



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, INGENIERÍA Y AGRIMENSURA

# TESIS DE DOCTORADO EN FÍSICA

---

ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE TÉCNICAS ÓPTICAS PARA LA  
CARACTERIZACIÓN Y MODELIZACIÓN DE INTERACCIONES  
ENTRE COMPONENTES SANGUÍNEOS.

APLICACIÓN AL DESARROLLO INNOVATIVO DE INSTRUMENTAL EN  
FÍSICA BIOMÉDICA

---

**Autor:** Lic. Martín Alejandro Toderi Cicchini

**Directora:** Dra. Bibiana D. Riquelme

**Codirector:** Dr. Gustavo Galizzi

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Física

Trabajo realizado en el Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR)

Rosario, Argentina, 2020.

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, la Dra. Bibiana Riquelme por estar siempre a disposición, su gran entusiasmo y pasión hizo de esta tarea una experiencia de aprendizaje única para mí. Quiero agradecer a mi codirector el Dr. Gustavo Galizzi por su constante aporte de ideas y vitales guías. De ambos agradezco sus buenos consejos, su enorme calidez y su confianza en mí. Le estoy agradecido a la Dra. Mariel Galassi que me encaminó hacia la Física Médica. A los Drs. Lucas Tendela y Horacio Castellini por darme una mano siempre. A la Dra. Analía Alet que me ayudó con los aspectos biológicos de esta tesis y al Dr. Dominique Dumas por recibirme en Francia. También, gracias a mis compañeros, en especial a Julián, Tanea, Carolina y Verónica.

Agradezco el total apoyo económico del CONICET, así como también a la Sociedad Internacional para la Óptica y la Fotónica SPIE por la financiación otorgada a ciertas actividades.

En último lugar, quiero agradecer a mi familia. Agradezco a mi querida esposa Lara, por acompañarme desde hace años, brindándome su apoyo y cariño constante. Gracias a mi nona que siempre se vio dedicada a sus dos nietos. Gracias a mi hermano Gabriel a quien tengo infinito afecto. Finalmente, gracias a mamá y a papá, por siempre darme todo lo que quise y más, por velar por mi bienestar constantemente y por haberme enseñado y apoyado en todos los momentos de mi vida, por convertirme en la persona que soy, esto es para ellos.

# Publicaciones

Los resultados de esta tesis doctoral se dieron a conocer mediante las siguientes publicaciones:

- **Toderi** M. A., Galizzi G. E., Riquelme B. D., Dumas D., “Study of the red blood cell aggregation by coherent anti-Stokes Raman spectroscopy”, Proc. SPIE 11251, Label-free Biomedical Imaging and Sensing 2020; doi: 10.1117/12.2543073.
- **Toderi** M. A., Riquelme B. D., Galizzi G. E., “An experimental approach to study the red blood cell dynamics in a capillary tube by biospeckle laser”, Optics and Lasers in Engineering, vol. 127, 2020. doi: 10.1016/j.optlaseng.2019.105943.
- Ponce de León P., **Toderi** M., Castellini H., Riquelme B. “Red blood cell alterations by in vitro action of *Trichinella spiralis* newborn larvae”, Global Journal of Biotechnology and Biomaterial Science, 6(1), 007–012. 2020. doi: 10.17352/gjbbs.000012.
- **Toderi** M. A., Riquelme B. D., Galizzi G. E., “Study of Red Blood Cell interaction by side scattering and forward scattering biospeckle”, en Latin America Optics and Photonics Conference, OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2018), paper Tu4A.42. doi: 10.1364/LAOP.2018.Tu4A.42.
- Ciunne M. F., **Toderi** M. A., Riquelme B. D. “Computational analysis of red blood cell aggregation kinetics to obtain representative parameters in healthy donors”, Series on Biomechanics, vol.31, no.3, pp. 36-41, 2017.

- Buszniez P., Lerda N., **Toderi** M., DArrigo M., Riquelme B. D. “Hemorheological action of trigonelline on in vitro glycated red blood cells”, Series on Biomechanics, vol.31, no.3, pp. 30-35, 2017.
- **Toderi** M. A.; Lerda N., Buszniez P., Riquelme B. D. “An optical chip aggregometer based on laser transmission to detect alterations in the aggregation of glycosylated RBC”, Proc. SPIE 10376, Novel Optical Systems Design and Optimization XX, 103760U, 2017; doi: 10.1117/12.227332.
- **Toderi** M. A., Castellini H., Riquelme B. “Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip”, Journal of Biomedical Optics, vol. 22, no. 1, 017003, 2017. doi:10.1117/1.JBO.22.1.017003.
- **Toderi** M., Batista da Silva, M. V., Londero C., Castellini H., Alet N., Riquelme B. D., Alet A. “Evaluation of dynamic viscoelastic alterations in erythrocytes treated in vitro with different anesthetic drugs”, Revista Latinoamericana de Física Médica, 2016.
- Ponce de León P., **Toderi** M. A., Castellini H., Riquelme B. D. “In vitro alterations of erythrocyte aggregation by action of *Trichinella spiralis* newborn larvae”, Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol. 65, no. 2, pp. 195-204, 2017. doi:10.3233/CH-16158.

# Índice general

Motivación y objetivos	IX
Resumen	XI
<b>I Antecedentes del tema y fundamentos</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Componentes de la sangre y determinantes de su dinámica . . . . .	2
1.1.1. Características de los glóbulos rojos . . . . .	2
1.1.2. La membrana del glóbulo rojo . . . . .	3
1.1.3. Características de la membrana eritrocitaria . . . . .	7
1.1.4. Importancia de la carga superficial del glóbulo rojo . . . . .	9
1.2. El fenómeno de adhesión inter-eritrocitaria . . . . .	10
1.3. Aspectos históricos . . . . .	12
1.3.1. Estudios de la interacción dextrán-eritrocito . . . . .	13
1.3.2. Investigaciones recientes . . . . .	14
1.4. Patologías con alteraciones hemodinámicas . . . . .	16
<b>2. Modelización de la interacción entre glóbulos rojos</b>	<b>19</b>
2.1. Modelo de doble capa difusa y el potencial Zeta . . . . .	19
2.2. Modelo de interfase de Stern . . . . .	22

2.3.	Teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) . . . . .	24
2.4.	Teoría de Skalak para la agregación eritrocitaria . . . . .	26
2.5.	Teoría de <i>Depletion</i> y Modelo de <i>Bridging</i> . . . . .	27
2.5.1.	<i>Depletion</i> . . . . .	29
2.5.2.	<i>Bridging</i> . . . . .	33
<b>3.</b>	<b>Análisis experimental de la dinámica de interacción eritrocitaria</b>	<b>37</b>
3.1.	Técnicas de transmisión y retrodifusión de la luz . . . . .	38
3.2.	Técnica de Biospeckle . . . . .	40
3.2.1.	El fenómeno de speckle láser . . . . .	40
3.2.2.	Formación de una distribución de speckle . . . . .	41
3.2.3.	Biospeckle láser (BSL) . . . . .	48
3.3.	Análisis digital de imágenes microscópicas . . . . .	49
3.3.1.	Microscopía CARS . . . . .	50
<b>II</b>	<b>Desarrollos experimentales</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>Técnica de transmisión de luz</b>	<b>57</b>
4.1.	Introducción . . . . .	57
4.2.	Materiales y métodos . . . . .	58
4.2.1.	Equipamiento . . . . .	58
4.2.2.	Sistema experimental . . . . .	58
4.2.3.	Chip óptico . . . . .	59
4.2.4.	Descripción y metodología . . . . .	60
4.3.	Parámetros de agregación . . . . .	61
4.3.1.	Parámetros de agregación a partir del silectograma . . . . .	61
4.3.2.	Parámetros de Kaliviotis y Yianneskis . . . . .	63
4.4.	Alteración <i>in vitro</i> de los factores de interacción eritrocitaria . . . . .	63

