino muy activas metabólicamente. El tejido endotelial desempeña un papel importante en muchas funciones fisiológicas, como el control del tono vasomotor, el tráfico de células sanguíneas, el equilibrio hemostático, la inmunidad innata y adaptativa (Hwa y col., 2005). El flujo sanguíneo a través del sistema vascular es un proceso dinámico de baja fricción debido a que la superficie del endotelio está cubierta por una capa de proteoglicanos, el glicocálix endotelial (eGC). Este polímero de consistencia gelatinosa, rico en agua y cargas aniónicas, forma una superficie funcional entre los GRs y la membrana plasmática endotelial. A su vez, debido a las propiedades aniónicas del eGC, existen fuerzas electrostáticas negativas que repelen a los GRs de aproximarse demasiado a la membrana, lo cual explica la baja adherencia de los GRs sanos al endotelio (Liu & Yang, 2009). Una eGC alterada, podría provocar un contacto muy próximo entre los GRs y las CE produciendo un daño de las células endoteliales (Oberleithner, 2013).

### **1.1.4. Ciclo de vida de los GRs**

La eritropoyesis es el proceso de formación de GRs y ocurre principalmente en la médula ósea, finalizando en el torrente sanguíneo. Los GRs se generan a partir de células madre hematopoyéticas multipotentes, a través de un proceso de maduración complejo que involucra varios cambios morfológicos para producir células especializadas altamente funcionales. En los mamíferos, los pasos terminales de la eritropoyesis involucran la expulsión del núcleo de los eritroblastos, lo cual conduce a la formación de reticulocitos. De esta forma, para producir GRs bicóncavos maduros los orgánulos y los ribosomas se eliminan selectivamente de los reticulocitos y la membrana plasmática se remodela (Moras y col., 2017). Los GRs humanos normales tienen una vida media de unos 120 días en la circulación sanguínea hasta que finalmente se produce la eritrofagía, es decir fagocitosis mediada por macrofagos (Thiagarajan y col., 2021). Los macrófagos son capaces de

fagocitar y digerir restos celulares o sustancias extrañas, en todos los tejidos del cuerpo (Franken y col., 2016). La fagocitosis de GRs por macrófagos es un proceso extremadamente eficaz, ya que los macrófagos son capaces de eliminar muchos GRs cada segundo sin que se produzca una liberación significativa de hemoglobina en la circulación (Thiagarajan y col., 2021). Así, cada segundo entran en el torrente sanguíneo unos 2 millones de GRs procedentes de la médula ósea de un adulto sano, y es eliminado aproximadamente el mismo número. En múltiples estudios se ha demostrado que muchas características cambian en los GRs durante su vida en la circulación periférica (Bosch y col., 1992).

El bazo humano es un órgano que funciona principalmente como filtro de la sangre (Mebius & Kraal, 2005). Cuando los GRs fluyen a través del bazo tienen que atravesar hendiduras endoteliales estrechas con un diámetro de unos pocos micrómetros (ver sección 1.5). Si la deformabilidad de los GRs se ve afectada, los GRs son capturados en las hendiduras del bazo para ser luego fagocitados por los macrófagos (Tomaiuolo, 2014). A su vez, se ha estudiado que la alteración de la banda 3 expone neoantígenos que son reconocidos por anticuerpos que el cuerpo humano produce de manera fisiológica y permite el reconocimiento de GRs senescentes por los macrófagos junto con la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la hemicapa externa de los GRs (Thiagarajan y col., 2021).

#### **1.1.5. Bazo, estructura general y función**

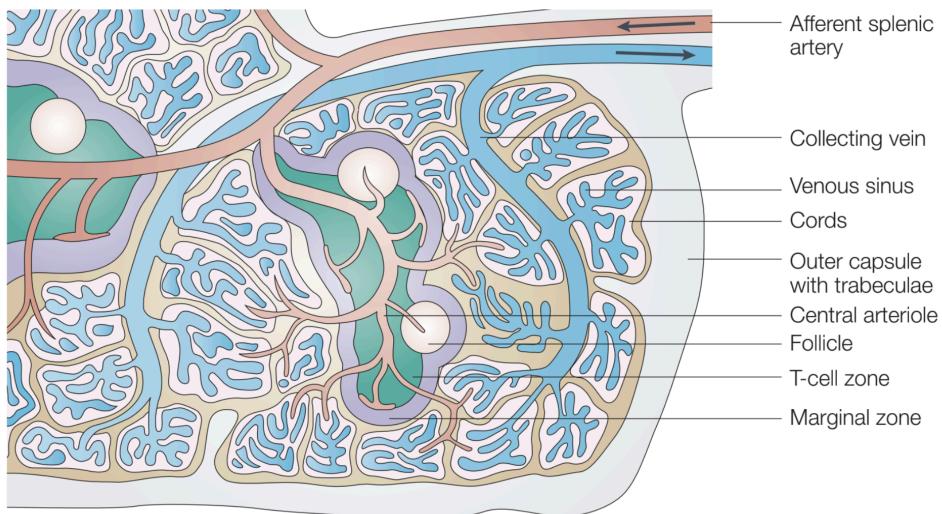
El bazo humano es un órgano que permite el control inmunológico de la sangre (Steiniger y col., 2022), siendo el mayor filtro de sangre del organismo (Mebius & Kraal, 2005). La remoción de GRs alterados de la circulación por parte del bazo contribuye al equilibrio entre eritropoyesis y eritrofagia (G. E. y col., 2023). La circulación del bazo está organizada como un "árbol" de vasos arteriales, en el cual las arteriolas más pequeñas terminan en un sistema venoso sinusoidal (figura 2), (Mebius & Kraal, 2005). El bazo posee distintas zonas micro-anatómicas y de micro-circulación adaptadas para realizar diferentes funciones, por ejemplo, la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas, el reciclaje de hierro, y la destrucción selectiva de GRs senescentes, dañados o que poseen patógenos en su interior (Del Portillo y col., 2012). En la estructura del bazo se pueden distinguir dos compartimentos: la pulpa roja y la pulpa blanca. Esta última, es una región linfoide altamente organizada donde se pueden iniciar respuestas inmunitarias adaptativas. Por otro lado, la pulpa roja comprende del 70 al 80% del volumen del bazo con cordones y senos que poseen características arquitectónicas y microcirculatorias únicas. La sangre llega a la pulpa roja por la arteriola central (figura 2) y puede finalizar en los cordones esplénicos, o cordones de Billroth que son espacios abiertos, desprovistos de revestimiento endotelial, poblados por

macrófagos (Del Portillo y col., 2012). Los cordones esplénicos están rodeados por los senos venosos que son vasos sanguíneos que se conectan con la vena colectora que a su vez se conecta con la circulación general. A diferencia del cordón esplénico, los senos venosos tienen endotelio, aunque se trata de un endotelio diferente al resto de los vasos sanguíneos porque posee hendiduras de entre 0,5 y 2,5  $\mu\text{m}$  llamadas fenestraciones (Elizalde-Torrent y col., 2021)(Chen 1978). Las fenestraciones del endotelio de los senos venosos conectan a estos con los cordones esplénicos.

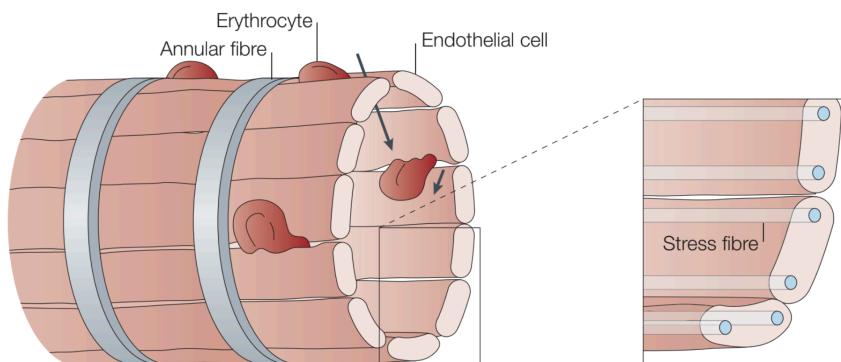
Los GRs que llegan a los cordones esplénicos pueden pasar los senos venosos y retornar a la circulación. Sin embargo, para ello deben atravesar las fenestraciones en el endotelio del seno venoso. Los GRs sanos pueden abandonar los cordones esplénicos rápidamente al pasar a través de las fenestraciones de los senos venosos (Del Portillo y col., 2012), mientras que los GRs envejecidos cuyas membranas pierden deformabilidad no pueden atravesar por las fenestraciones, quedan retenidos en ellas y son fagocitados por los macrófagos esplénicos de la pulpa roja (Mebius & Kraal, 2005).

Los senos venosos están rodeados por fibras de tensión o estrés que conectan las células endoteliales a los componentes de la matriz extracelular (figura 3). Su composición es de filamentos similares a la actina y miosina que podrían ejercer acción de filamentos deslizantes entre las células endoteliales (Mebius & Kraal, 2005). La contractilidad de estas fibras es importante para la formación de las fenestraciones, regulando el paso de sangre desde los cordones de la pulpa roja hacia los senos venosos (figura 2) (Mebius & Kraal, 2005).

Finalmente, la eritrofagocitosis, mediada por los macrófagos esplénicos en conjunto con los del hígado, es un proceso crucial para la renovación de los GRs, como el reciclaje del hierro. Así pues, los GRs se degradan en el fagolisosoma de los macrófagos, y el grupo hemo es liberado tras la proteólisis de la hemoglobina (Mebius & Kraal, 2005). La eritrofagia de los GRs senescentes se produce fácilmente *in vivo*, sin embargo la incubación de células senescentes *in vitro* con macrófagos esplénicos cultivados no induce la eritrofagocitosis, por lo tanto esto resulta una evidencia de que las características de la arquitectura del bazo son necesarias para la eliminación de los GRs envejecidos (Gottlieb y col., 2012).



**Figura 2 | Esquema de la circulación del bazo.** La arteria esplénica aferente se ramifica en arteriolas centrales. Las arteriolas terminan en los cordones en la pulpa roja (“cords”), desde donde los GRs pasan a los senos venosos (“Venous sinus”) para luego continuar hasta la vena esplénica eferente. Tomado de (Meibius & Kraal, 2005).



**Figura 3 | Esquema de un seno venoso situado en los cordones de la pulpa roja.** Las fibras de estrés discurren a lo largo del eje longitudinal de las células endoteliales y son más prominentes donde las células endoteliales están en contacto. La contractilidad de las fibras de estrés permite la formación de las fenestraciones. Tomado de (Meibius & Kraal, 2005).

### 1.1.6. Circulación esplénica

Existen debates acerca de cómo es realmente la circulación sanguínea en el bazo. Se llama circulación abierta al recorrido que hace la sangre atravesando los cordones esplénicos hacia los senos venosos (como se indica en la sección 1.5). A su vez, se ha propuesto que además de la circulación abierta existe una circulación cerrada creada por el pasaje de la

sangre desde la arteriola a los senos venosos, evitando el cordón esplénico. Tradicionalmente se afirma que el bazo tendría una circulación abierta y cerrada, siendo la primera mayoritaria (Mebius & Kraal, 2005). Sin embargo, un trabajo reciente ha cuestionado dicha afirmación sugiriendo que solo existiría la circulación abierta (Steiniger y col., 2022). A pesar del debate acerca de la estructura de la circulación del bazo, es mayormente aceptado que el pasaje de los GRs a través de la circulación abierta es importante, ya que permite la retención y eliminación de GRs senescentes (G. E. y col., 2023).

## 1.2. Malaria

La malaria o también conocida como paludismo, es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* transmitida a los humanos por algunos tipos de mosquitos. Esta enfermedad puede ser mortal, pero también es curable y prevenible.

En 2021 casi la mitad de la población mundial estuvo en riesgo de padecer paludismo. En consecuencia hubo mundialmente 247 millones de casos de malaria y se estima que en 2021 la enfermedad causó la muerte de 619.000 personas. Esta enfermedad ha sido un importante problema de la salud mundial a lo largo de la historia, siendo una de las principales causas de muerte y enfermedad en muchos países tropicales y subtropicales.

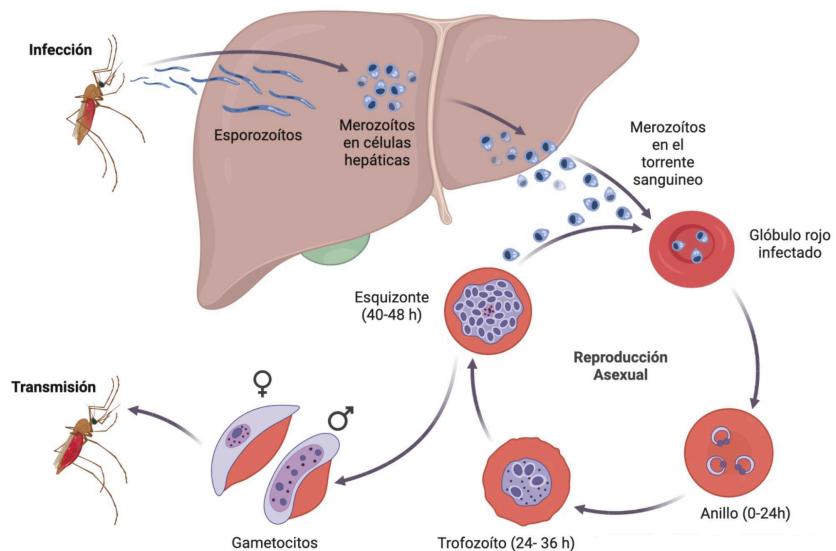
A pesar de la presencia de *P. falciparum* en los trópicos, el impacto en la población está lejos de ser uniforme, con la gran mayoría de los individuos parasitados del mundo en África y el sur de Asia y donde el 90% de las muertes ocurren en África, principalmente en niños (OMS, 2023).

En la última década, se ha reducido la prevalencia de la malaria a menos de la mitad de la población, lo cual aumenta la perspectiva de una futura eliminación y tal vez erradicación. Para alcanzar este objetivo se requiere del desarrollo de nuevas herramientas, incluyendo nuevos medicamentos antipalúdicos y vacunas más eficaces, así como también una mayor comprensión de la enfermedad y la biología del parásito (Cowman y col., 2016).

### 1.2.1. Ciclo de vida de malaria

El agente responsable de producir malaria es el parásito protozoario unicelular perteneciente al género *Plasmodium* (Sato, 2021), filo Apicomplexa. Los parásitos *Plasmodium* poseen distintas etapas morfológicas de desarrollo, cada una especializada para habitar entornos y tipos de células hospedador muy diferentes (Howick y col., 2019). Las especies de *Plasmodium* que infectan a los humanos causando malaria están limitadas a cinco: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*.