4.5. Resultados . . . . .	67
4.5.1. Dependencia de los parámetros de agregación respecto al hematocrito . . . . .	67
4.5.2. Alteración <i>in vitro</i> de la carga eléctrica superficial eritrocitaria .	68
4.5.3. Alteración <i>in vitro</i> del contenido de proteínas plasmáticas en el medio . . . . .	70
4.5.4. Aplicación del modelo de Kaliviotis y Yanneskis . . . . .	71
4.5.5. Acción de agentes anestésicos . . . . .	72
4.5.6. Alteraciones por larvas de <i>Trichinella spiralis</i> . . . . .	74
4.5.7. Alteración de la agregación de GR por glicosilación no enzimática	76
4.6. Agregómetro de chip óptico portátil . . . . .	79
4.7. Discusión . . . . .	82
<b>5. Técnica de Biospeckle</b>	<b>85</b>
5.1. Introducción . . . . .	85
5.2. Ensayos preliminares . . . . .	85
5.2.1. Método . . . . .	86
5.2.2. Resultados . . . . .	88
5.3. Dinámica de GR en un tubo capilar . . . . .	90
5.3.1. Sistema experimental . . . . .	90
5.3.2. Adquisición de datos y análisis . . . . .	92
5.3.3. Parámetros de BSL: Coeficiente de Correlación y Momento de Inercia . . . . .	93
5.3.4. Resultados . . . . .	96
5.3.5. Discusión . . . . .	100
5.4. Estudio de la agregación de GR . . . . .	102
5.4.1. Sistema experimental . . . . .	103

5.4.2. Análisis del tamaño de grano de BSL . . . . .	104
5.4.3. Resultados . . . . .	106
5.4.4. Discusión . . . . .	114
<b>6. CARS: espectroscopía Raman anti-Stokes coherente</b>	<b>117</b>
6.1. Introducción . . . . .	117
6.2. Sistema experimental . . . . .	118
6.3. Resultados . . . . .	120
6.3.1. Barrido de longitudes de onda pump . . . . .	120
6.3.2. Análisis FLIM de la señal CARS . . . . .	124
6.4. Discusión . . . . .	125
<b>III Conclusiones generales y perspectivas futuras</b>	<b>127</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>128</b>
<b>IV Apéndices</b>	<b>131</b>
<b>A. Materiales Biológicos</b>	<b>132</b>
A.1. Muestras de sangre . . . . .	132
A.2. Muestras de glóbulos rojos . . . . .	133
A.3. Preparación general de muestras . . . . .	133
A.4. Tratamiento con tripsina . . . . .	134
A.5. Alteración del contenido de proteínas plasmáticas . . . . .	134
A.6. Agentes anestésicos . . . . .	135
A.7. Incubación con parásitos . . . . .	135
A.8. Tratamiento con dextrán . . . . .	136
<b>B. Nota modelo de consentimiento informado del donante</b>	<b>137</b>

<i>Índice general</i>	VIII
<b>C. Detalles experimentales</b>	<b>139</b>
C.1. Chip óptico . . . . .	139
C.2. Sistema experimental para transmisión de luz . . . . .	141
C.3. Optimización del volumen de muestra en el chip óptico . . . . .	143
<b>Bibliografía</b>	<b>146</b>

# Motivación y objetivos

La evolución de los conocimientos en Física Biomédica en las últimas décadas ha hecho de esta rama de la Ciencia una herramienta indispensable para la evaluación de determinadas situaciones clínicas, en particular las relacionadas con alteraciones hemorreológicas en patologías vasculares. La necesidad de estudiar y modelizar las interacciones de componentes de la sangre y la definición de parámetros necesarios en su enfoque reológico, conducen a la concepción de nuevos equipos y técnicas, generalmente fundamentadas en principios ópticos y mecánicos. En los últimos años se han propuesto dispositivos de pequeñas dimensiones (chips) que utilizan pequeños volúmenes de muestras y se basan en fenómenos físicos para la evaluación de la coagulación y agregación eritrocitaria. Por otra parte, hasta el momento no se ha realizado una evaluación y modelización completa de la incidencia de las distintas variables que influyen la dinámica de las interacciones entre los componentes de la sangre. Por lo tanto, es de interés actualmente en Física Biomédica, obtener modelos consistentes con las distintas variables fisiopatológicas a fin de elaborar en forma sencilla y rápida, parámetros que permitan diagnosticar y prevenir posibles alteraciones en la microcirculación. Este trastorno es característico de las muy frecuentes patologías vasculares, como la diabetes y la hipertensión arterial, además de otros trastornos de la salud como por ejemplo anemias y parasitosis.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo es investigar la dinámica de la interacción de componentes de la sangre por medio de técnicas basadas en tecnologías que

hacen uso de la luz. Se propone reconocer, caracterizar y cuantificar factores determinantes del comportamiento reológico de la sangre, y al mismo tiempo, ampliar el conocimiento sobre las técnicas aplicadas. De esta manera, se busca adaptar y desarrollar nuevos métodos no convencionales para estudiar la Hemorreología en espacios clínicos.

# Resumen

En esta tesis se estudia la dinámica de interacción de componentes de la sangre y, en particular, la Física del proceso de agregación eritrocitaria. Se abordan los fundamentos de la cinética de agregación de los glóbulos rojos, siendo los principales componentes involucrados en el comportamiento hemorreológico de la sangre. Conociendo los factores que gobiernan la agregación eritrocitaria, se presentan los ensayos experimentales realizados con técnicas ópticas (transmisión de luz, biospeckle, espectroscopía Raman anti-Stokes coherente) desarrolladas para el estudio de estas características. Estos estudios tienen también un gran potencial para su aplicación a otros procesos dinámicos de la sangre y de otros fluidos biológicos, como por ejemplo la coagulación y la motilidad celular. Esta tesis doctoral está enmarcada en las líneas de investigación de los grupos de Física Biomédica, y de Óptica y Fotónica del Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR). Los experimentos fueron llevados a cabo en el IFIR, con la colaboración del Área Física y del Área Química Analítica Clínica de la FCByF (UNR) para el manejo de muestras biológicas. Los ensayos referentes a espectroscopía Raman anti-Stokes coherente se realizaron en el Biopolo de la Universidad de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire - UMR 7365 CNRS, con la colaboración del Dr. Dominique Dumas, durante una estancia doctoral en Nancy, Francia.

En el primer capítulo se introducen conceptos y términos biológicos relevantes a los ejes de esta tesis. Para ello, se realiza una revisión bibliográfica sobre los componentes involucrados en el proceso de adhesión de eritrocitos. Posteriormente, se explica el inte-

rés del estudio de la agregación de glóbulos rojos como un caracterizador de patologías y alteraciones reológicas de la sangre.

El segundo capítulo presenta los modelos físicos previos propuestos para explicar la dinámica de interacción eritrocitaria. Se muestran enfoques basados en las interacciones electrostáticas y luego dos teorías principales para la formación de agregados de eritrocitos. La presencia de macromoléculas en el medio de suspensión, junto a la carga superficial eléctrica del glóbulo rojo, dan lugar a los escenarios que condicionan la formación de estructuras de conjuntos de células.

El tercer capítulo introduce las estrategias experimentales de este trabajo y sus fundamentos, describiendo particularmente las técnicas más comúnmente empleadas en la temática.

En el cuarto capítulo se detalla la técnica de transmisión de luz implementada para estudiar la agregación eritrocitaria. Se presentan los análisis de muestras de sangre alteradas *in vitro* por diversos métodos. Se determinan y analizan los parámetros característicos de la cinética de agregación eritrocitaria, de potencial aplicación al diagnóstico de alteraciones presentes en patologías vasculares. Finalmente, se expone el prototipo de agregómetro de chip óptico portátil basado en esta técnica, desarrollado para uso clínico como parte de esta tesis.

El quinto capítulo analiza la aplicación del fenómeno de biospeckle láser como una herramienta de estudio hemorreológico no invasivo. El biospeckle presenta mayor complejidad que otras técnicas, tanto experimental como computacional, siendo la información que brinda más rica que la técnica de transmisión de luz. Se trabajó principalmente con dextrán para la modelización *in vitro* de la agregación eritrocitaria. También, se estudiaron parámetros que permiten identificar las características de la dinámica eritrocitaria.

El sexto capítulo incursiona en el uso de la microscopía con fuentes de luz no convencionales. Se aborda la espectroscopía Raman anti-Stokes coherente, una técnica

de muy reciente aplicación y escasa disponibilidad debido a la dificultad experimental y de equipamiento que implica. El potencial de impacto de esta técnica es alto, puesto que prescinde del marcaje o tratamientos químicos invasivos de la muestra. En este caso, los tratamientos *in vitro* fueron realizados utilizando dextrán.

El último capítulo aborda los principales resultados y discusiones de los tres capítulos precedentes. Se expone una conclusión general de esta tesis y se presentan perspectivas de trabajo futuro.

Al final en forma de apéndice se presenta la preparación del material biológico y los detalles de los procedimientos experimentales.

I

## **Antecedentes del tema y fundamentos**

# 1. Introducción

## 1.1 Componentes de la sangre y determinantes de su dinámica

Para abordar el estudio de las interacciones físicas entre los elementos que intervienen en el comportamiento de la sangre, es necesario tener en claro las características biológicas de los mismos. Los eritrocitos, hematíes o glóbulos rojos (GR), dada su gran concentración y características, son los principales responsables del carácter reológico de la sangre. La dinámica de la interacción de estas células se condiciona por los elementos que las circundan, como ser la composición del medio de suspensión. Para comprender este fenómeno es necesaria una revisión bibliográfica sobre los componentes involucrados en el proceso de adhesión de GR, presentándose además en el Capítulo 2 los modelos propuestos para explicar la dinámica de la interacción de estas células.

### 1.1.1 Características de los glóbulos rojos

Los GR tienen la vital misión de proteger y transportar la hemoglobina, que es la responsable del intercambio de oxígeno del organismo. Cada milímetro cúbico o microlitro de sangre contiene unos cinco millones de eritrocitos. Los GR, cuyas dimensiones son de alrededor de  $7 \mu\text{m}$ , gracias a su elevada capacidad de deformación, pueden atravesar los microcapilares de diámetros de alrededor de  $2 \mu\text{m}$ , garantizando la llegada de

oxígeno a la totalidad del organismo [Chien, 1987].

Al abandonar la médula ósea<sup>1</sup>, el glóbulo rojo sobrevive en la circulación alrededor de 120 días, tiempo durante el cual recorre aproximadamente 600 km de territorio vascular. Durante ese trayecto, es sometido 500.000 veces a turbulencias del flujo cardíaco y debe atravesar en un elevado número de ocasiones el filtro esplénico del bazo, constituido por espacios mucho más pequeños que él [Blom, 2003].

La membrana del glóbulo rojo posee propiedades fisicoquímicas peculiares que le confieren su característica forma de disco bicóncavo (Figura 1.1). En esta condición, los eritrocitos presentan una forma redondeada y uniforme, con una delgadez central que corresponde al área en que convergen las dos concavidades debido a la pérdida del núcleo celular al entrar en la circulación [Mohandas y Shohet, 1978; Sans-Sabrafen et al., 2007].

La Figura 1.2 muestra un esquema en vistas de la morfología del glóbulo, la forma bicóncava de entre 5 y 7,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, 2,5  $\mu\text{m}$  de espesor máximo y 1  $\mu\text{m}$  de espesor mínimo le permite al eritrocito tener una gran superficie de aproximadamente 140  $\mu\text{m}^2$  en relación a su volumen que varía entre 80 y 100  $\mu\text{m}^3$  (i.e., 80 a 100 fL) [Skalak et al., 1973].

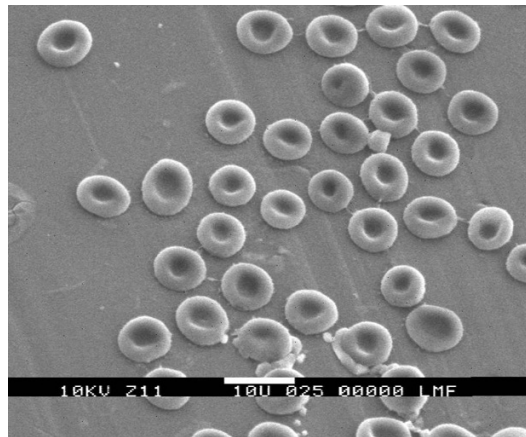
### 1.1.2 La membrana del glóbulo rojo

Si bien la membrana del eritrocito constituye el 1% del peso total del mismo, desempeña un papel primordial en las propiedades mecánicas del glóbulo rojo. Como en la mayoría de las membranas biológicas, siguiendo el modelo del mosaico fluido [Singer y Nicholson, 1972], los lípidos forman una doble capa en la que se hallan total o parcialmente inmersas diversas proteínas.

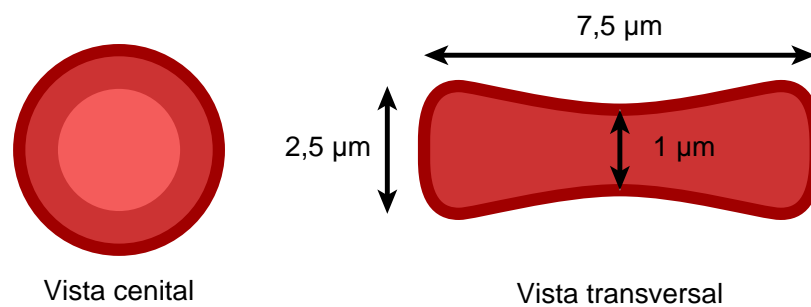
La membrana del eritrocito está constituida por lípidos (42%), proteínas (50%) e

---

<sup>1</sup>La médula ósea es un tipo de tejido que se encuentra en el interior de los huesos largos, vértebras, costillas, esternón, huesos del cráneo, cintura escapular y pelvis. Todas las células sanguíneas derivan de células madre presentes en la médula ósea.



**Figura 1.1:** Glóbulos rojos en reposo fotografiados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB AMRAY) a 10keV, previamente fijados con glutaraldehído y con recubrimiento metálico [Elías, 2012].