Los ciclos de vida de las especies de *Plasmodium* son similares, siendo los vectores que las transmiten en humanos los mosquitos hembra del género *Anopheles* (Sato, 2021). La infección por malaria en humanos se inicia cuando el mosquito inyecta esporozoitos de *Plasmodium* en la sangre durante su alimentación. Los esporozoitos alcanzan activamente la circulación periférica y migran al hígado, dentro de los hepatocitos se replican formando merozoítos, los cuales se liberan al torrente sanguíneo. Así pues, a partir de ese momento es posible que suceda el estadio sexual o asexual. Consecuentemente, una pequeña proporción de parásitos en etapa sanguínea se desarrollan en estadios sexuales llamados gametocitos que llegan a la circulación periférica donde son absorbidos por otro mosquito durante su alimentación. Después de la fertilización y el desarrollo esporogónico en el intestino medio del mosquito, se forman esporozoitos infecciosos que llegan a las glándulas salivales para transmitirse a otro hospedador, completando el ciclo (Meibalan & Martí, 2017). Contrariamente, en el estadio asexual, los merozoítos se adhieren e invaden los GRs sanos, donde el parásito se desarrolla en una vacuola parasitófora (VP) a través de diferentes etapas sucesivas: anillo (0–24 horas), trofozoito (24–36 horas) y esquizonte (40-48 horas). Los parásitos en etapa madura (>24h de invasión) poseen estructuras unidas a la membrana en los GRs. Después de aproximadamente 48 horas, los GRI se rompen, liberando de 16 a 32 merozoitos (Maier y col., 2009).



**Figura 4 | Ciclo de vida *Plasmodium*.** En el estadio asexual, los merozoítos se adhieren e invaden los GRs sanos, donde es posible observar a lo largo del tiempo el desarrollo de las diferentes etapas sucesivas: anillo (0–24 horas), trofozoito (24–36 horas) y esquizonte (40-48 horas). Después de aproximadamente 48 horas, los GR infectados se lisan y liberan merozoitos los cuales vuelven a re-infectar a los GRs. En el estadio sexual, una pequeña

proporción de parásitos en etapa sanguínea se desarrollan en estadios sexuales llamadas gametocitos que llegan a la dermis donde son absorbidos por otro mosquito durante su alimentación. Creado mediante software online, BioRender.

### **1.2.2. Patología de malaria en el ser humano**

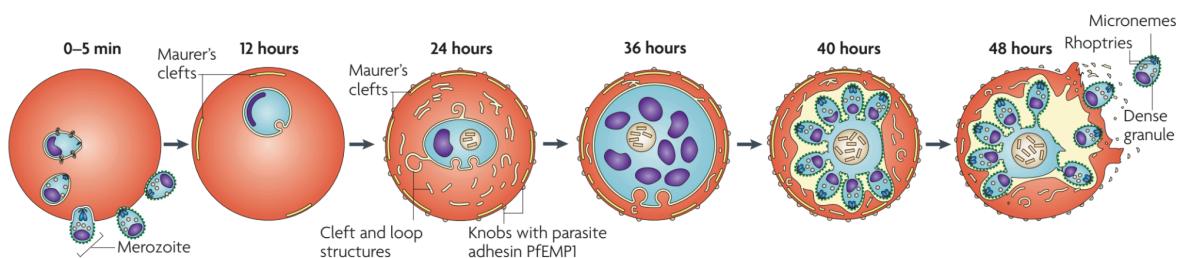
La infección con los agentes causantes de la malaria puede provocar una amplia sintomatología, desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad grave e incluso la muerte. En términos generales, esta enfermedad es curable si es diagnosticada y tratada de manera oportuna. A su vez, todos los síntomas clínicos asociados con la malaria son causados por los parásitos eritrocíticos asexuales o en etapa sanguínea. Así pues, cuando el parásito se desarrolla en el GR infectado (GRi), numerosas sustancias de desecho, por ejemplo, el pigmento hemozoína y otros factores tóxicos, se acumulan en el GRi. Luego, estos desechos se vierten en el torrente sanguíneo cuando las células infectadas se lisan y liberan a los merozoitos invasivos. Particularmente, la hemozoína y otros factores tóxicos como la glucosa fosfato isomerasa (GPI) estimulan a la respuesta inmune a producir citoquinas y otros factores solubles, los cuales actúan para producir fiebre y escalofríos. Por otro lado, los GRi parasitados por *Plasmodium falciparum*, en estadio trofozoítos maduros, se adhieren al endotelio vascular de las paredes de los vasos sanguíneos venulares y no circulan libremente en la sangre. Se propone que cuando el secuestro de GRi ocurre en los vasos del cerebro se produce el síntoma más grave conocido como paludismo cerebral, que se asocia con una alta mortalidad (*CDC - Malaria*).

La sintomatología en humanos producida por los ciclos asexuales, dura aproximadamente 48 horas, siendo la ruptura celular inductor de oleadas periódicas de fiebre en los pacientes. Los síntomas varían en severidad desde dolores de cabeza, hipoglucemia, anemia, fiebre, insuficiencia renal, paludismo cerebral, hasta la muerte (Maier y col., 2009).

### **1.2.3. Crecimiento de *Plasmodium* en los GRs**

Al producirse la infección, *Plasmodium* activa un procesos que le permiten crecer y esconderse de las respuestas inmunes del hospedador. El parásito exporta cientos de proteínas más allá de la membrana de la vacuola parasitófora a numerosos lugares dentro del GRi a través de una red de tráfico que permite clasificar y mover las proteínas exportadas a ubicaciones subcelulares específicas. Las características fundamentales de esta red son las hendiduras de Maurer, unas estructuras membranosas en forma de discos aplastados que brotan de la vacuola parasitófora después de la invasión, y que se unen a la parte inferior de la membrana de los GRi aproximadamente 20 horas después de la invasión

(Maier y col., 2009). Las alteraciones en la membrana celular de los GRI producen modificaciones en el citoesqueleto asociado a la membrana, en sus propiedades de deformabilidad, y cambios en las propiedades de permeabilidad (Prajapati, 2014). La presencia de proteínas en la membrana del GRI aumenta la permeabilidad de la membrana al sorbitol, un derivado de azúcar que normalmente no puede penetrar la membrana del GR (Ginsburg & Stein, 2004). Los estadios maduros del parásito como trofozoíto y esquizonte se caracterizan por habitar GRI con permeabilidad aumentada al sorbitol mientras que los GRI con estadios más jóvenes como anillos no son permeables al sorbitol. De esta manera, al incubar a los GRI con parásitos en estadio trofozoíto o esquizonte en sorbitol 5%, este compuesto penetra en la célula aumentando la osmolaridad citoplasmática, lo que lleva a la entrada de agua, aumento de volumen y lisis del GRI (Ginsburg & Stein, 2004). Por este motivo se dice que los GRI con estado trofozoíto y esquizonte son “sensibles al sorbitol” mientras que los parásitos en estadio anillo no lo son.



**Figura 5 | Desarrollo de *P. falciparum* en glóbulos rojos humanos.** Los merozoítos de *P. falciparum* (izquierda) se adhieren e invaden los GRs (0-5 min), luego se desarrolla una vacuola parasitófora a través del anillo (0-24 horas) que continúa su desarrollo para convertirse en trofozoíto (24–36 horas) y finalmente esquizonte (40-48 horas). En la etapa madura (>24 h) es posible percibir estructuras unidas a la membrana plasmática de los GRI. Aproximadamente 48 horas después de la infección, los GRI se lisan liberando a los merozoitos. Tomado de (Maier y col., 2009).

#### 1.2.4. Relación malaria-bazo

El bazo es un órgano vital para el desarrollo de respuestas inmunitarias al parásito de la malaria, como también para la protección contra la malaria grave tras una nueva exposición (Del Portillo y col., 2012). Durante el proceso de infección por *P. falciparum* la capacidad del bazo para eliminar GRs alterados, ya sea a través del reconocimiento por parte de macrófagos o a través de sus propiedades mecánicas anormales, es esencial. La eliminación esplénica de los GRI puede comenzar desde estadios muy tempranos y puede

contribuir a la generación de una respuesta inmune adaptativa a través de la fagocitosis de los GRi, así como de los desechos del parásito por parte de las células presentadoras de antígenos. Por otro lado, se observó que la deformabilidad del eritrocito hospedador del parásito en el estadio anillo desencadena su retención en el bazo, lo que indica que la deformabilidad reducida de los anillos podría conducir a su eliminación. Como este proceso de retención corresponde a la eliminación de los parásitos circulantes, es probable que reduzca la velocidad de aumento de la carga de parásitos y, por lo tanto, disminuya la cinética de la infección. Así pues, es importante destacar que la retención de GRi en el bazo probablemente afecta la cinética, la naturaleza y la localización de la presentación de antígenos, lo que influye tanto en la respuesta temprana como en la adquisición de inmunidad adaptativa en la malaria (Buffet y col., 2011).

### **1.3. Eriptosis**

Los GRs pueden experimentar lesiones que amenazan la supervivencia antes de la senescencia, es decir antes de que el GR sea eliminado naturalmente de la circulación después de su vida útil de 120 días (Repsold & Joubert, 2018). Esos casos pueden deberse a una muerte celular programada de GRs, también llamada eriptosis. La eriptosis es una muerte suicida coordinada que conduce a la eliminación de GRs. La eriptosis es estimulada principalmente por un aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los GRs expresan canales catiónicos no selectivos permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden ser activados por estrés oxidativo, la eliminación de  $\text{Cl}^-$  y el shock hipoosmótico.

El  $\text{Ca}^{2+}$  activa la calpaína, una cisteína endopeptidasa que degrada las proteínas del citoesqueleto y, por lo tanto, fomenta la pérdida de la deformabilidad celular.

Es posible observar un aumento en la incidencia de eriptosis en la malaria, lo cual es de carácter beneficioso ya que limita el crecimiento del parásito *P. falciparum* en el GR. Una vez infectado por el parásito, se produce un aumento del estrés oxidativo y la consiguiente entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales catiónicos, de forma tal que se activa la eriptosis. Aunque *Plasmodium* depende de la activación de estos canales para obtener sus nutrientes, eventualmente el aumento de los niveles de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el GR desencadenará la eriptosis y la posterior eliminación de los GRi de la circulación (Repsold & Joubert, 2018).

### **1.4. Microfluídica**

La microfluídica es la ciencia y la tecnología de los sistemas que procesa y manipula pequeñas cantidades desde  $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros de volúmenes de líquidos, a través de canales que poseen dimensiones de unos pocos a cientos de micrómetros. Esto tiene la ventaja de

que es posible utilizar cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos, y llevar a cabo separaciones y detecciones con alta resolución y sensibilidad a bajo costo y tiempos cortos de análisis (Whitesides, 2006).

#### 1.4.1. Principios básicos de mecánica de fluidos

En la microescala, fluidos como el agua se comportan principalmente en un régimen laminar. El flujo laminar o turbulento de los fluidos pueden ser descritos mediante el número de Reynolds (Re), (fórmula 1) (Beebe y col., 2002). Un bajo número de Reynolds está asociado a un flujo laminar.

$$Re = \frac{\rho v D h}{\mu}$$

Formula 1 | Número de Reynolds (Re), donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $v$  es la velocidad del fluido,  $\mu$  es la viscosidad, y  $Dh$  es el diámetro hidráulico. Este último depende de la geometría de la sección transversal del canal, por ejemplo, el diámetro en un tubo circular. (Beebe y col., 2002).

El flujo turbulento es caótico e impredecible, por lo tanto, resulta imposible predecir la posición de una partícula en el fluido en función del tiempo cuando fluye. Contrariamente, en el flujo laminar la velocidad de una partícula en una corriente de fluido es matemáticamente predecible en función del tiempo. Debido al pequeño tamaño de los microcanales, en microfluídica el flujo es casi siempre laminar, lo que permite predecir el comportamiento de los líquidos.

El flujo dentro de un microcanal se calcula mediante la fórmula 2:

$$Q = \frac{P}{R}$$

Fórmula 2 | Relación entre el flujo (Q), la presión (P) y resistencia hidráulica (R).

donde Q es el flujo, P es la caída de presión a través del canal, y R es la resistencia del canal. Esta fórmula quiere decir que a medida que un canal posea más resistencia hidráulica, mayor deberá ser la diferencia de presión a lo largo de este para lograr un cierto flujo. La geometría de canal más común, debido a su presencia en el transporte sanguíneo, es el tubo circular, (fórmula 2) (Beebe y col., 2002). La fórmula 3 muestra cómo la resistencia hidráulica aumenta de manera exponencial a medida que el diámetro del canal se reduce.

$$R = \frac{8\mu L}{\pi r^4}$$

Fórmula 3 | Resistencia en un canal de geometría circular, donde  $\mu$  es la viscosidad del fluido,  $L$  es la longitud del canal, y  $r$  es el radio del canal (Beebe y col., 2002).

#### **1.4.2. Técnicas de microfabricación**

Una técnica muy utilizada para fabricar dispositivos de microfluídica es la litografía blanda que consiste en el moldeado de un polímero utilizando un molde creado a partir de fotolitografía. El polímero más utilizado suele ser el polidimetilsiloxano (PDMS). El dispositivo de PDMS tendrá impreso en su estructura la red de canales que se desea utilizar a partir de un molde con una resolución adecuada. Las técnicas utilizadas para crear plantillas multidimensionales como micromecanizado o fotolitografía permiten crear moldes muy pequeños con buena resolución, de forma tal que se pueda moldear microestructuras de PDMS. Otro material muy utilizado para crear dispositivos de microfluídica es el polimetilmetacrilato (PMMA) (Beebe y col., 2002).

#### **1.4.3. Uso de microfluídica en sistemas vivos/ Organ on a chip**

En los últimos años, se ha introducido una nueva clase de modelos *in vitro* llamados órganos-en-chips (*organ-on-chip*, en inglés), los cuales son capaces de combinar las ventajas de los modelos *in vivo* e *in vitro* de órganos y tejidos. En estos dispositivos microfluídicos las células pueden ser cultivadas en un ambiente diseñado específicamente, de forma tal que se replica el microambiente *in vivo* del organismo. Esto permite controlar el crecimiento celular para crear tejidos o porciones de órganos con un alto grado de precisión. El microambiente dentro de los dispositivos se puede optimizar mediante la incorporación de factores geométricos, mecánicos y bioquímicos propios del ambiente *in vivo*. Las tecnologías de *organ-on-chip* proporcionan flexibilidad en el diseño y control de microambientes, así como en los protocolos de seguimiento de las células dentro del dispositivo. Actualmente estos dispositivos se están utilizando para crear modelos útiles que permitan responder a preguntas específicas acerca de la fisiología y fisiopatología de distintos tejidos (van der Helm y col., 2016). En un futuro no muy lejano, los órganos-en-chips prometen replicar funciones a nivel de órganos completos y permitir el estudio de enfermedades a un nivel más alto del que se podría lograr con modelos convencionales *in vitro* (van der Helm y col., 2016).