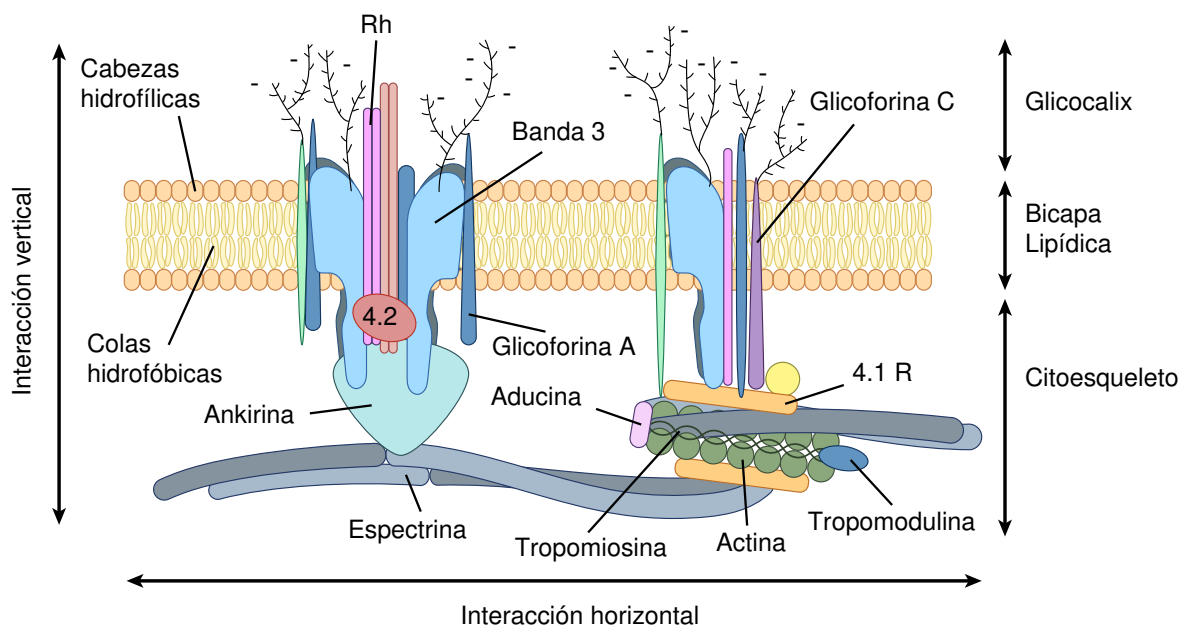
**Figura 1.2:** Esquema del glóbulo rojo mostrando sus dimensiones y su característica forma bicóncava.

hidratos de carbono (8%) y comprende tres niveles [Evans y Skalak, 1980]. La Figura 1.3 es una representación de este modelo biológico consistente en:

- (I) El glicocalix constituido por las sialoglicoproteínas que se proyectan a una cierta distancia de la superficie celular.
- (II) La bicapa lipídica con proteínas ensambladas.
- (III) El citoesqueleto, que es una red de proteínas retráctiles que cubren la superficie interna de la bicapa lipídica.

La interacción entre los lípidos, las proteínas integrales y las proteínas del citoesqueleto condiciona la mencionada característica forma bicóncava del eritrocito, que origina

la elevada relación superficie/volumen. Las propiedades reológicas de los GR son un reflejo de su estructura, porque presenta un comportamiento “sólido elástico” dado por el citoesqueleto que le otorga propiedades elastoplásticas y un comportamiento “fluido” dado por la bicapa lipídica que obliga a que los cambios de forma se den sin variación de área [Mohandas y Evans, 1994].



**Figura 1.3:** Diagrama de la membrana eritrocitaria donde se muestra el glicocalix, la bicapa lipídica, y las proteínas integrales que constituyen el citoesqueleto.

## Lípidos

Los tres tipos principales de lípidos de las membranas celulares son los fosfolípidos (los más abundantes), el colesterol y los glicolípidos. Estos lípidos son anfipáticos, es decir, tienen un extremo hidrofílico (i.e., que es atraído por el agua o polar) y un extremo hidrofóbico (i.e., que rehúye el agua o no polar). Esta disposición de las moléculas de fosfolípidos, con sus cabezas hidrofílicas expuestas y sus colas hidrofóbicas agrupadas, forma la base estructural de las membranas celulares [Alberts et al., 2002].

Los componentes lipídicos de la membrana eritrocitaria se mueven en ella constante-

mente. Muchas funciones de la membrana, fundamentalmente el transporte, dependen críticamente de la habilidad de la célula de mantener sus cadenas laterales de ácido graso en estado fluido.

### **Proteínas**

Las proteínas cumplen funciones biológicas importantes: controlan la morfología de la célula, los mecanismos de transferencia y las actividades enzimáticas [Berk y Hochmuth, 1992]. Las proteínas de la membrana eritrocitaria han sido clasificadas según la facilidad con la cual pueden ser extraídas de la membrana eritrocitaria. Las *proteínas integrales* están firmemente incluidas en el interior o atravesando la bicapa lipídica con sus dominios hidrofóbicos, siendo extraíbles sólo con reactivos potentes como los detergentes. Las *proteínas periféricas*, por otro lado, están asociadas más débilmente pudiendo ser extraídas mediante procedimientos con sales o con pH elevado.

Por su parte, las sialoglicoproteínas por su terminal de ácido siálico confieren cargas electronegativas a la superficie del GR, e inducen la repulsión electrostática intereritrocitaria manteniendo las células en suspensión monodispersas [D'Arrigo, 2000].

### **Citoesqueleto**

El citoesqueleto eritrocitario está compuesto por diversas proteínas: espectrina, anquirina, actina, proteínas 4.1, 4.2, 4.9, p55 y las aducinas. Estas proteínas forman un citoesqueleto de cierre que fija la superficie interna de la membrana al unirse a los dominios citoplasmáticos de la banda 3 y glicoforinas; estando a su vez en íntimo contacto con la hemoglobina (ver Figura 1.3). Se ha propuesto un modelo según el cual las proteínas del citoesqueleto eritrocitario presentan dos tipos de interacciones: horizontales y verticales [Mohandas y Gallagher, 2008].

### 1.1.3 Características de la membrana eritrocitaria

La membrana desarrolla múltiples y complejas funciones metabólicas y estructurales [Delfino, 1991], para ello es necesario que posea las siguientes características:

#### Equilibrio Osmótico

El glóbulo rojo está en equilibrio osmótico con el medio, pues el agua puede atravesar libremente la membrana, en respuesta a cambios en la osmolaridad intra- o extracelular. La permeabilidad para aniones es mayor que para cationes. El principal determinante de la osmolaridad intra-eritrocitaria es la concentración de solutos, para los que la membrana es relativamente impermeable: aniones polivalentes y cationes monovalentes.

#### Característica viscoelástica

Los GR se desplazan en los grandes vasos por el eje central, y el resto de los componentes lo hace en capas periféricas formando una “vaina líquida” otorgando a la sangre una mayor fluidez según el efecto Fåhræus-Lindqvist [Fåhræus y Lindqvist, 1931]. Por otra parte, en los microcapilares los GR pasan en forma individual deformándose de forma tal de tener el mayor contacto con las paredes para realizar el intercambio de oxígeno. Para poder cumplir con esta función, como se dijo anteriormente, el GR posee características viscoelásticas especiales. La bicapa lipídica confiere al GR las propiedades viscosas y el citoesqueleto aporta resistencia mecánica y elasticidad. En cualquier condición de circulación, el eritrocito sometido a las tensiones cortantes del flujo, se deforma de manera de ofrecer la menor resistencia hidrodinámica, al tiempo que su membrana adopta un movimiento de rotación sobre sí misma como lo hace la oruga de un tanque de guerra. Este movimiento reductor de la viscosidad de la sangre se denominó en inglés *tank-treading motion* [Feng, 1988]. El adecuado comportamiento

reológico de los eritrocitos depende, del correcto funcionamiento de cada uno de sus componentes y de su conjunto.

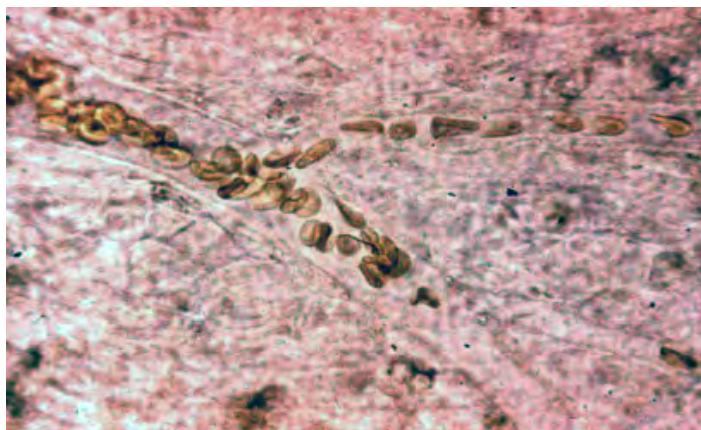
### **Propiedades de estabilidad estructural**

El control de la forma del glóbulo rojo es un complejo procedimiento en el que intervienen, activa o pasivamente, la mayoría de los componentes de la membrana eritrocitaria.

Los GR recuperan rápidamente su forma cuando son sometidos a una deformación transitoria. El citoesqueleto provee estabilidad a la membrana y se lo considera el mayor determinante de la forma, deformabilidad e integridad estructural. Su capacidad resistente estabiliza la bicapa lipídica contra distorsiones y su elasticidad ayuda a restablecer, rápidamente, la forma celular. La adecuada composición lipídica de la membrana, también es fundamental para el mantenimiento de la forma [Schrier et al., 1992].

### **Morfología de los eritrocitos**

La forma bicóncava de los eritrocitos facilita la principal función de estas células, que es el transporte de gases, ya que acorta las distancias de difusión entre la superficie y el centro en comparación con las que tendría, por ejemplo, una esfera o un elipsoide. En áreas de la circulación donde las fuerzas de corte son muy altas, el glóbulo rojo adopta una forma hidrodinámica que se asemeja a un paraguas, la cual opone una resistencia mínima al flujo como se ve en la Figura 1.4 [La Celle, 1975; Mohandas et al., 1983]. En condiciones de reposo, los GR tienen forma de disco bicóncavo como se detalló anteriormente, resultante del equilibrio entre las fuerzas externas e internas que actúan sobre ellos [Mohandas et al., 1983].



**Figura 1.4:** Microfotografía de eritrocitos en la microcirculación, donde se observa que los glóbulos rojos adoptan una forma hidrodinámica.

#### 1.1.4 Importancia de la carga superficial del glóbulo rojo

Una suspensión de GR en medio fisiológico constituye un estado estable o metaestable que se puede esquematizar como la resultante de la acción de dos tipos de fuerzas opuestas: las fuerzas de cohesión que tienden a atraer las células, y las fuerzas de repulsión que tienden a separarlas.

Estudios de migración electroforética<sup>2</sup>, demuestran que los GR, se comportan como partículas cargadas eléctricamente (características aniónicas). El origen de esta carga, como se dijo anteriormente, se debe principalmente a la presencia en la superficie de grupos carboxílicos de los ácidos siálicos unidos a las glicoproteínas de membrana, constituyendo el glicocalix como se observa en la Figura 1.3 [Chien y Sung, 1987]. Todos los GR son portadores de la misma carga, lo que genera en suspensión salina, una fuerte repulsión entre las células. En tal sistema, a nivel de la interfaz sólido-líquido, existe una fase de contacto caracterizada por la presencia de moléculas ionizadas en la que los efectos son modulados por *movimientos brownianos*.

---

<sup>2</sup>La electroforesis es una técnica muy utilizada en Biomedicina para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.

## 1.2 El fenómeno de adhesión inter-eritrocitaria

Los GR durante la circulación sanguínea interactúan con las otras células de la sangre y con las de los vasos. Estas interacciones suelen estar mediadas por moléculas de adhesión (MAC), siendo de particular interés las interacciones eritrocito-eritrocito [McMahon, 2019]. Normalmente, los eritrocitos tienen la tendencia a formar agregados que consisten en estructuras lineales cara a cara, que se asemejan a un apilamiento de monedas [Chien y Jan, 1973; Chien y Sung, 1987]. Estas estructuras lineales individuales son generalmente llamadas *rouleaux*. Los *rouleaux* de GR humanos en plasma<sup>3</sup>, contienen un número variable de células y se asocian en estructuras ramificadas conocidas como “Amas”.

Dado el gran número de investigadores que han estudiado y estudian la agregación eritrocitaria, el uso de terminología estándar se ha vuelto esencial. A continuación, se describen brevemente dos términos utilizados habitualmente [Baskurt y Meiselman, 2009].

### Agregación eritrocitaria

La *agregación* eritrocitaria es el proceso en el cual los GR forman agregados que normalmente son lineales y tridimensionales. Este proceso es reversible tal que los agregados se disocian o reconstruyen de acuerdo a la presencia o no de fuerzas externas. Varios índices de agregación eritrocitaria pueden definirse mediante diversas técnicas que se verán en los capítulos siguientes. Tales índices son específicos a la suspensión celular estudiada, con su magnitud afectada por las propiedades de las células y el medio de suspensión.

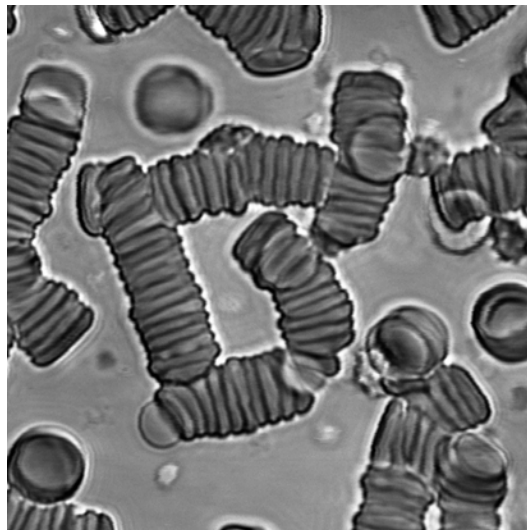
---

<sup>3</sup>El plasma es la fracción líquida y acelular de la sangre. Está compuesto por un 90 % de agua, un 7 % de proteínas, y el 3 % restante por grasa, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico.

## Agregabilidad eritrocitaria

La *agregabilidad* de los GR refleja la tendencia intrínseca de los mismos a formar agregados, y por lo tanto depende sólo de las propiedades celulares (carga eléctrica superficial, morfología eritrocitaria, deformabilidad eritrocitaria, etc.) que pueden ser afectadas por diversos factores. La determinación de la agregabilidad requiere la comparación de poblaciones de células en el mismo medio de suspensión: células que forman agregados más grandes o más resistentes a la disociación en el mismo medio, poseen una agregabilidad mayor.

En la Figura 1.5 se muestra la imagen de agregados eritrocitarios obtenidos por sedimentación en un portaobjetos, por lo cual se presentan en una geometría plana de dos dimensiones, pero en el volumen sanguíneo los rouleaux forman estructuras tridimensionales [Cokelet y Goldsmith, 1991]. La formación de estas estructuras más grandes es afectada por factores como la geometría del espacio disponible, las fuerzas de atracción y repulsión entre células, y la presencia de proteínas plasmáticas (fibrinógeno, albúmina, etc.).



**Figura 1.5:** Agregados de glóbulos rojos. Fotografía tomada en el laboratorio de Física Biomédica (IFIR), objetivo 40x.

La imagen de los agregados de la Figura 1.5 fue obtenida bajo condiciones estáticas, libres de flujo y luego de haber pasado suficiente tiempo (superior a 5 minutos) tal que por sedimentación, las estructuras alcanzaran una configuración estable. Sin embargo, la agregación de GR involucra fuerzas de atracción relativamente débiles [Neu et al., 2003; Skalak y Zhu, 1990], por lo tanto, es posible dispersar los agregados en estructuras más pequeñas o células individuales mediante la aplicación de tensiones de corte (o cizalladura). Es importante notar que la agregación de GR es un proceso reversible: los agregados se volverán a formar cuando las fuerzas externas sean reducidas o suprimidas.

### 1.3 Aspectos históricos

Los fenómenos que se asocian con la agregación de GR han sido de interés durante muchos años. La mayoría de los estudios involucran varias áreas científicas tales como la Reología<sup>4</sup> Sanguínea o Hemorreología, la Biomecánica, la Medicina Clínica y las observaciones *in vivo*<sup>5</sup>.