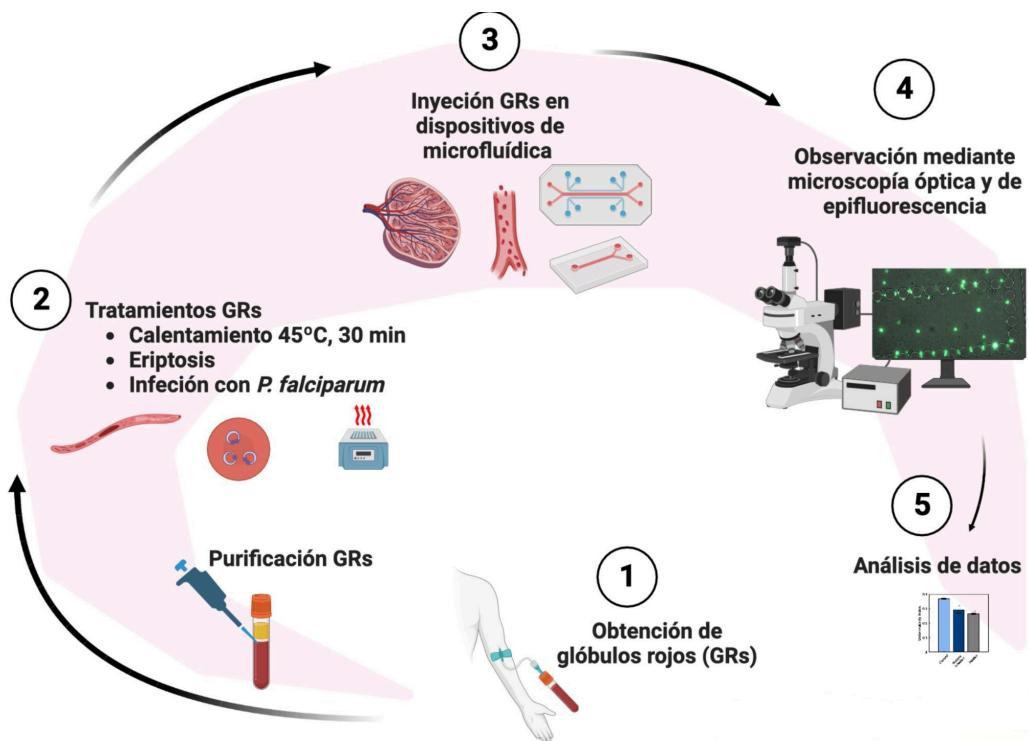
## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se mencionó en la sección 1.2, a medida que *P. falciparum* crece dentro de los GR, aumenta la probabilidad de que el GRi sea retenido en los capilares fenestrados del bazo. Nuestra hipótesis es que el principal factor que contribuye a la captación de *P. falciparum* en el bazo es el tamaño del parásito dentro del GR. Para poner a prueba esta hipótesis proponemos los siguientes objetivos específicos:

- (i) *Determinar la captación de GR infectados con parásitos en diversos estadios.*
- (ii) *Correlacionar el grado de captación con el tamaño del parásito o la sensibilidad al sorbitol.*

Para poder cumplir estos objetivos se utilizará un dispositivo de microfluídica que permite estimar la captación en el bazo de GRi. En esta tesis, nos propusimos en un primer paso estudiar la captación de GRs sanos, calentados o expuestos a ionomicina que son tratamientos que disminuyen la deformabilidad celular y que nos permitieron optimizar el uso del dispositivo de microfluídica. Luego realizamos experimentos con GRi que nos permitieron estudiar los objetivos I y II.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 6 | Protocolo experimental general llevado a cabo en todos los experimentos.**

Creado mediante software online, BioRender.

#### 3.1. Obtención de glóbulos rojos

Las muestras de sangre fueron tomadas a partir de donantes voluntarios sanos, siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de ética en investigación clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) (Resolución: IF-2020-01796575-UBA-SSCT#SCT\_FFYB). A partir de la muestra de sangre se realizó la purificación de los GRs. La sangre fue anticoagulada con citrato de sodio 3.2% (p/v). La sangre se lavó 3 veces con buffer RBC-2 que contenía: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 5 mM pH 7.4 a 25°C y osmolaridad 300 mOsm/L. El hematocrito se midió por centrifugación en un tubo capilar a 10.000 rpm durante tres minutos.

#### 3.2. Tinción fluorescente de GRs

##### 3.2.1. Cargado de GRs con Hoechst

Para cumplir con los objetivos propuestos fue necesario realizar una optimización del protocolo para teñir a los GRs con sondas fluorescentes y distinguir GRi de GR no infectados (GRni) dentro de los dispositivos de microfluídica.

El colorante Hoechst 33342 es una tinción de ADN que penetra en las células atravesando la membrana plasmática, se excita con luz ultravioleta y emite fluorescencia de color azul ( $\text{Ex}/\text{Em} = 361/460-490$  nm), además se une predominantemente a las regiones de adenina-timina (A-T) del ADN.

Los parásitos de *P. falciparum* se tiñeron con Hoechst, de forma tal que sólo será posible observar los núcleos de los parásitos teñidos, ya que los GRs no poseen núcleo, lo cual permite distinguir los GRi de los GRni. Para preparar la muestra que se inyectó en el dispositivo de microfluídica se realizaron distintas diluciones a partir de una solución stock de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Hoechst 33342 (Thermofisher), se dejaron teñir durante 40 minutos en un baño térmico a  $37^\circ\text{C}$ . Luego del tiempo de incubación en presencia del colorante se realizaron 3 lavados, centrifugando las muestras con buffer RBC-2.

### **3.2.2. Cargado de GRs con BCECF - AM**

El BCECF es un indicador de pH, es decir cambia su espectro de emisión con el pH, de forma tal que es utilizado para medir el pH intracelular. El BCECF-AM (Thermofisher) es lipofílico pudiendo atravesar la membrana plasmática y posee un éster que al ser hidrolizado por esterasas citoplasmáticas libera BCECF. El BCECF que es hidrofílico, permanece en el citoplasma de forma permanente emitiendo fluorescencia de color verde ( $\text{Ex}/\text{Em} = 504/527$  nm).

Para optimizar el tiempo de cargado de BCECF-AM en los experimentos se incubaron GR con  $5\ \mu\text{M}$  de BCECF-AM a  $37^\circ\text{C}$  durante distintos tiempos a un hematocrito del 2% en presencia de seroalbúmina bovina (BSA) 0,1%. Luego del tiempo de incubación en presencia de la sonda se realizaron 3 lavados con buffer RBC-2. Los GRs sin cargar fueron utilizados como control del experimento. La eficiencia de la carga en diferentes tiempos fue medida mediante la diferencia de la fluorescencia citoplasmática entre el control y células cargadas con BCECF mediante microscopía de epifluorescencia.

### **3.2.3. Cargado de GRs con PKH-26**

El colorante fluorescente PKH-26 puede unirse de manera estable a la región lipídica de la membrana celular y emitir fluorescencia roja ( $\text{Ex}/\text{Em} = 551/567$  nm). Los GR se lavaron dos veces en RBC-2, luego fueron teñidos usando el kit PKH-26 (PKH26-GL, *Sigma*, *St Louis*, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron  $100\ \mu\text{l}$  de GR con  $2\ \mu\text{l}$  de

colorante PKH-26 en diluyente C (suministrado con el kit) durante 4 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu$ l de suero fetal bovino durante 5 min a temperatura ambiente, luego se lavó 3 veces con buffer RBC-2.

### **3.2.4. Cargado de GRs con Fluo-4 AM**

El indicador de calcio fluorescente Fluo-4 se usa comúnmente como el éster acetoximetílico no fluorescente (Fluo-4 AM) que se escinde dentro de la célula para dar el Fluo-4 libre y fluorescente (Ex/Em de forma unida a  $\text{Ca}^{2+}$ : 494/506 nm). La fluorescencia de Fluo-4 aumenta en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que se suele utilizar como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Se incubaron GR con 5  $\mu\text{M}$  de Fluo-4-AM a 37°C durante distintos tiempos a un hematocrito del 2% en presencia de seroalbúmina bovina (BSA) 0,1%. Luego del tiempo de incubación en presencia de la sonda se realizaron 3 lavados con buffer RBC-2.

Los GRs teñidos en todos los experimentos fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Olympus-IX-83 acoplado a una cámara CMOS, Optimos (Qimaging).

### **3.3. Generación de GRs calentados**

Los GRs se incubaron en un baño termostatizado a un hematocrito de 2% a 45°C por 30 minutos. Luego de la incubación fueron mantenidos a temperatura ambiente. Cuando se evaluaron glóbulos rojos calentados (GRc), la condición control fue un grupo de GRs incubados a temperatura ambiente mientras se realizaba el calentamiento de los tratados.

### **3.4. Generación de GRs eriptóticos**

La ionomicina es un ionóforo y un antibiótico que se une a los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en una proporción de 1:1. La ionomicina, ha sido ampliamente utilizada para inducir la eriptosis en los eritrocitos (Bigdelou & Farnoud, 2020).

Para estudiar la captación y deformabilidad de glóbulos rojos eriptóticos (GRe), un grupo de GRs fueron tratados con ionomicina. Tanto los GRs control como los tratados tenían en sus preparados de BSA 0,1% y buffer RBC-2. Los GRe fueron teñidos con Fluo-4, (ver sección 3.2.4). Posterior a la tinción, se agrega 5  $\mu\text{M}$  de ionomicina diluida en DMSO y se deja incubar en baño térmico a 37°C durante 25 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con RBC-2. A la muestra que no fue sometida a ionomicina, se le añadió 1  $\mu\text{l}$  de DMSO (vehículo de ionomicina), y correspondió a los GRs control.

### **3.5. Cultivo de *P. falciparum***

Los estadios asexuales de los GRI con la cepa NF54 de *P. falciparum* se mantuvieron en un cultivo continuo de RPMI 1640 (Invitrogen, CA, EE) suplementado con 0.5% albumax, 22 mM glucosa, 25 mM HEPES, 0,65 mM hipoxantina y 50 µg/ml gentamicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C mediante sucesivos repiques en GRs humanos de donantes sanos de grupo y factor A+ (sección 3.1) un hematocrito de 5% con una parasitemia final de 2 -12,5% en una atmósfera compuesta por 90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, y 5% CO<sub>2</sub>. La sincronización del cultivo con la etapa anillo de *P. falciparum* se logró mediante el tratamiento con sorbitol. Los GRI fueron estudiados en las diferentes etapas de desarrollo del parásito (anillo, trofozoito y esquizonte), se denominaron a-GRI (glóbulos rojos infectados en anillo), t-GRI (glóbulos rojos infectados con trofozoito) y e-GRI (glóbulos rojos infectados con esquizonte). Antes de cada experimento, se prepararon frotis de sangre para la determinación de la parasitemia mediante tinción Diff-Quick. El porcentaje de células infectadas, es decir la parasitemia en las muestras se calculó después de contar al menos 5 campos con 200 GRs en cada uno (Alvarez y col., 2014).

Cuando los GRI fueron evaluados, los controles eran GRni dentro del cultivo. Es decir, GRs cultivados junto con los GRI pero que no habían sido infectadas aún.

El tamaño de los parásitos se midió a través de cuantificar el área ocupada por el parásito dentro del GRI en las imágenes de frotis de muestras de sangre antes de ser inyectadas en los dispositivos. El estadio se determinó de cada parásito mediante observación de frotis por microscopía de campo claro.

### **3.6. Fabricación de dispositivos de microfluídica**

Los dispositivos de microfluídica se realizaron en colaboración con el Instituto de Nanosistemas de la Universidad de San Martín. Ver Anexo para más detalles.

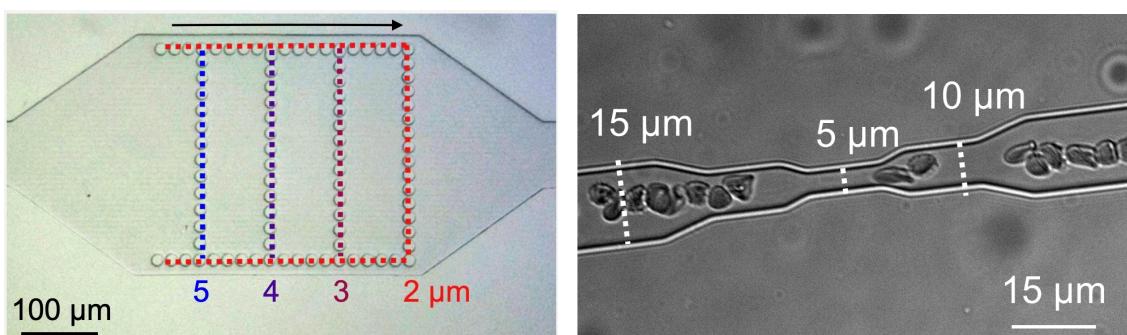
En este trabajo se utilizaron 2 tipos de dispositivos de microfluídica. Los canales de ambos dispositivos tenían una altura de 5 µm:

- Dispositivo que imita la circulación de la pulpa roja del bazo: Se utilizó un dispositivo que imita a la circulación del bazo basado en el diseño propuesto por Picot y

colaboradores (Picot y col., 2015) (Figura 22). Este dispositivo se compone de tres canales en paralelo de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro que se ensanchan a 290  $\mu\text{m}$ . Dentro de la sección ancha de cada canal existen 4 hileras de columnas perpendiculares a la dirección del canal. Las columnas están separadas por pequeños espacios o angosturas que buscan imitar las fenestraciones del bazo (Figura 8). El espacio entre las columnas es de 5, 4, 3 y 2  $\mu\text{m}$  para la primera, segunda, tercera y cuarta hilera de columnas respectivamente. Por otro lado, las hileras de columnas están rodeadas por otra hilera que delimita espacios de 2  $\mu\text{m}$  (Figura 8). De forma tal que, las células que ingresan a la porción ancha del canal pueden seguir 2 caminos posibles, por un lado la vía central que atraviesa las hileras de columnas perpendiculares al canal, o las vías laterales que evitan angosturas entre columnas. La vía central busca imitar a la circulación abierta de la pulpa roja del bazo donde las células deben atravesar angosturas en el endotelio para pasar del cordón esplénico al seno venoso. Por otro lado, las vías laterales imitan a la circulación cerrada donde las células pasan directamente de las arteriolas a los senos venosos sin tener que deformarse en las fenestraciones del bazo.

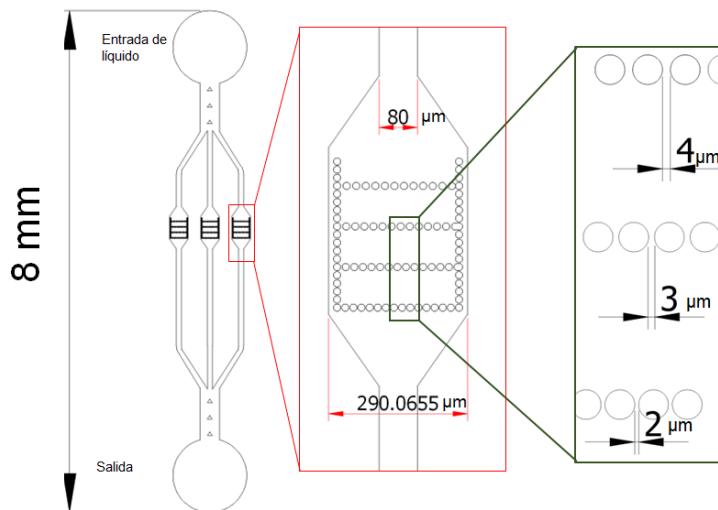
- Dispositivo que imita a los capilares: Se utilizó un dispositivo que permite emular la deformación que sufren los GRs al transitar por capilares estrechos basado en el diseño propuesto por Lizarralde-Irragorri y colaboradores (Lizarralde-Irragorri y col., 2018) (Figura 7). Este dispositivo se compone de 24 canales en paralelo en el que cada uno posee 10 angosturas en serie de 5  $\mu\text{m}$  (Figura 9). Los GRs al atravesar las angosturas se ven obligados a deformarse, lo que permite capturar imágenes de las células deformadas y estimar su deformabilidad a partir del análisis de imágenes.

En todos los casos que se utilizaron dispositivos de microfluídica el flujo se controló mediante una bomba de jeringa Alladdin, Al-1000HP (World Precision Instruments).

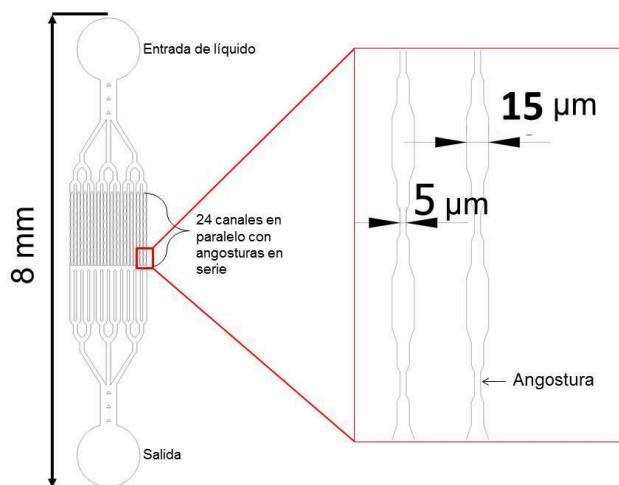


**Figura 7 | Detalle de dispositivos de microfluídica utilizados.** Izquierda, dispositivo que emula bazo humano. Las líneas punteadas indican el ancho de las angosturas delimitadas por cada hilera de columnas. Las hileras perpendiculares al canal delimitan angosturas de 5,

4, 3 y 2  $\mu\text{m}$  (ver figura 8 para más detalles). Las 2 hileras de columnas paralelas al canal delimitan angosturas de 2  $\mu\text{m}$ . La flecha superior indica la dirección del flujo. Derecha, detalle del dispositivo que emula capilares (ver figura 9 para más detalles).



**Figura 8 | Esquema del dispositivo de microfluídica que imita a la circulación de la pulpa roja del bazo.** Se muestran 2 magnificaciones de la estructura del canal. A la derecha, en el recuadro verde se indica el ancho de la angostura delimitada por las últimas 3 hileras de columnas. La función de estas angosturas es de imitar a las fenestraciones del endotelio de los senos venosos del bazo y cuantificar la retención de GRs poco deformables.



**Figura 9 | Esquema del dispositivo de microfluídica que imita a la circulación capilar.** Se muestra una magnificación de la estructura del canal. La función de las angosturas de 5  $\mu\text{m}$  es inducir la deformación de los GRs que las atraviesen.

### **3.7. Cuantificación captación GR sanos y tratados en chips de microfluídica que imitan al bazo**

La captación de GRs en el dispositivo que imita al bazo (Figura 8) se realizó haciendo circular a una mezcla de GRs control y tratados a través del dispositivo de microfluídica. Para ello se obtuvieron GRs sometidos a calentamiento, infección con *P. falciparum* o eriptosis y sus respectivos controles (ver secciones 3.3, 3.4 y 3.5).

En el caso del tratamiento térmico o eriptosis en la mitad de los experimentos los GRs tratados fueron teñidos con PKH26 (ver sección 3.2.3) que fluoresce en el rojo, mientras que los GRs control se tiñeron con BCECF-AM (ver sección 3.2.2) que fluoresce en el verde. Tanto los GRe, GRi, GRc como el control se encontraban en un hematocrito del 2%, se mezclaron a un proporción de 50% GR tratados y 50% GR control y luego se diluyeron a un hematocrito del 0.05% para ser inyectados en el dispositivo. De esta manera, a pesar de inyectar una mezcla de GRs control y tratados, las células retenidas en las angosturas pertenecientes a cada tratamiento pudieron ser identificadas por su color fluorescente.

En la otra mitad de los experimentos los GRs tratados fueron teñidos con BCECF-AM y los controles con PKH26 para evitar un sesgo por la tinción fluorescente.

En el caso de las GRi se tomó un cultivo de *P. falciparum* a una parasitemia de entre el 1-10%. En este caso, las GRi fueron consideradas las células tratadas y las GRni fueron consideradas como controles. El cultivo con *P. falciparum* fue teñido con una mezcla de BCECF-AM y Hoesch. Luego de la tinción la mezcla de GRi y GRni se diluyó a un hematocrito del 0.05% y se inyectó en el dispositivo de microfluídica. Los GRi retenidos se pudieron distinguir de los GRni retenidos debido a que los primeros se tiñen con Hoesch mientras que los segundos no, como se mencionó en la sección 3.2.1. A diferencia de los experimentos con células calentadas o sometidas a eriptosis, la proporción de células tratadas (GRi) no fue el 50% de células totales sino la parasitemia presente en el cultivo (entre 1- 10% de células tratadas del total de células inyectadas en el dispositivo).

En los experimentos, la mezcla de GRs tratados y control se inyectó a un flujo de 1  $\mu$ l/minuto a una presión aproximada de 200 mbar durante 15 minutos. Los experimentos fueron visualizados y monitoreados por microscopía de epifluorescencia. Una vez finalizado el experimento, se contabilizó la cantidad de células retenidas entre las columnas del dispositivo a distintos tiempos para cuantificar la retención y hacer el análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como el número de GRs retenidos cada 10.000 GRs que atravesaron el dispositivo que emula la pulpa roja del bazo. Se determinó que en promedio 83000 GRs atravesaron el chip en cada experimento.

$$GR \text{ retenidos cada } 10.000 = \frac{N^{\circ} \text{ de GRs retenidos * 10.000}}{N^{\circ} \text{ de GRs que atravesaron el chip}}$$

Fórmula 4 | GRs retenidos cada 10.000 de los GRs totales que atraviesan el dispositivo que emula la pulpa roja del bazo en cada experimento.

### **3.8. Cuantificación deformabilidad de GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan a los capilares**

La cuantificación de la deformabilidad de los GRs se realizó mediante el dispositivo de microfluídica que emula a la circulación capilar de los tejidos (Figura 9). Para ello se hicieron circular GRs control y fueron tomadas imágenes de las GRs en circulación dentro de las angosturas. Luego, se injectó buffer RBC-2 para remover los GRs dentro de los canales, y posteriormente se injectaron los GRs tratados, es decir sometidos a calentamiento, infección con *P. falciparum* o eriptosis.

Tanto los GRs tratados como control se injectaron en un hematocrito del 2% a un flujo de 0,3 µl/minuto a una presión aproximada de 75 mbar. En este caso, se obtuvieron videos (1 foto cada 30 segundos, durante 40 min) de luz clara de las células atravesando los canales del dispositivo (ver figura 9).

Para obtener videos de las células en tránsito se utilizó un muy bajo tiempo de exposición (0,2 milisegundos) de la cámara CMOS acoplada al microscopio.

Los experimentos fueron visualizados y monitoreados por microscopía de campo claro. Una vez finalizado el experimento, se midió el diámetro de los GRs atravesando los canales del chip, para luego calcular el índice de deformabilidad, ver fórmula 5.

$$ID = \frac{H}{DW}$$

Fórmula 5 | índice de deformabilidad (ID), utilizada para evaluar la capacidad de deformación de los GRs. Donde W, es el ancho del canal por donde pasan los GRs, H es el largo de las células y D representa la profundidad del canal.

Las presiones empleadas en 3.7 y 3.8 se encuentran en el rango fisiológico humano, es decir entre 75 y 150 mBar.

### **3.9. Análisis de datos**

El análisis de imágenes y cuantificación fue realizado mediante los softwares ImageJ y GraphPad. Las comparaciones entre resultados obtenidos con los distintos tratamientos se analizaron con Test de Student, Mann-Whitney y la prueba de Shapiro-Wilk. La significancia fue evaluada mediante el análisis no paramétrico utilizando la prueba de Mann-Whitney de dos colas. El valor p de la prueba de Shapiro-Wilk fue no significativo, lo que indica que los datos de los experimentos realizados no siguen una distribución normal, y por lo tanto no fue posible analizar mediante el Test de Student.

## **4. RESULTADOS**

La capacidad de deformación es una propiedad que poseen los GRs cuando fluyen a través de vasos más estrechos que su propio tamaño. Las fenestraciones en el bazo permiten la retención de GRs poco deformables que podrían inducir problemas en la circulación. En trastornos hereditarios, o enfermedades como la malaria el bloqueo de pequeños vasos por GRs poco deformables puede impedir la irrigación de los órganos. En estos casos, la capacidad de filtrado del bazo se ve sobre pasada provocando graves complicaciones (Picot y col., 2015).

Uno de los objetivos de este trabajo fue comprender la retención de los GRi con diferentes estadios de *P. falciparum*. Para ello se replicó la función de filtración del bazo a través de un dispositivo de microfluídica que imita la unidad funcional mínima de la pulpa roja. Este dispositivo fue propuesto por un grupo francés especializado en el uso de dispositivos de microfluídica para estudiar procesos en GRs (Picot y col. 2015). El diseño propuesto por estos autores fue utilizado para crear un nuevo dispositivo de microfluídica con las características que se muestran en la Figura 8. A pesar de estar basados en el mismo fundamento propuesto por Picot y col, el dispositivo de microfluídica utilizado en este trabajo posee diferencias importantes con el diseño original, como poseer 3 unidades filtrantes en vez de 8, de tal manera de reducir su tamaño y facilitar su manipulación.

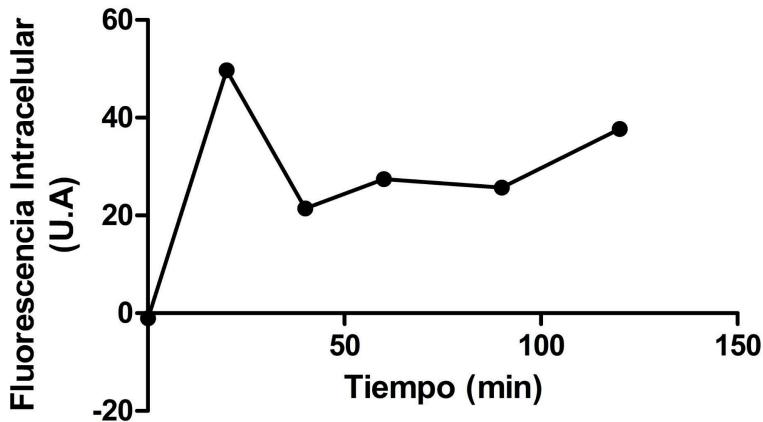
El dispositivo propuesto por Picot y col. fue validado demostrando que tenía la capacidad de retener GRi (Picot y col., 2015). Sin embargo, los resultados mencionados carecen de un tratamiento estadístico riguroso y la influencia del estadio del parásito sobre la captación del GRi no fue estudiada así como la influencia de otros procesos que disminuyen la deformabilidad del GR, como la eriptosis.

Al ser una tecnología nueva, y nunca ensayada en nuestro laboratorio fue necesario optimizar pasos esenciales en el protocolo experimental, y asimismo comprender la dinámica del funcionamiento del dispositivo de microfluídica para luego utilizar en los estudios de GRi, GRc y GRe.

### **4.1. Optimización del cargado de GRs con BCECF-AM**

El tiempo de cargado de GRs con BCECF-AM fue optimizado a partir de incubar una suspensión de GRs con 5  $\mu$ M BCECF-AM por diferentes tiempos a 37°C. A cada tiempo se midió la diferencia entre la intensidad de fluorescencia intracelular y la extracelular de los GRs (Figura 10). Es posible observar que la fluorescencia intracelular es máxima a los 20

minutos de incubación, luego se observó que la fluorescencia intracelular a lo largo del tiempo no varía significativamente. Teniendo en cuenta este resultado, el tiempo de carga utilizado para los experimentos fue de 40 minutos.



**Figura 10 | Optimización del protocolo cargado de los GRs con BCECF-AM.** La fluorescencia intracelular de GRs se calculó midiendo la diferencia entre intensidad de fluorescencia dentro de los GRs y la intensidad de fluorescencia extracelular a diferentes tiempos en las imágenes. Se alcanzó una fluorescencia óptima en los GRs cargados con BCECF-AM a partir de los 20 minutos. Los datos mostrados son resultados de un experimento representativo.