En 1665, Malpighi (1628-1694) fue el primero en demostrar la existencia de glóbulos rojos como uno de los elementos constituyentes de la sangre. Malpighi confundió estas células con glóbulos grasos, error que fue corregido 10 años más tarde en 1674 por Anthony van Leeuwenhoek (1618-1723), quien dio la primera descripción certera de los GR. Durante la primera mitad del siglo XX, se publicaron trabajos que sirvieron de estímulo al interés actual por la agregación de GR. Robin Fåhræus (1888-1968) fue un patólogo en la Universidad de Uppsala en Suecia que estaba interesado en la “estabilidad de suspensión” de la sangre y en la Reología Sanguínea. Sus primeras observaciones ahondaron en la velocidad de decantación de GR durante el embarazo y su tesis doctoral, “La Estabilidad de Suspensión de la Sangre”, fue publicada en 1921.

---

<sup>4</sup>La Reología es la rama de la física de medios continuos que se dedica al estudio de la deformación y el fluir de la materia.

<sup>5</sup>In vivo se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo.

Fåhreaus realizó observaciones del comportamiento de la agregación eritrocitaria en sujetos sanos y enfermos, siendo el primero en informar que en la sangre de enfermos, los rouleaux contienen muchos más GR y están agrupados con plasma sin células entre ellos. Fåhreaus evaluó el comportamiento reológico de los agregados contenidos entre placas portaobjeto de vidrio: “En sangre normal los rouleaux se desintegran al mínimo movimiento en la fase suspensora, mientras que en sangre patológica los agregados no se ven perturbados hasta que se producen corrientes violentas”. Así concluye que en sangre enferma los agregados tienen una estructura marcadamente más “sólida” [Fåhreaus, 1929].

### 1.3.1 Estudios de la interacción dextrán-eritrocito

Estudios a mediados de 1940, comenzaron a explorar el uso de soluciones de poliglucosa *dextrán*<sup>6</sup> como un sustituto de plasma sanguíneo. Los estudios preliminares utilizaron soluciones con diversos pesos moleculares (e.g., 40, 70, 150 kDa) del polímero, inicialmente en modelos animales de hemorragia y shock circulatorio; luego fueron extendidos a humanos. Varios investigadores, principalmente de Suecia, evaluaron los efectos de dextrán en la presión osmótica<sup>7</sup>, agregación de GR, y tiempo de vida de GR en la circulación. Dado el continuo interés en la agregación de GR como determinante del flujo sanguíneo *in vivo*, la década de 1950 estuvo marcada por un interés en aumento respecto al dextrán de 40 kDa. El polímero de estas características llegó a ser distribuido como medicamento contra diversas patologías relacionadas con anomalías en la circulación. Sin embargo, la habilidad antiagregante del dextrán de 40 kDa fue puesta en duda en 1967 por un estudio *in vitro* de viscosidad, contrastado con los beneficios *in vivo* [Bollinger et al., 1967; Dormandy, 1971], sugiriendo no ser debidos a un efecto

---

<sup>6</sup>El dextrán es un polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa, formando unidades en cadenas de longitud variable (de 10 a 150 kilodaltons, kDa).

<sup>7</sup>La presión osmótica se define como la presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo neto de disolvente a través de una membrana semipermeable.

específico sino a la dilución de la sangre, lo que conducía a una reducción del hematocrito<sup>8</sup> y en consecuencia, a una disminución de la viscosidad sanguínea. Estudios más recientes confirmaron que el dextrán 40 kDa ni reduce ni promueve agregación para GR humanos en plasma [Armstrong et al., 2004].

### 1.3.2 Investigaciones recientes

Desde finales de la década de 1980, las investigaciones se centraron en los mecanismos y factores celulares de la agregación eritrocitaria debido al creciente interés científico y clínico. Los trabajos se han enfocado en dos áreas principales:

1. Mecanismos de agregación y el rol de las características celulares en la formación de agregados [Baskurt y Meiselman, 1998; Lee et al., 2016; Sebastián et al., 2005; Wagner et al., 2013].
2. Importancia de la agregación de GR *in vivo* y su papel como determinante del flujo sanguíneo y resistencia vascular. Siendo particularmente de gran importancia el desarrollo de técnicas y equipos, que permitan su evaluación y caracterización [Antonova et al., 2008; Donner et al., 1988; Kaliviotis et al., 2018; Lee et al., 2008].

El estudio del rol de las proteínas plasmáticas y macromoléculas continúa siendo de interés. Se ha demostrado experimentalmente la adhesión de fibrinógeno al glóbulo rojo [Carvalho et al., 2010] y se han realizado estudios sobre los efectos de las macromoléculas en tales sistemas [Ioan et al., 2001; Koralewski et al., 2007]. El origen de la agregación de GR aún no está del todo esclarecido, hay dos modelos coexistentes que intentan explicarlo. Por un lado, la teoría de “bridging” supone la adsorción de

---

<sup>8</sup>El hematocrito es el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos. Los valores medios varían entre el 40,3 y el 50,7% en los hombres, y entre el 36,1 y el 44,3% en las mujeres.

macromoléculas en la membrana de los eritrocitos y por lo tanto una posible adhesión entre dos células como el origen de las formaciones de rouleaux [Brooks, 1988; Wagner et al., 2013]. Por otro lado, existe la teoría de “depletion” que involucra una presión osmótica coloidal a causa de las macromoléculas como la razón principal de la formación de rouleaux [Neu y Meiselman, 2008, 2002]. Estos modelos son contrastados experimentalmente y discutidos dando el enfoque para una nueva teoría combinada derivada de la Física de Coloides [Fantoni et al., 2015].

Las investigaciones basadas en simulación computacional se han nutrido de resultados experimentales, y han explorado la deformabilidad del glóbulo rojo individualmente [Doddi y Bagchi, 2009], así como también su comportamiento colectivo en distintos tipos de flujo [Ye et al., 2017]. La circulación a escala micrométrica supone un interés especial, puesto que las dificultades hemodinámicas relacionadas a patologías, ocurren frecuentemente debido a la formación de aglomerados de GR que dificultan su paso por los microcapilares sanguíneos [Kaliviotis et al., 2016; Pinho et al., 2017]. Estudios más generales permitieron extender el campo de investigación, y aplicar efectos de la adhesión eritrocitaria al análisis de procesos más complejos, como la coagulación [Lim et al., 2011], e incursionar en aspectos más específicos de la Biología como la utilización de anticuerpos que interactúan con el eritrocito [Plá et al., 2000; Rasia et al., 2003]. En Argentina, el “Grupo de Óptica aplicada a la Biología” fundado por el Dr. Rodolfo Rasia (actualmente “Grupo de Física Biomédica”) produjo trabajos estrechamente relacionados con la aplicación de técnicas reo-ópticas experimentales para describir la adhesión eritrocitaria. En este sentido se desarrollaron y perfeccionaron los primeros métodos y equipos hemorreológicos en el país [Rasia et al., 1986, 1990; Riquelme et al., 1998, 2018]. Varios aspectos se han abordado, como ser la técnica de backscattering [Plá et al., 2008], modelización de alteraciones de la carga eléctrica del eritrocito [Buszniesz et al., 2017b; Delannoy et al., 2012], análisis en cámara de adhesión [Danieli et al., 2006; Riquelme y Londero, 2018], análisis por imágenes de microscopía

[Menichini et al., 2015; Riquelme et al., 2003], entre otros.

Hoy en día existe una fuerte tendencia hacia el concepto de “*translational research*”, esto refiere a la meta de aplicar la Ciencia Básica a la concepción de nuevas terapias, diagnósticos y tratamientos [Nadort et al., 2013; Picot et al., 2015; Richards et al., 2013]. En este sentido, se apunta a dispositivos de relativo bajo costo y operación sencilla, que hagan uso de los principios aplicados en los sistemas experimentales de investigación.