#### 4.2 Cuantificación de la captación GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan al bazo

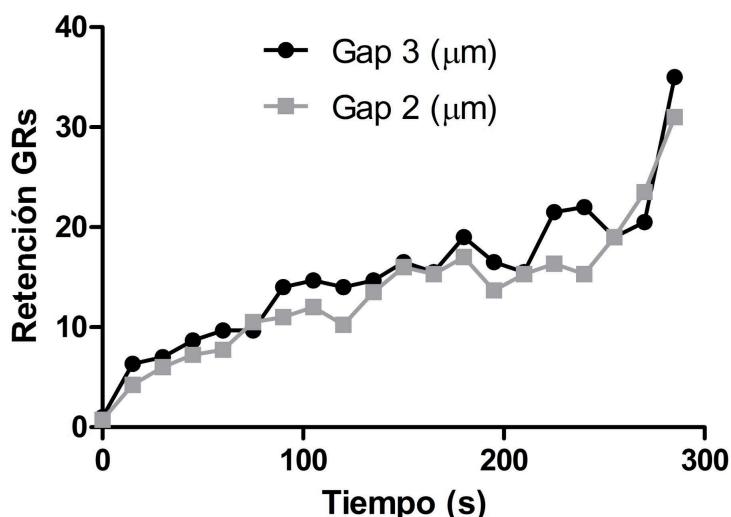
##### 4.2.1 Dinámica de la retención de GRs en el dispositivo que emula bazo

Como primer paso buscamos estudiar la dinámica de la retención de los GRs en los dispositivos de microfluídica que emulan a la pulpa roja del bazo para comprender el funcionamiento de estos dispositivos.

La retención de los GRs en función del tiempo fue medida en el dispositivo de microfluídica en los gaps de 3 y 2  $\mu\text{m}$  a través de microscopía de epifluorescencia (ver Figura 8 para más detalles). Utilizando el protocolo de tinción de GRs con BCECF-AM optimizado en la sección 4.1 se tiñeron GRs con esta sonda fluorescente para facilitar el conteo de las células dentro del dispositivo. Se incubaron GRe para inducir la eriptosis y se inyectaron en el dispositivo como indica la sección 3.7. Se observó que la retención de los GRe aumentó en el tiempo en ambos gaps (2 y 3  $\mu\text{m}$ ) (Figura 14). Se observó que la tendencia general fue que el número de células retenidas aumentó con el tiempo pero existieron fluctuaciones,

observándose pequeñas disminuciones del número de células en algunos momentos. Esto indicaría que los GRs pueden ser retenidos y posteriormente liberarse, lo que sugiere que la retención es un proceso dinámico y transitorio para la mayoría de los GRs. A lo largo del experimento el número total de GRs retenidos aumenta. Podemos deducir que se producen retenciones estables e irreversibles en las angosturas que progresivamente aumentan el número de células totales retenidas en ambos gaps como se observa en la figura 11.

El número de GRs retenidos tiene un límite. El dispositivo posee un número finito de gaps donde los GRs pueden quedar retenidos, por lo tanto inevitablemente a largos tiempos se saturarán todas las hendiduras. Consecuentemente, observamos que al saturarse el dispositivo los nuevos GRs que ingresan fluyen por las hendiduras laterales del chip dispositivo (Figura 8). Cuando se llegó a esta condición el experimento se dió por finalizado. En el bazo humano esto no sucede, ya que una vez que se retienen GRs, estos son fagocitados por macrofagos presentes en el bazo (Li y col., 2018), liberando la circulación de la pulpa roja.



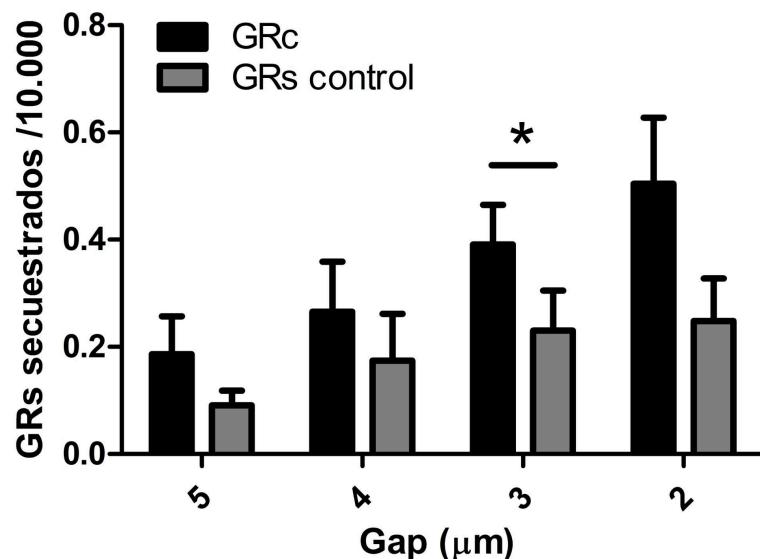
**Figura 11 | Cinética retención GRs en el dispositivo que emula a la circulación de la pulpa roja del bazo humano.** La retención de GRe en los gaps de 2 y 3  $\mu\text{m}$  se obtuvo contando el número de GRs retenidos a distintos tiempos medidos a través de microscopía de epifluorescencia. Los datos corresponden al promedio de 5 experimentos independientes. (N=5 ).

#### 4.2. Retención GR sometidos a calentamiento (GRc)

Con la finalidad de ensayar la capacidad de retener GRs poco deformables en el dispositivo de microfluídica que emula a la pulpa roja, se realizaron experimentos con GRs sometidos a

45°C durante 30 minutos. Se optó por este tratamiento ya que según la literatura, al someterlos a temperaturas extremas se reduce su tamaño, induce su esfericidad y aumenta su rigidez irreversiblemente (Picot y col., 2015). Este primer ensayo nos permitió conocer si un tratamiento que afecta la deformabilidad de GRs aumenta el número de células retenidas en el dispositivo.

Como se indica en la sección 3.7 se inyectó en el dispositivo una mezcla conteniendo 50% de GRs control y 50% de GRc. Los resultados indican que existe una tendencia hacia una mayor retención de GRc en comparación con el control, (Figura 12). A pesar de la tendencia a una mayor retención de los GRc, solo en el gap de 3  $\mu\text{m}$  se observaron diferencias significativas con respecto al control con un p-valor<0,0348.

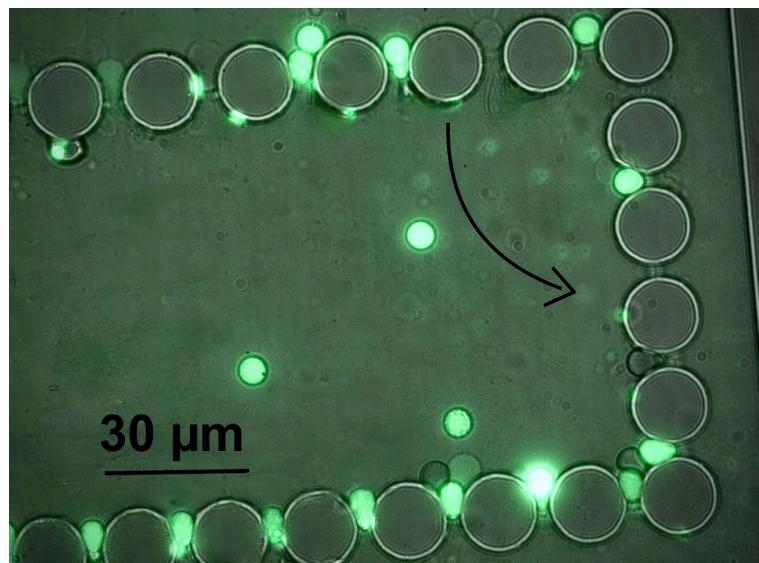


**Figura 12 | GRs y GRc secuestrados en los diferentes gaps del dispositivo que emula a la circulación de la pulpa roja.** GRc son aquellos glóbulos rojos sometidos a 45°C durante 30 minutos. Los GRs son los glóbulos rojos control. Se utilizó un test estadístico no paramétrico para evaluar la significancia de las diferencias observadas (Mann Whitney), gap 3  $\mu\text{m}$  p-valor<0,0348. Los datos mostrados corresponden al promedio +/- el error estándar del promedio (SEM) de 5 experimentos independientes.

Es posible percibir una tendencia hacia una mayor cantidad de GRs secuestrados en los gap 2 y 3  $\mu\text{m}$  en comparación con los gaps de 4 y 5  $\mu\text{m}$ . Una posible explicación es que al fluir por el dispositivo los GRs atraviesan hendiduras progresivamente más angostas, primero se encuentran con las de 5  $\mu\text{m}$  luego con las de 4  $\mu\text{m}$  y sucesivamente las de 3 y 2  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, es más probable que los GRc y control queden retenidos en aquellas de menor

diámetro (2 y 3  $\mu\text{m}$ ). Esto también sugiere que a pesar del calentamiento, los GRc poseen cierta deformabilidad para atravesar las hendiduras más grandes pero son menos capaces de atravesar las más pequeñas.

Como se observa en la figura 13, los GRc fueron teñidos con BCECF-AM mientras que los GRs control no. En la figura se observa como aquellos GRc (verde) se retienen en mayor cantidad que los GRs control. Se observa que el gap 2  $\mu\text{m}$  ha llegado a su capacidad máxima de captación, mientras que el gap 3  $\mu\text{m}$  parece tener lugares disponibles. Al saturarse las hendiduras los GRs comienzan a fluir por las vías laterales que circulan paralelas a las columnas del dispositivo (Figura 13).



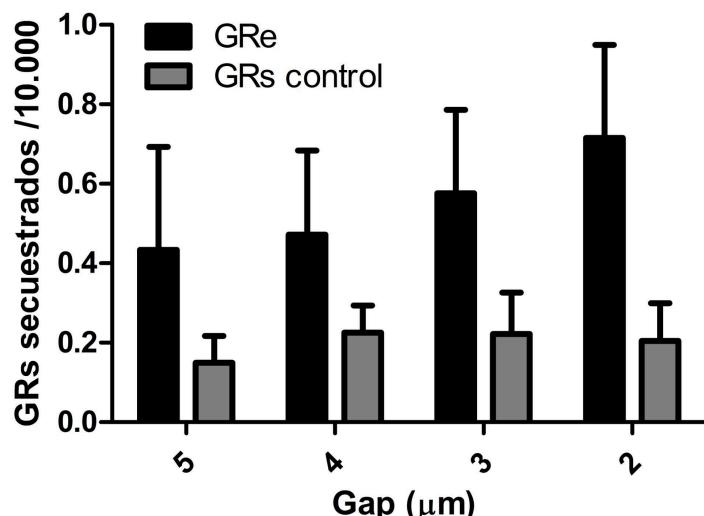
**Figura 13 | GRs y GRc retenidos en las hileras de columnas que determinan el gap 3  $\mu\text{m}$  (arriba) y gap 2  $\mu\text{m}$  (abajo) en el dispositivo que emula a la circulación en la pulpa roja.** Los GRc presentan coloración verde debido a su tinción con BCECF-AM, en contraste con aquellos que no poseen coloración son los GRs control. Visualizado mediante microscopía de epifluorescencia a 600x. A la derecha puede observarse la vía lateral por la que circulan los GRs una vez el dispositivo se satura, indicado por la flecha. Esta vía también permite imitar la circulación cerrada de la pulpa roja del bazo.

#### 4.2.3. Retención de GRs eriptóticos (GRe)

Los resultados de la figura 12 nos permitieron evidenciar que el dispositivo es capaz de discriminar entre GRs con una deformación normal y una disminuida, al menos en el gap de 3  $\mu\text{m}$ . Como se indicó en la sección 1.3 la eriptosis afecta la deformabilidad de GRs, sin embargo, este proceso y su relación con la captación en el bazo no han sido estudiados con

profundidad. Para conocer más acerca de la retención de GRe en el bazo, se analizó la retención de GRs sometidos a tratamiento con ionomicina en el dispositivo que emula a la pulpa roja del bazo. Este tratamiento es particularmente interesante no sólo porque disminuye la deformabilidad de los GRs sino porque es un proceso fisiológico como consecuencia del proceso natural de senescencia. Además, la eriptosis es estimulada en situaciones patológicas como la infección por *Plasmodium*. Se cree que la eriptosis inducida por infección contribuye al daño causado por *Plasmodium*, pero sigue siendo un tema de debate en la literatura (Scovino y col., 2022).

Se realizaron experimentos inyectando una mezcla de igual cantidad de GRe y GRc control. De manera similar a los GRc, se observó una tendencia hacia una mayor retención de GRe en comparación con el control (Figura 14).



**Figura 14 | GRs y GRe secuestrados en los diferentes gaps del dispositivo que emula a la circulación en la pulpa roja.** GRe son aquellos glóbulos rojos sometidos a eriptosis. Los GRs son los glóbulos rojos control. Test estadístico Mann-Whitney, no significativo para todos los gaps (5,4,3 y 2  $\mu\text{m}$ ). Los datos que se muestran corresponden al promedio +/- SEM de 5 experimentos independientes.

La retención de GRe no es estadísticamente significativa según el test de Mann-Whitney, en todos los gaps con respecto a sus controles, sin embargo la tendencia parece ser clara indicando que los GRe se retienen más que los GRs. La razón por la falta de significancia puede deberse a que la dispersión de los datos en este caso fue más grande, lo que produce que las diferencias en los promedios no sean significativas. Esto es notorio en el mayor error estándar observado en los GRe (Figura 14). Es posible que el tratamiento con

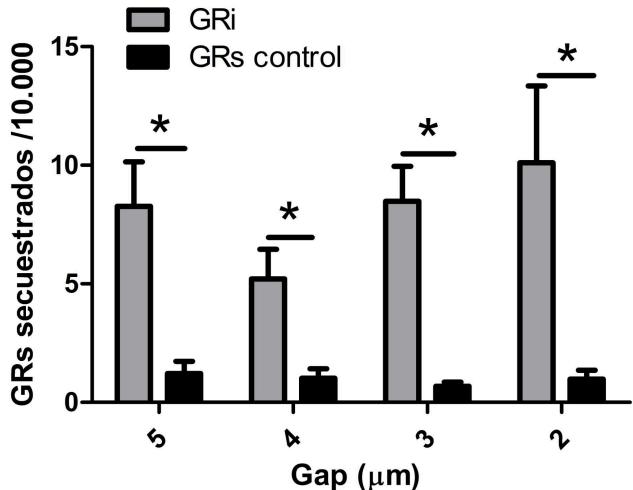
ionomicina produzca una población de GRe con diferentes volúmenes y deformabilidad, lo que aumentaría la dispersión de los datos.

Mediante los experimentos de retención de GRe y GRc en el dispositivo que emula al bazo fue posible comprender y optimizar la dinámica de los experimentos de retención, por lo que nos enfocamos en estudiar la retención de GRi.

#### **4.2.4. Retención de GRi con *P. falciparum***

Como se mencionó en la sección 1.2, durante el proceso de infección por *P. falciparum* la capacidad del bazo para eliminar los GRs alterados, se efectúa a través del reconocimiento por parte de macrófagos o a través de la retención en las fenestraciones del bazo por sus propiedades mecánicas anormales. Suponemos que a medida que *P. falciparum* crece dentro de los GR, aumenta la probabilidad de que el GRi sea retenido en el bazo. Debido a esto, los trofozoitos y esquizontes adquieren capacidades adhesivas, quedando retenidos en los tejidos y evitando pasar por el bazo.

Uno de los objetivos específicos fue determinar la captación de GRi con parásitos en diversos estadios. Como primer paso, con la finalidad de comprobar la retención de los GRi en el dispositivo que imita a la circulación de la pulpa roja del bazo se estudió la retención de GRi en muestras que poseían todas las etapas de desarrollo del parásito en alguna proporción (anillo, trofozoíto y esquizonte). La finalidad de este estudio es saber si la sola presencia del parásito es suficiente para inducir una mayor retención. Cabe destacar que la cuantificación del estadio en las muestras indicó que había mayoritariamente trofozoítos. Este aspecto se estudiará con más detalle en la sección 4.4.



**Figura 15 | GRs y GRis secuestrados en los diferentes gaps del dispositivo que emula a la circulación de la pulpa roja.** GRI son aquellos glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*. Los GRs son los glóbulos rojos control. Test estadístico Mann-Whitney, gap 5  $\mu\text{m}$  (p-valor< 0,0286), gap 4  $\mu\text{m}$  (p-valor<0,0294), gap 3  $\mu\text{m}$  (p-valor< 0,0286) y gap 2  $\mu\text{m}$ (p-valor< 0,0286). Los datos corresponden al promedio +/- el error estándar de 4 experimentos independientes.

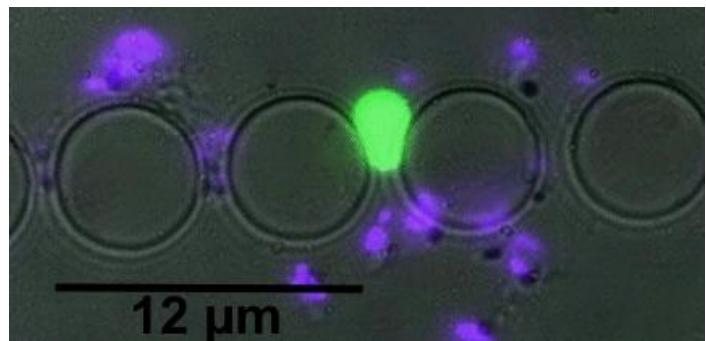
Los GRI son más retenidos que los GR controles, independientemente del tamaño de la hendidura (Figura 15).

Las hendiduras del dispositivo retienen de forma mayor a los GRI de acuerdo a lo propuesto en la literatura. La captación en el gap de 5  $\mu\text{m}$  fue similar a la observada en el gap de 2  $\mu\text{m}$  lo que sugiere que muchos GRI no son capaces de atravesar hendiduras relativamente grandes.

Otro fenómeno que se observó es la presencia de parásitos fuera de los GRI retenidos en los gaps (Figura 16). Esto podría relacionarse al fenómeno de *pitting* en los que los GRI tratados con la droga artemisinina pierden el parásito al atravesar angosturas del bazo (Del Portillo y col., 2012). En este caso, las hendiduras actuarían como obstáculos que retienen al parásito, mientras que el flujo del líquido fuerza al GR a abandonar la angostura. También, el pasaje del GRI por la hendidura podría inducir la lisis del GR dejando al parásito libre retenido.

Es importante considerar que en estos experimentos no fue analizada la fagocitosis por macrófagos que se dan naturalmente en la pulpa roja, por lo tanto estos experimentos sólo se consideran las propiedades mecánicas relacionadas con la deformabilidad del GRI. Estos resultados podrían estar indicando que la presencia del parásito interfiere con las

propiedades mecánicas naturales del GRi, y por lo tanto su retención en los gaps, que se analizará en experimentos posteriores, ver sección 4.4.



**Figura 16 | GRi y GRs retenidos en el dispositivo que emula a la circulación en la pulpa roja en el gap 3  $\mu$ m.** Los GRs control presentan coloración verde debido a su tinción con BCECF-AM, los parásitos presentan coloración violeta debido a su tinción con Hoechst 33342. Se observan algunos parásitos fuera del GRi, probablemente debido a fenómenos de *pitting* inducidos por las hendiduras del dispositivo. Visualizado mediante microscopía de epifluorescencia a 600x.

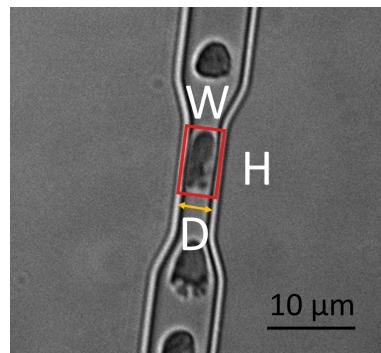
#### 4.3. Cuantificación de la deformabilidad de GR sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan a los capilares

##### 4.3.1. Cuantificación índice del deformación GRs

Como complemento de los estudios mostrados se utilizó un nuevo dispositivo de microfluídica que permite emular la circulación de los GRs al atravesar los capilares más angostos del organismo (Figura 9). Como el dispositivo que imita a la circulación de la pulpa roja del bazo, el dispositivo que imita a los capilares fue desarrollado por el mismo grupo francés, en este caso el trabajo original fue llevado a cabo por Lizarralde-Irragorri y colaboradores (Lizarralde-Irragorri y col.). En nuestro trabajo desarrollamos una versión nueva de este dispositivo basado en el mismo fundamento pero con menores dimensiones (Figura 9) para facilitar su uso.

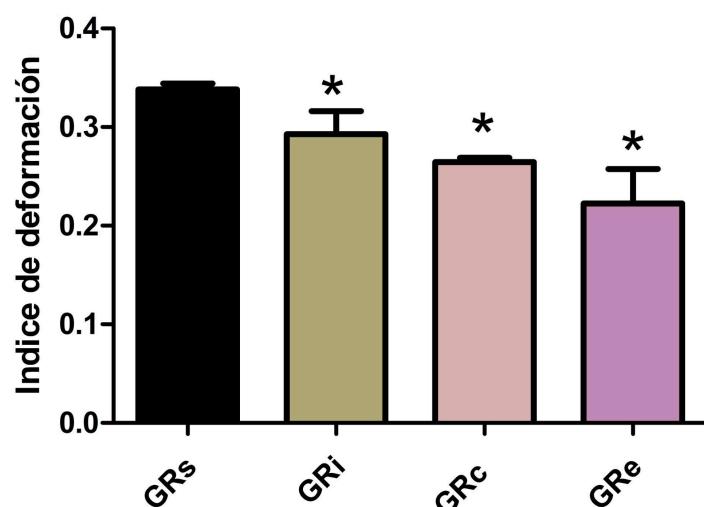
Para analizar los efectos de la infección sobre la deformabilidad del GRi en mayor profundidad, se realizaron experimentos donde se midió el índice de deformabilidad de los GRi, GRc y GRe con respecto a los GRs sanos (control) en el dispositivos de microfluídica que imitan a los capilares de la pulpa roja. Para medir el índice de deformabilidad se realizó

el procedimiento indicado en la sección 3.8. Una vez obtenidas las imágenes de los GRs atravesando las angosturas del dispositivo se analizó la relación entre el largo celular y el ancho del canal (Figura 17).



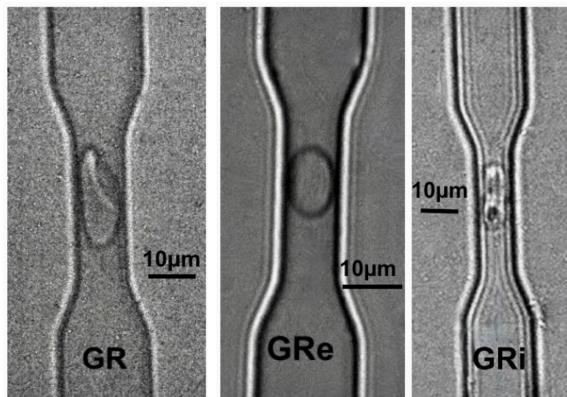
**Figura 17 | Determinación del índice de deformabilidad de los GRs.** En cada imagen se determinó el largo del GRs en la angostura (W). El índice de deformabilidad se determinó como indica la fórmula 5 de la sección 3.8.

Como se observa en la figura 18, se obtuvieron índices de deformabilidad menores en GRc, GRe y GRI en comparación con el control. En cada caso se analizaron no menos de 30 células, se determinó el índice de deformabilidad y se obtuvo el promedio. Se realizó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney, donde se encontró una diferencia significativa en el índice de deformabilidad de los GRI, GRc y GRe con respecto a los controles GRs (Figura 18 y 19). En consecuencia, la exposición a 45°C, la eriptosis y la infección con *P.falciparum* reducen la deformación de los GR.



**Figura 18 | Índice de deformabilidad GRs sanos y tratados en dispositivos de microfluídica que imitan a la circulación capilar de la pulpa roja.** Test estadístico

Mann-Whitney; GRi ( $p$ - valor < 0.0466), GRc ( $P$ < 0.0001), GRe ( $p$ - valor< 0.0054). Los resultados corresponden al promedio +/- el error estándar del índice de deformabilidad de al menos 30 células en cada condición.



**Figura 19 | GRs atravesando un capilar del dispositivo que emula a la circulación capilar.** GR (glóbulos rojos sanos), GRe y GRi. Las imágenes fueron obtenidas a partir de microscopía de campo claro, 400x.

Nuevamente, es posible observar como los tratamientos afectan la deformación del GR al fluir por los capilares. Observamos que los GR sanos adquirían una forma llamada paracaídas o paraguas, esta es la forma básica de disco bicónvexo del GR con el extremo hacia arriba aplanado por el gradiente de presión (Skalak & Branemark, 1969). En los GRs sometidos a calentamiento, eriptosis e infección con *P. falciparum* no tenían una forma de paracaídas lo que podría relacionarse con su menor índice de deformabilidad.

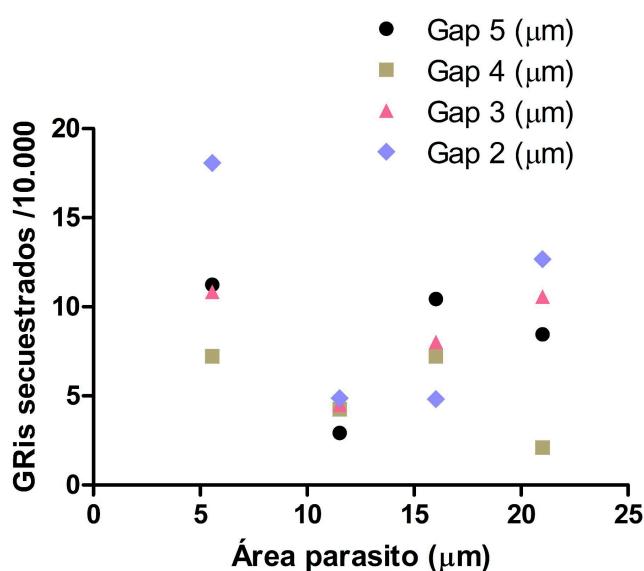
#### 4.4 Correlación del grado de captación con el tamaño del parásito o la sensibilidad al sorbitol

A partir de los resultados podemos inferir que los GRi pierden capacidad de deformación y son más retenidos que los GRs sanos en el dispositivo que emula a la circulación en la pulpa roja. Sin embargo, se desconoce qué factor del parásito es el responsable de este efecto. Para poner a prueba nuestra hipótesis de que el factor principal que contribuye a la captación de *P. falciparum* en el bazo es el tamaño del parásito dentro del GR, realizamos una correlación entre la captación en el dispositivo y el tamaño. También relacionamos la captación con el grado de desarrollo del parásito en los GRi para estudiar si en cambio la retención en el bazo estaría determinada por algún cambio inducido por el parásito en el GRi. Decidimos dividir a los GRi en 2 grupos por sensibilidad al sorbitol, por un lado los GRi con parásitos en estadío anillo (insensibles a sorbitol) y por el otro los parásitos en estadío trofozoíto y esquizizonte (sensibles al sorbitol).

#### 4.4.1. Correlación del grado de captación de GRI con el tamaño del parásito

Después de la infección en los GR, *P. falciparum* atraviesa etapas de desarrollo morfológicamente distintas, reconocibles por medio de microscopía óptica. Nuestra hipótesis sostiene que, en las etapas avanzadas, se produce una mayor retención de los GRI. Se tiene presente que en la fase de trofozoíto se produce un crecimiento rápido del parásito y se produce la formación de hemozoína (residuos de hemoglobina digerida) en la vacuola parasitófora. Asimismo, en la etapa final, esquizonte, se generan hasta 32 merozoitos (Grüning y col., 2011), lo que ocupa una gran porción del citoplasma del GRI. Por lo tanto, relacionamos el área ocupada por el parásito en el GRI con la captación en el dispositivo que imita a la circulación de la pulpa roja del bazo.

En la figura 20 se muestra la correlación entre el grado de retención en distintos gaps y el área promedio ocupada por los parásitos en la muestra inyectada en el dispositivo. Los resultados parecen sugerir que el área del parásito en el GRI no correlaciona claramente la retención en los diferentes gaps del dispositivo (Figura 20). Si bien la falta de una correlación clara podría deberse a un bajo número de experimentos independientes, la información obtenida hasta el momento sugiere que la hipótesis general del trabajo de tesis sería rechazada. De hecho, se puede percibir una leve tendencia hacia mayor número de GRI retenidos cuando el área del parásito es menor, por ejemplo la mayor captación se observó cuando el área promedio de los parásitos fue de 5  $\mu\text{m}$ .



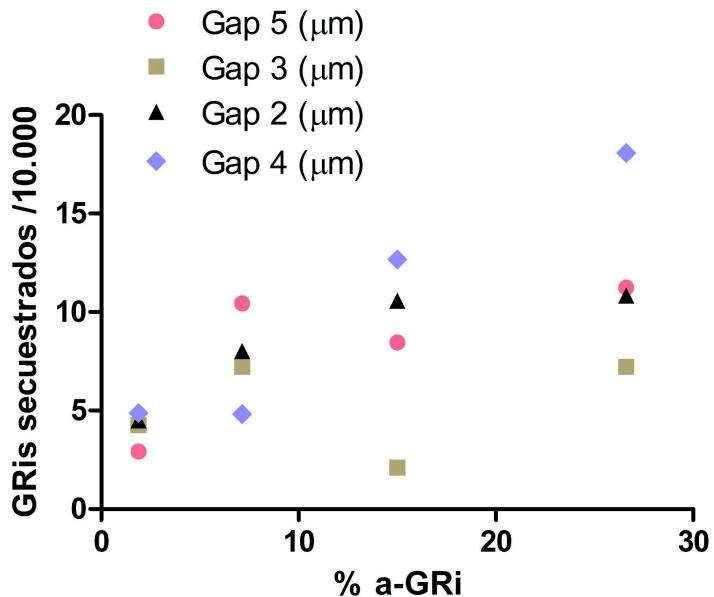
**Figura 20 | GRI secuestrados en los diferentes gaps (5, 4, 3 y 2  $\mu\text{m}$ ) del dispositivo que emula la circulación en la pulpa roja, en función del área de la vacuola parasitófora**

que contiene a *P.falciparum* ( $\mu\text{m}$ ). Cada punto corresponde a un experimento independiente distinto (se grafican 4 experimentos independientes).