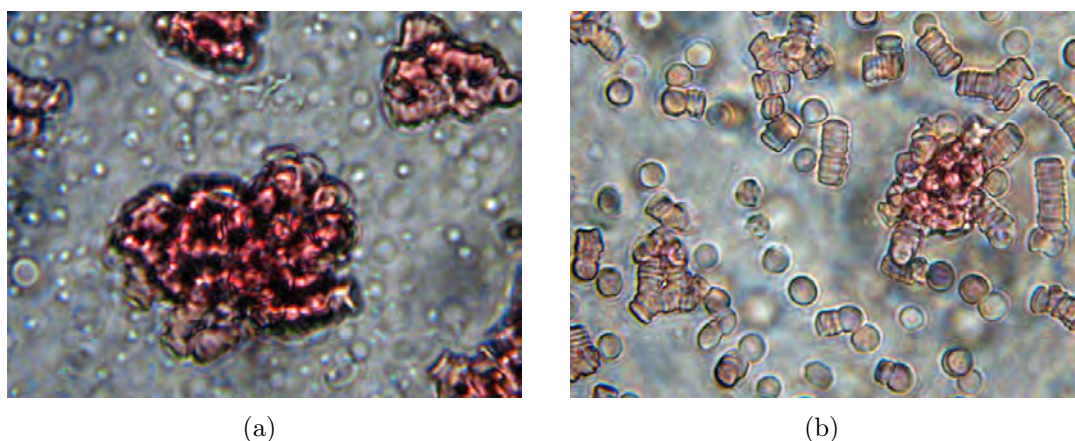
## 1.4 Patologías con alteraciones hemodinámicas

La caracterización de los agregados eritrocitarios es importante para analizar las posibles alteraciones en la microcirculación observadas en ciertas patologías vasculares como la hipertensión arterial y la diabetes [Delannoy et al., 2012; Foresto et al., 2005; McMillan, 1993], y en las producidas *in vitro* por la acción de diversos agentes [Alet et al., 2015; Buszniez et al., 2017a; Danieli et al., 2009; Riquelme et al., 2011]. Además, varios trabajos recientes han demostrado su importancia para la comprensión de los disturbios vasculares producidos en pacientes obesos [Wiewióra et al., 2010] y luego de la remoción de torniquetes [Connes et al., 2009].

En las enfermedades vasculares (diabetes, hipertensión), la forma de los rouleaux está alterada, produciéndose grandes agregados globulares que pueden conducir a obstrucciones en la microcirculación sanguínea [Delannoy et al., 2015; Delannoy, 2014]. Un menor contenido de ácido siálico entraña una perturbación en las propiedades reológicas de la membrana y una mayor y más desordenada adhesión. En efecto, se ha observado en patologías con déficit de ácido siálico de membrana que la fuerza de adhesión eritrocitaria es mayor y aparecen grandes agregados esferoidales llamados “clusters” [Delannoy et al., 2015; Foresto et al., 2005]. Las obstrucciones de los vasos sanguíneos disminuyen a su vez las fuerzas desagregantes, resultando en un aumento en el tamaño

de los agregados eritrocitarios, lo que se traduce en una mayor dificultad para dicho flujo, provocando una situación de retroalimentación que lleva a un aumento de la viscosidad sanguínea [Shin et al., 2006].

Los eritrocitos anormales tienden a adherirse formando estructuras amorfas como los de la Figura 1.6. Este último tipo de estructura refleja un tipo particular de interacción célula-célula. Tales anomalías son inducidas por factores celulares (i.e., disminución del ácido siálico de la membrana, alteraciones morfológicas, etc.), o factores extracelulares (i.e., presencia de inmunoglobulinas, alto contenido de fibrinógeno, etc.). La disminución de la carga eléctrica superficial, al favorecer la adhesión celular, juega un papel importante en el flujo sanguíneo.



**Figura 1.6:** GR de pacientes hipertensos (a) y diabéticos (b), resuspendidos en plasma autólogo [del Balzo, 2010].

En consecuencia, es de gran interés poder disponer de métodos accesibles que permitan caracterizar y cuantificar la agregación eritrocitaria, para evaluar con más detalle la gravedad de las alteraciones hemorreológicas en las patologías vasculares. También es posible utilizar el estudio de la agregación eritrocitaria como indicador en otros escenarios clínicos; experiencias recientes han reportado que los extractos de *Ascaris lumbricoides*<sup>9</sup> y las larvas de *Trichinella spirallis* [Ponce de León et al., 2017] captan

<sup>9</sup>*Ascaris lumbricoides* es un nematodo parásito del intestino delgado del hombre de amplia distribución en nuestro país.

ácido siálico del eritrocito humano modificando su carga eléctrica superficial y, en consecuencia, la morfología y el tamaño de los agregados eritrocitarios [Ponce de León et al., 2020; Ponce de León et al., 2013].

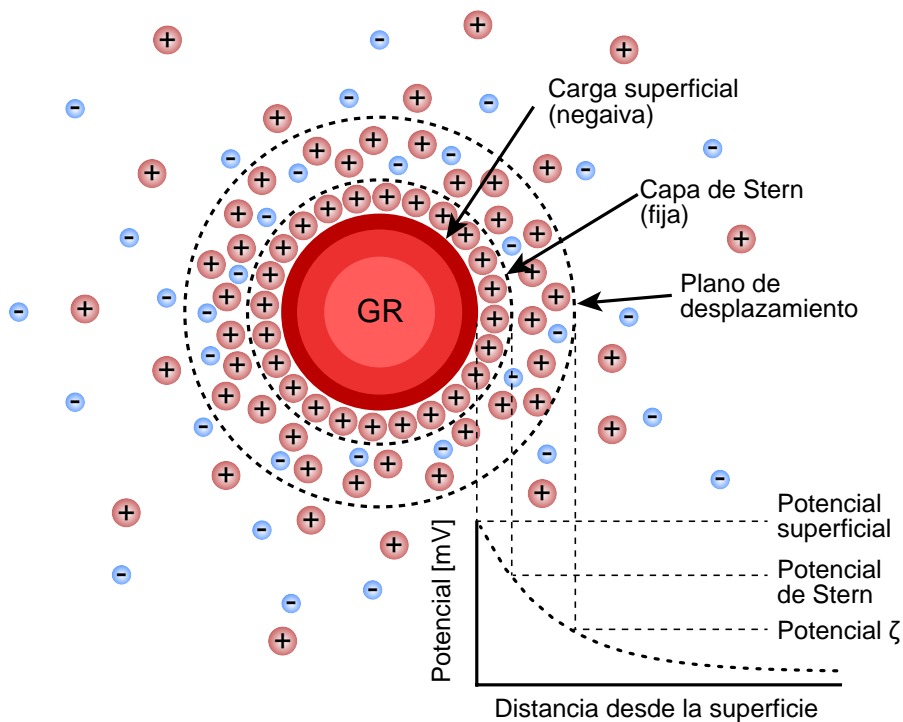
## **2. Modelización de la interacción entre glóbulos rojos**

Los fenómenos de superficie que intervienen en la estabilidad de las suspensiones de GR son particularmente importantes en la formación de los rouleaux [Jan y Chien, 1973]. En el estudio general del fenómeno de agregación, el factor fundamental a considerar es la distancia media que separa las partículas en suspensión. Esta distancia puede ser modificada en diversas circunstancias, a veces por procesos inmunológicos y otras veces por alteraciones de naturaleza puramente fisicoquímica [Pollack et al., 1965; Pollack y Reckel, 1977; Stratton et al., 1973]. La suma de estos acontecimientos es lo que determina la formación de los agregados. Una suspensión estable de eritrocitos es la conjunción de varios factores, las fuerzas de repulsión ligadas a la carga electrostática del GR y las fuerzas de cohesión ligadas a la tensión superficial entre los eritrocitos y la presencia de ligandos [van Oss y Absolom, 1983].