#### 4.4.2. Correlación del grado de captación de GRi con la sensibilidad al sorbitol

Como se mencionó en la sección 1.2.3, la presencia de proteínas en la membrana del glóbulo rojo aumenta la permeabilidad de la membrana al sorbitol, el cual normalmente no puede penetrar la membrana del GR. De forma tal que, los estadíos maduros del parásito como trofozoíto y esquizonte se caracterizan por habitar GRi con permeabilidad aumentada al sorbitol mientras que los GRi con estadios más jóvenes como anillos no son permeables al sorbitol. Si consideramos a las modificaciones en la membrana del GR como un indicio de los cambios que ejerce el parásito sobre el GRi, podríamos suponer que los GRi en estado anillo aún no poseen una membrana plasmática alterada que se traduzca en una menor deformabilidad. Los cambios en la membrana del GRi son un proceso continuo desde los estados tempranos del parásito que modifican progresivamente la membrana a medida que el parásito crece. Algunos cambios son evidentes en estadios particulares, por ejemplo, el aumento de la permeabilidad de la membrana del GRi al sorbitol ocurre recién cuando el parásito pasa al estado trofozoito. De esta manera, la disminución de la deformabilidad de GRi podría darse en algún estadio particular de crecimiento del parásito.

Para estudiar este factor correlacionamos la proporción de parásitos en estadío anillo con respecto al número total de parásitos con el grado de captación en el dispositivo que imita a la pulpa roja del bazo. El objetivo de este análisis es conocer si una mayor proporción de parásitos jóvenes en la muestra influye en el número de GRi retenidos en el dispositivo. Llamativamente, se observa que a medida que aumenta el porcentaje de GRi en estado anillo se incrementa la retención de GRi en los gaps 5, 4, 3, y 2  $\mu\text{m}$  del dispositivo que emula a la circulación de la pulpa roja (Figura 21). Este resultado podría estar indicando que el a-GRi a pesar de ser un forma inmadura es también responsable de la retención de los GRi en el bazo. Los parásitos fuera del GRi retenidos en el dispositivo no fueron tenidos en cuenta para la cuantificación de la retención.



**Figura 21 | GRIs secuestrados en los diferentes gaps (5, 4, 3 y 2  $\mu\text{m}$ ) en función del porcentaje de a-GRIs en el dispositivo que emula a la circulación de la pulpa roja del bazo.** Se realizó un estudio del estadio de los parásitos en las muestras. Los parásitos se clasificaron en estadio anillo, trofozoito y esquizonte. Se grafica la retención en el dispositivo en función de la proporción de parásitos en estadio anillo en los GRIs (el resto de los GRIs poseían parásitos en estadio trofozoito o esquizonte). Cada punto corresponde a un experimento independiente distinto (se grafican 4 experimentos independientes).

## DISCUSIÓN

Los órganos-en-chips son un desarrollo científico y tecnológico prometedor, a partir del cual la biología se combina con la microtecnología para imitar aspectos clave de la fisiología humana. Aunque son mucho más simples que los tejidos y órganos, se ha descubierto que estos sistemas pueden servir como imitadores efectivos de la fisiología y las enfermedades humanas (Leung y col. 2022). Los órganos-en-chip son una tecnología *in vitro* que permite la experimentación con células y tejidos biológicos fuera del cuerpo. Estos dispositivos logran un alto grado de similitud con las matrices biológicas, lo que permite estudiar la respuesta de un órgano específico a una determinada perturbación. El grado de complejidad debe mantenerse al mínimo necesario para representar el ambiente biológico sin introducir factores innecesarios que dificulten el uso y el análisis del sistema. Estos modelos *in vitro* cierran la brecha entre los cultivos celulares convencionales y la experimentación con modelos animales o sujetos humanos. Es importante comprender que algunas de sus limitaciones y desafíos actuales son la dificultad de sus diseños, la complejidad de su fabricación y los procedimientos operativos para llevar a cabo experimentos que aún no se han estandarizado. Con la obtención de nuevos conocimientos sobre la naturaleza de la fisiología y fisiopatología humanas, y el desarrollo de métodos más sofisticados de microfabricación es posible que los sistemas de órgano-en-chip reemplacen a la experimentación con animales en ciertos casos (Leung y col., 2022).

En este trabajo de tesis se buscó estudiar la retención de GRi en el bazo mediante dispositivos de microfluídica. A pesar de la potencialidad de estos dispositivos, resulta crítico una adecuada optimización y caracterización para conocer su funcionalidad y limitaciones. En este trabajo se probaron nuevos diseños de dispositivos de microfluídica, basados en arquitecturas propuestas en los trabajos de Picot y colaboradores y Lizarralde-Irragorri y colaboradores (Picot y col. 2015, Lizarralde-Irragorri y col. 2018). En primera instancia se procedió a optimizar el protocolo experimental y obtener información para una mayor comprensión del funcionamiento de los mismos.

En la sección 4.1 se optimizó el protocolo de tinción utilizado en la mayoría de los experimentos para distinguir a los GR tratados de los GR control dentro del dispositivo. Esto fue crítico debido a que en cada experimento se inyectó en el chip una mezcla de GRs tratados (GRc, GRe o GRi) y GRs control. La co-inyección de GR tratados y control permite mejorar la reproducibilidad de los resultados experimentales debido a que la variación entre muestras de sangre de donantes sanos es amplia. Al inyectar los GRs tratados junto con el control es posible estudiar comparativamente la captación de GRs, reduciendo el error estándar de los promedios de experimentos independientes.

En la sección 4.2 se estudió la cinética de retención que nos permitió entender con qué velocidad los GRs se retienen en el dispositivo y en qué periodos se genera la saturación del mismo dado por la ocupación de todas las hendiduras disponibles por GR tratados o control. La saturación del dispositivo es una limitación de este ensayo *in vitro* que está relacionada con un fenómeno de interacción muy complejo que se da naturalmente en el bazo. Los macrófagos de pulpa roja (MPR) eliminan GRs senescentes y poco deformables. La malaria es una infección que tiene un impacto importante en la deformabilidad de los GRI, lo cual implica una profunda reestructuración de la membrana y el citoesqueleto de los GRI (Klei y col., 2017). Los GRs deben pasar a través de las hendiduras endoteliales del seno venoso para volver a entrar en la circulación sanguínea. Los MPR eliminarán de la circulación las células retenidas en las fenestraciones del bazo (de Back y col., 2014.).

Luego de comprender la dinámica del dispositivo, se procedió a estudiar tratamientos que reducen la deformabilidad de los GRs. Se realizaron experimentos con GRs sometidos a 45° C durante 30 minutos. Se optó por este tratamiento ya que según investigaciones previas, al someterlos a temperaturas altas aumenta la rigidez celular irreversiblemente, lo que conduce a una mayor retención en el bazo (Picot y col., 2015). De forma tal que este primer ensayo nos permitió identificar si un tratamiento que afecta la deformabilidad de los GRs se ve reflejado en un mayor número de células retenidas en el dispositivo. Los resultados de los experimentos con GR control dieron una diferencia estadísticamente significativa en el gap de 3  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, en el caso de los experimentos de GRs sometidos a eriptosis los resultados no dieron diferencias significativas para ninguno de los gaps y una incertidumbre sobre el valor del promedio más grande. Esto no era lo esperado y puede deberse a que la ionomicina produce una población heterogénea de GRs que aumenta la variación entre experimentos. No obstante, creemos que la retención de GRe en el bazo es un fenómeno interesante para estudiar más detalladamente. Durante la infección por *P. falciparum*, el parásito induce estrés oxidativo en el GR hospedador, promoviendo la apertura de los canales de calcio e induciendo la eriptosis. Por lo tanto, la eriptosis en los GRI por *P. falciparum* se produce como consecuencia del desarrollo normal del parásito, sin embargo sigue siendo un tema de debate en la literatura (Scovino y col., 2022).

Al margen de la significancia, fue posible percibir una tendencia hacia una mayor retención en los GRs tratados (GRe y GRc) con respecto a los GRs control. Estos resultados nos llevaron a la conclusión de que efectivamente el dispositivo emulaba la captación en el bazo, lo que nos llevó a medir posteriormente la retención con GRI.

En la sección 4.2.4 observamos que los GRI se retuvieron más que los GR control, de forma estadísticamente significativa para todos los gaps del dispositivo (5, 4, 3 y 2  $\mu\text{m}$ ). Esto se

condice con lo esperado según la información de la literatura, por lo tanto el dispositivo y el protocolo experimental fueron aproximaciones adecuadas para estudiar nuestros objetivos relacionados con la retención de GRi con *P. falciparum*. Se sabe que el volumen de los GRi no se ve modificado a medida que progresá la infección (Expósito y col. 2010). Esto se debe en parte a que el parásito logra compensar el aumento de la presión coloidosmótica por la degradación de la hemoglobina, manteniendo así el volumen constante. Sin embargo, el parásito dentro del GRi si sufre importantes cambios en su tamaño a medida que progresá el ciclo (Esposito y col. 2010). Posiblemente, existan otras variables que afectan la deformabilidad, y posterior retención en el bazo de los GRi independientemente del tamaño del parásito, es decir del estadio y de las modificaciones inducidas por parásitos en el GRi. Llamativamente, durante los experimentos fue posible observar parásitos fuera de los GRi retenidos en las angosturas del dispositivo (Figura 16). Esto podría deberse a que la retención provoca la lisis del GRi o a fenómenos como el *pitting*. El *pitting* es un proceso que se da en los GRi tratados con la droga antimalárica artemisinina, en los que el pasaje por la pulpa roja del bazo hace que pierdan el parásito en las fenestraciones (Ndour y col. 2015). También, la presencia de parásitos libres podría deberse a la lisis de los GRi al momento de retenerse en la hendidura. La presencia de parásitos fuera del GRi podría adjudicarse principalmente a las formas maduras del mismo. A medida que *P. falciparum* crece, los GRi se adhieren al endotelio microvascular (White, 2017). Los GRi circulantes pueden ser destruidos en el bazo, pero el parásito evita esto mediante el desarrollo de varios mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador. En general, los mecanismos de evasión se dividen en dos, (1) expresión de proteínas antigenicas variables en la superficie que ayudan a evadir al sistema inmunológico del hospedador, y (2) evitar el secuestro esplénico, mediante la adherencia de GRi en el endotelio vascular, lo que evita el pasaje por el bazo (Gomes y col., 2016). Por lo tanto, es de esperarse que los GRi con estadios maduros no circulen por el bazo en el hospedador, ya que normalmente están adheridos al endotelio del resto de los vasos sanguíneos. De forma tal que nuestros resultados indicarían que los GRi maduros son muy frágiles y serían fácilmente removidos del GR en el bazo.

Paralelamente, nuestros estudios de captación fueron complementados con estudios de deformabilidad usando un dispositivo que imita la circulación capilar. En la sección 4.3 fue posible cuantificar mediante el índice de deformabilidad la pérdida de la misma en los GRs tratados con respecto a los GRs sanos (controles), observando diferencias significativas para todos los tratamientos. Esto se condice con la mayor retención de los GRc, GRe y GRi en el bazo con respecto a los GRs control. De esta manera, la captación en el bazo podría explicarse por una menor deformabilidad. Un aumento en su rigidez podría afectar su

capacidad para fluir o deformarse en respuesta a fuerzas mecánicas, lo cual puede producir graves implicancias fisiológicas.

La hipótesis general de la tesis, sostiene que el principal factor que contribuye a la captación de *P. falciparum* en el bazo es el tamaño del parásito dentro del GRI. Nuestros resultados sugieren que debería ser rechazada. Las razones podrían no estar relacionadas de forma directa con el tamaño (estimado a través del área en imágenes de microscopía en nuestro caso) del parásito, o simplemente no es la única causa. A partir de los resultados obtenidos en 4.4.2, es posible inferir que la proporción de parásitos en estado anillo en las muestras analizadas podría estar relacionado con una mayor retención de los GRIs en el bazo. La expresión de proteínas relacionadas con el transporte de solutos por parte del parásito son exportadas hacia el GR hospedador y alcanza su punto máximo en los anillos, lo que sugiere que se producen múltiples modificaciones en la célula hospedador durante esta etapa (Ginsburg & Stein, 2004). Creemos que pueden existir otros efectos que podrían explicar la retención significativa de los GRIs por sobre los GRs sanos. El tamaño del parásito interfiere con las propiedades mecánicas naturales del GR, sin embargo durante la infección el parásito exporta cientos de proteínas más allá de la membrana de la vacuola parasitófora a numerosos lugares dentro del GRI a través de una red de tráfico, como las hendiduras de Maurer, que se unen a la parte inferior de la membrana de los GRIs aproximadamente 20 horas después de la invasión (Maier y col., 2009). De forma tal que, las alteraciones en la membrana de los GRIs producen modificaciones en el citoesqueleto, en sus propiedades de deformabilidad, y cambios en las propiedades de permeabilidad (Prajapati, 2014).

Futuros experimentos utilizando estos dispositivos y otras estrategias complementarias para evaluar retención nos permitirán obtener más información para poder comprender qué factor del parásito es crítico para su retención. Esperamos que esta información sea útil para el diseño de nuevas terapias que apunten a facilitar la captación de GRIs en el bazo y su eliminación por parte del sistema inmune. Esta estrategia sería de gran ayuda para el control de la patología en los individuos infectados y para facilitar la curación de los pacientes.

## CONCLUSIÓN

Los dispositivos de microfluídica utilizados mostraron similitud en la capacidad de retención de GRs poco deformables con la pulpa roja del bazo. Se pudo evaluar la captación GRI. Además pudimos medir la deformabilidad de GRs mediante un dispositivo de microfluídica que nos permitió relacionar la mayor captación con una menor deformabilidad. Nuestros resultados sugieren que la hipótesis de trabajo debería ser rechazada, ya que se observó que el tamaño del parásito dentro del GRI no contribuye a la captación de *P. falciparum* en el

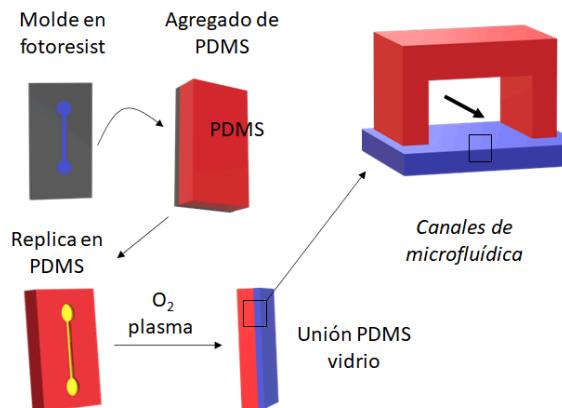
bazo. Creemos que las variables que determinan la retención en el bazo podrían no estar relacionadas de forma directa con el tamaño del parásito, o simplemente el tamaño no es la única causa. La biología de *P. falciparum* es sumamente compleja, sin embargo creemos que estas aproximaciones a través de la microfluídica son efectivas para obtener información acerca de esta enfermedad.

## ANEXO

### Fabricación de dispositivos de microfluídica

La fabricación de los dispositivos de microfluídica utilizados se realizó gracias a un trabajo en colaboración con el Instituto de Nanosistemas de la Universidad Nacional de San Martín y el Instituto Max Planck de Investigación Médica de Heidelberg, Alemania. Se fabricó un molde impreso en fotoresistor SU-8 por fotolitografía (Figura 22). Para su fabricación se realizó el depósito de una capa de SU-8 3005 sobre un wafer de silicio de 2 pulgadas por *spin coating* a 4000 rpm durante 30 segundos y se realizó un soft bake durante 3 minutos a 95°C en una sala limpia lo cual dejó una película de alrededor de 5 µm. Posteriormente se irradió el diseño utilizando un litógrafo (Heidelberg Instruments) para luego desarrollar el molde sumergiendo en desarrollador para SU-8. Finalmente, se realizó un hard bake incubando el molde a 150° C por 30 minutos.

Para realizar los dispositivos de microfluídica se agregó polidimetilsiloxano (PDMS) líquido con 10% de agente entrecruzante sobre el molde en SU-8, se dejó en reposo durante 2 horas a 65° C para luego solidificar el PDMS. Luego, se separó la réplica de PDMS del molde y se perforaron los orificios de entrada y salida. El PDMS fue unido a unos cubreobjetos de vidrio previamente limpiados durante 1 hora con solución de Piranha (3 partes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado : 1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para luego ser enjuagados con abundante agua MilliQ. El PDMS y el cubreobjetos de vidrio fueron sometidos a un tratamiento de plasma de O<sub>2</sub> durante 1 minuto a 400 milliTorr lo cual permite unir el cubreobjetos de vidrio al PDMS por enlaces Si-O-Si sellando los canales.



**Figura 22 | Proceso de fabricación de dispositivos de microfluídica.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, C. L., Schachter, J., de Sá Pinheiro, A.A., Silva, L. D. S., Verstraeten, S.V., Persechini, P.M., & Schwarzbaum, P.J. (2014). Regulation of extracellular ATP in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. *PloS one*, 9(5), e96216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096216>
- An, X., Debnath, G., Guo, X., Liu, S., Lux, S.E., Baines, A., Gratzer, W., & Mohandas, N. (2005). Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochemistry*, 44(31), 10681–10688. <https://doi.org/10.1021/bi047331z>
- Barbalato, L., & Pillarisetty, L.S. (2022). *Histology, Red Blood Cell*. StatPearls. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30969524/>
- Barshtein, G., Wajnblum, D., & Yedgar, S. (2000). Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophysical journal*, 78(5), 2470–2474. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76791-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76791-9)
- Baskurt, O. K., & Meiselman, H. J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 29(5), 435–450. <https://doi.org/10.1055/s-2003-44551>
- Beebe, D. J., Mensing, G. A., & Walker, G. M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering*, 4, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>
- Berg, C., Engels, I., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S., Schulze-Osthoff, K., & Wesselborg, S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and

- caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(12), 1197-206. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400905>
- Bigdelou, P., & Farnoud, A. M. (2020). Induction of Eryptosis in Red Blood Cells Using a Calcium Ionophore. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (155)10, 3791/60659. <https://doi.org/10.3791/60659>
- Blank, M., & Burmester, T. (2012). Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from a membrane-bound ancestor. *Molecular biology and evolution*, 29(11)(3553–3561). <https://doi.org/10.1093/molbev/mss164>
- Bosch, F. H., Werre, J. M., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Huls, T. H., Willekens, F. L., & Halie, M. R. (1992). Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood*, 79(1), 254–260.
- Brun, J. F., Varlet-Marie, E., Myzia, J., Raynaud de Mauverger, E., & Pretorius, E. (2021). Metabolic Influences Modulating Erythrocyte Deformability and Eryptosis. *Metabolites*, 12(1), 4. <https://doi.org/10.3390/metabo12010004>
- Brun, J.-F., Varlet-Marie, E., Myzia, J., Raynaud de Mauverger, E., & Pretorius, E. (2022). Metabolic Influences Modulating Erythrocyte Deformability and Eryptosis. *Metabolites*, 12, 4. <https://doi.org/10.3390/metabo12010004>
- Buffet, P. A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., Turner, G., & Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, 117(2), 381–392. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-202911>
- CDC - Malaria - About Malaria - Disease*. (n.d.). Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved 2023, from <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
- Chen, L. T. (1978). Microcirculation of the spleen: and open or closed circulation? *Science (New York, N.Y.)*, 201(4351), 157–159. <https://doi.org/10.1126/science.663644>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167(3), 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Cowman, C. A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167(3), 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in physiology*, 5, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00009>
- Definición de bazo - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. (n.d.). National Cancer Institute. Retrieved April 11, 2023, from

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/bazo>

- Del Portillo, H. A., Ferrer, M., Brugat, T., Martin-Jaular, L., Langhorne, J., & Lacerda, M. V. (2012). The role of the spleen in malaria. *Cellular microbiology*, 14(3), 343–355. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01741.x>
- Elizalde-Torrent, A., Trejo-Soto, C., Méndez-Mora, L., Nicolau, M., Ezama, O., Gualdrón-López, M., Fernández-Becerra, C., Alarcón, T., Hernández-Machado, A., & Del Portillo, H. A. (2021). Pitting of malaria parasites in microfluidic devices mimicking spleen interendothelial slits. *Scientific reports*, 11(1), 22099. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01568-w>
- Esposito, A., Choimet, J.B., Skepper, J.N., Mauritz, J.M., Lew, V.L., Kaminski, C.F., & Tiffert, T. (2010). Quantitative imaging of human red blood cells infected with Plasmodium falciparum. *Biophysical journal*, 99(3), 953-960.
- Föller, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2009). Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 24(3-4), 133–140. <https://doi.org/10.1159/000233238>
- Franken, L., Schiwon, M., & Kurts, C. (2016). Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cellular microbiology*, 18(4), 475–487. <https://doi.org/10.1111/cmi.12580>
- G. E., Buffet, P. A., Suresh, S., & Dao, M. (2023). Microfluidic study of retention and elimination of abnormal red blood cells by human spleen with implications for sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(6), e2217607120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2217607120>
- Ginsburg, H., & Stein, W. D. (2004). The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques. *The Journal of membrane biology*, 197(2), 113–134. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-0646-7>
- Glomski, C. A., & Tamburlin, J. (1990). The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. II. The early or invertebrate prototypes. *Histology and histopathology*, 5(4), 513–525.
- Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*, 7, 1617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617>
- Götting, M., & Nikinmaa, M. (2015). More than hemoglobin - the unexpected diversity of globins in vertebrate red blood cells. *Physiol Rep*, 3(2)(e12284). [10.14814/phy2.12284](https://doi.org/10.14814/phy2.12284)

- Gottlieb, Y., Topaz, O., Cohen, L. A., Yakov, L. D., Haber, T., Morgenstern, A., Weiss, A., Chait Berman, K., Fibach, E., & Meyron-Holtz, E. G. (2012). Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica*, 97(7), 994–1002. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.057620>
- Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefahr, J., Gilberger, T. W., & Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of Plasmodium falciparum blood stages in four dimensions. *Nature communications*, 2, 165. <https://doi.org/10.1038/ncomms1169>
- Hardison, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12). 5675–5679
- Higgins, J. M. (2015). Red blood cell population dynamics. *Clinics in laboratory medicine*, 35(1), 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.002>
- Hosseini, S. M., & Feng, J. J. (2012). How malaria parasites reduce the deformability of infected red blood cells. *Biophysical journal*, 103(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.026>
- Howick, V. M., Russell, A. J. C., Andrews, T., Heaton, H., Reid, A. J., Natarajan, K., Butungi, H., Metcalf, T., Verzier, L. H., Rayner, J. C., Berriman, M., Herren, J. K., Billker, O., Hemberg, M., Talman, A. M., & Lawniczak, M. K. N. (2019). The Malaria Cell Atlas: Single parasite transcriptomes across the complete Plasmodium life cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6455), eaaw2619. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2619>
- Hwa, C., Sebastian, A., & Aird, W. C. (2005). Endothelial biomedicine: its status as an interdisciplinary field, its progress as a basic science, and its translational bench-to-bedside gap. *Endothelium : journal of endothelial cell research*, 12(3), 139–151. <https://doi.org/10.1080/10623320500192016>
- Kannan, R., Labotka, R., & Low, P. S. (1988). Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major site of autologous antibody binding. *The Journal of biological chemistry*, 263(27), 13766–13773.
- Klei, T. R., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2017). From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Frontiers in immunology*, 8, 73. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>
- Lang, F., Lang, E., & Föller, M. (2012). Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, 39(5), 308–314. <https://doi.org/10.1159/000342534>

- Leung, C.M., de Haan, P., & Ronaldson-Bouchard, K. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nat Rev Methods Primers*, 2, 33. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>
- Li, H., Lu, L., Li, X., Buffet, P. A., Dao, M., Karniadakis, G. E., & Suresh, S. (2018). Mechanics of diseased red blood cells in human spleen and consequences for hereditary blood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), 9574–9579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806501115>
- Liu, M., & Yang, J. (2009). Electrokinetic effect of the endothelial glycocalyx layer on two-phase blood flow in small blood vessels. *Microvascular research*, 78(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.04.002>
- Lizarralde Iragorri, M. A., El Hoss, S., Brousse, V., Lefevre, S. D., Dussiot, M., Xu, T., Ferreira, A. R., Lamarre, Y., Silva Pinto, A. C., Kashima, S., Lapouméroulie, C., Covas, D. T., Le Van Kim, C., Colin, Y., Elion, J., Français, O., Le Pioufle, B., & El Nemer, W. (2018). A microfluidic approach to study the effect of mechanical stress on erythrocytes in sickle cell disease. *Lab on a chip*, 18(19), 2975–2984. <https://doi.org/10.1039/c8lc00637g>
- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, k., & Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4686), 531–533. <https://doi.org/10.1126/science.2578228>
- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., & Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature reviews. Microbiology*, 7(5), 341–354. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2110>
- Mebius, R., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology*, 5(8), 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Meibalan, E., & Marti, M. (2017). Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(3), a025452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025452>
- Mohandas, N. (2016, January). Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 56(1), 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.09.001>
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Moras, M., Lefevre, S. D., & Ostuni, M. A. (2017). From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Frontiers in physiology*, 8, 1076. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076>

- Ndour, P.A., Lopera-Mesa, T.M., Diakité, S.A., Chiang, S., Mouri, O., Roussel, C., Jauréguiberry, S., Biligui, S., Kendjo, E., Claessens, A., Ciceron, L., Mazier, D., Thellier, M., Diakité, M., Fairhurst, R.M., & Buffet, P.A. (2015). Plasmodium falciparum clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. *The Journal of infectious diseases*, 211(2), 290–297. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu427>
- Oberleithner, H. (2013). Vascular endothelium leaves fingerprints on the surface of erythrocytes. *European journal of physiology*, 465(10), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1288-y>
- OMS. (2023, March 29). *Paludismo*. Paludismo. Retrieved April 17, 2023, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- Picot, J., Ndour, P. A., Lefevre, S. D., El Nemer, W., Tawfik, H., Galimand, J., Da Costa, L., Ribeil, J. A., de Montalembert, M., Brousse, V., Le Pioufle, B., Buffet, P., Le Van Kim, C., & Français, O. (2015). A biomimetic microfluidic chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen. *American journal of hematology*, 90(4), 339–345. <https://doi.org/10.1002/ajh.23941>
- Prajapati, S.K. (2014). Alteration of the Red Blood Cell Membrane. *Encyclopedia of Malaria*. Springer, New York, NY, 1–12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8757-9\\_37-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8757-9_37-1)
- Repsold, L., & Joubert, A. M. (2018). Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *BioMed research international*, 9405617. <https://doi.org/10.1155/2018/9405617>
- Sato, S. (2021). Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of physiological anthropology*, 40(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>
- Scovino, A. M., Totino, P. R. R., & Morrot, A. (2022). Eryptosis as a New Insight in Malaria Pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 13, 855795. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855795>
- Skalak, R., & Branemark, P. I. (1969). Deformation of red blood cells in capillaries. *Science (New York, N.Y.)*, 164(3880), 717–719. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.717>
- Steiniger, B.S., Pfeffer, H., & Gaffling, S. (2022). The human splenic microcirculation is entirely open as shown by 3D models in virtual reality. *Sci Rep*, 12, 16487. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19885-z>
- Thiagarajan, P., Parker, C. J., & Prchal, J. T. (2021). How Do Red Blood Cells Die? *Frontiers in physiology*, 12, 655393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.655393>
- Tomaiuolo, G. (2014, September 17). Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, 051501(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189537/#c2>

- van der Helm, M. W., van der Meer, A. D., Eijkel, J. C., van den Berg, A., & Segerink, L. I. (2016). Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue barriers*, 4(1), e1142493. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1142493>
- Vinogradov, S. N., & Moens, L. (2008). Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *The Journal of biological chemistry*, 283(14), 8773–8777
- Wang, C. H., & Popel, A. S. (1993). Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries. *Mathematical biosciences*, 116(1), 89–110. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(93\)90062-f](https://doi.org/10.1016/0025-5564(93)90062-f)
- White, N. J. (2017). Malaria parasite clearance. *Malaria journal*, 16(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1731-1>
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Zhang, R., & Brown, F. L. H. (2008). Cytoskeleton mediated effective elastic properties of model red blood cell membranes. *The Journal of Chemical Physics*, 129(6), 065101. <https://doi.org/10.1063/1.2958268>
- Zwaal, R.F., & Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4), 1121–1132.