### **2.1 Modelo de doble capa difusa y el potencial Zeta**

En este modelo se consideran dos capas iónicas separadas por una interfase conocida como superficie de Helmholtz [Pollack et al., 1965], según se muestra en la Figura 2.1. Las hipótesis de partida para modelizar esta doble capa en cualquier modelo de complejidad creciente son:

- Asumir la mayor simetría posible del glóbulo rojo con el fin de facilitar un resultado cualitativo y cuantitativo.
- Considerar que el medio de suspensión es homogéneo e isotrópico desde el punto de vista eléctrico, cuya permitividad dieléctrica es  $\varepsilon$ .
- Tener en cuenta sólo las contribuciones de las cargas libres (iones y electrones) al campo eléctrico, ignorando la contribución de dipolos moleculares.
- Considerar que los iones se distribuyen de manera homogénea en el seno del medio.



**Figura 2.1:** Distribución de iones alrededor del glóbulo rojo. Se observa una capa compacta de iones adsorbidos y una capa difusa más externa.

Como se explicó anteriormente, la formación de rouleaux ocurre entre las caras de mayor diámetro. La relación entre el diámetro máximo y la distancia máxima de

la doble capa es del orden de 190 veces mayor, ver Figura 1.2. Es posible suponer que cuando los GR se agrupan para la agregación, esta se puede considerar como el acercamiento de dos planos paralelos [Russel et al., 1992]. Entonces, para describir la capa rígida se puede asumir que las cargas están concentradas en las fronteras de una capa de espesor  $d$ . Resolviendo la ecuación de Laplace  $\nabla^2\phi = 0$  en la capa rígida y asumiendo simetría cilíndrica para el potencial  $\phi$  se obtiene:

$$\phi(x) = \left( \phi_s + (\zeta - \phi_s) \frac{x}{d} \right), \quad (2.1)$$

para  $0 < x \leq d$ , el origen de coordenadas está en la superficie del glóbulo rojo por conveniencia.  $\phi_s$  es el potencial en la superficie del glóbulo rojo [Glasstone, 1964].

Por otro lado, en la capa difusa resulta  $\nabla^2\phi = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon}$ . La densidad de carga está dada por la concentración de diferentes tipos de iones con carga  $Z_i F$ , donde  $F$  es la constante de Faraday ( $F = 96,485 \text{ C/mol}$ ) y  $Z_i$  es la carga de un ion. Por esto, la densidad de carga resulta:

$$\rho(x) = \sum_i Z_i F C_i(x), \quad (2.2)$$

siendo  $C_i(x)$  la concentración neta de iones y contraiones. Dada la agitación térmica, se supone que la concentración relativa de cargas respecto al seno del líquido es una distribución de Boltzman:

$$\frac{C_i(x)}{C_i^0} = e^{-Z_i F \phi(x) / RT}. \quad (2.3)$$

Con lo que resulta:

$$\nabla^2\phi = -\frac{F}{\varepsilon} \sum_i Z_i F C_i^0 e^{-Z_i F \phi / RT}. \quad (2.4)$$

La Ecuación 2.4 es una ecuación diferencial generalmente resoluble en forma numérica,

pero que para geometría plana presenta solución exacta. Luego,

$$\frac{d^2}{dx^2}\phi = -\frac{F}{\varepsilon} \sum_i Z_i F C_i^0 e^{-Z_i F \phi(x)/RT}. \quad (2.5)$$

Aplicando las condiciones de contorno,  $\phi(d) = \zeta$  y  $\lim_{x \rightarrow \infty} \phi(x) = 0$  y bajo la consideración de campo débil, ( $ZF\phi \ll RT$ ) resulta:

$$\frac{d^2}{dx^2}\phi = -\frac{\phi(x)}{x_D^2}, \quad (2.6)$$

donde  $x_D = \sqrt{\frac{\varepsilon RT}{2F^2 L}}$  es la distancia de Debye-Hückel y  $L = \frac{1}{2} \sum_i Z_i^2 C_i$  es la fuerza iónica [Moelwyn-Hughes, 1961]. Teniendo en cuenta esto, se obtiene una expresión para el potencial de la capa difusa:

$$\phi(x) = \zeta e^{(d-x)/x_D}. \quad (2.7)$$

Entonces, la densidad superficial de cargas en el radio efectivo estará dada por:

$$\sigma = -\varepsilon \left( \frac{d\phi}{dx} \right)_{x=d} = \frac{\varepsilon \zeta}{x_D}, \quad (2.8)$$

por lo que finalmente el potencial  $\zeta$  resulta:

$$\zeta = \frac{\sigma x_D}{\varepsilon}. \quad (2.9)$$

## 2.2 Modelo de interfase de Stern

El modelo propuesto por Stern [Gramhame, 1947] permite explicar el papel que juegan los iones, los cuales se considera que se distribuyen en dos regiones rodeando el eritrocito, como se ve en la Figura 2.1. Aquí se muestra una capa compacta constituida por iones adsorbidos específicamente y una exterior difusa, por lo que es posible aplicar

el modelo desarrollado anteriormente.

En presencia de electrolitos, cada glóbulo rojo está rodeado por una nube de iones positivos. A nivel de la interfase sólido-líquido, se forman dos capas de contraiones (i.e., una doble capa iónica) rodeando la partícula, una que se mueve solidariamente con ella, denominada capa de Stern, y otra más difusa cuya densidad disminuye hacia el seno de la solución [Gramhame, 1947; Ruhstroth-Bauer, 1965]. Se crea entonces una diferencia de potencial entre el medio y la nube de contraiones que rodea al eritrocito denominado potencial zeta ( $\zeta$ ) [Stratton et al., 1973], y que se representa en la Figura 2.1. Hacia la década del 60, Pollack obtuvo una mejora de la fórmula de  $\zeta$  (Ecuación 2.9) dada por [Pollack et al., 1965]:

$$\zeta = \frac{4,44 \times 10^{-8} \sigma}{\sqrt{\varepsilon L}} + \frac{12,59 \sigma \alpha}{\varepsilon}, \quad (2.10)$$

donde intervienen la densidad de carga superficial del eritrocito ( $\sigma$ ), la fuerza iónica del medio ( $L$ ), el radio de curvatura del contraión ( $\alpha$ ) y la constante dieléctrica del medio ( $\varepsilon$ ).

La agregación, que es un proceso reversible, requiere la presencia de factores extracelulares e intracelulares. Una modificación en cualquiera de estos factores lleva a una modificación de  $\zeta$  y, en consecuencia, a un cambio en el patrón de agregación. La agregación de un sistema es tanto más probable cuanto más débil sea el potencial  $\zeta$ . Como consecuencia de la ecuación de Pollack, este potencial puede disminuir en tres circunstancias:

- Reducción de la carga eléctrica superficial ( $\sigma$ ): Se incluyen en esta categoría los efectos debidos a la fijación de ligandos (fibrinógeno, anticuerpos, etc.) o la pérdida de ácido siálico de los GR (por enzimas proteolíticas, alteraciones patológicas, etc.)
- Modificación de la constante dieléctrica del medio de suspensión ( $\varepsilon$ ): Variación

que puede introducirse por ejemplo mediante la modificación del contenido de moléculas en el medio.

- Variación de la fuerza iónica del medio de reacción ( $L$ ): Estos efectos se basan sobre todo en la modificación de la composición iónica del medio [Chien y Sung, 1987].

Basándose en estos argumentos es posible modelizar las reacciones de agregación y modificarlas artificialmente.

## 2.3 Teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)

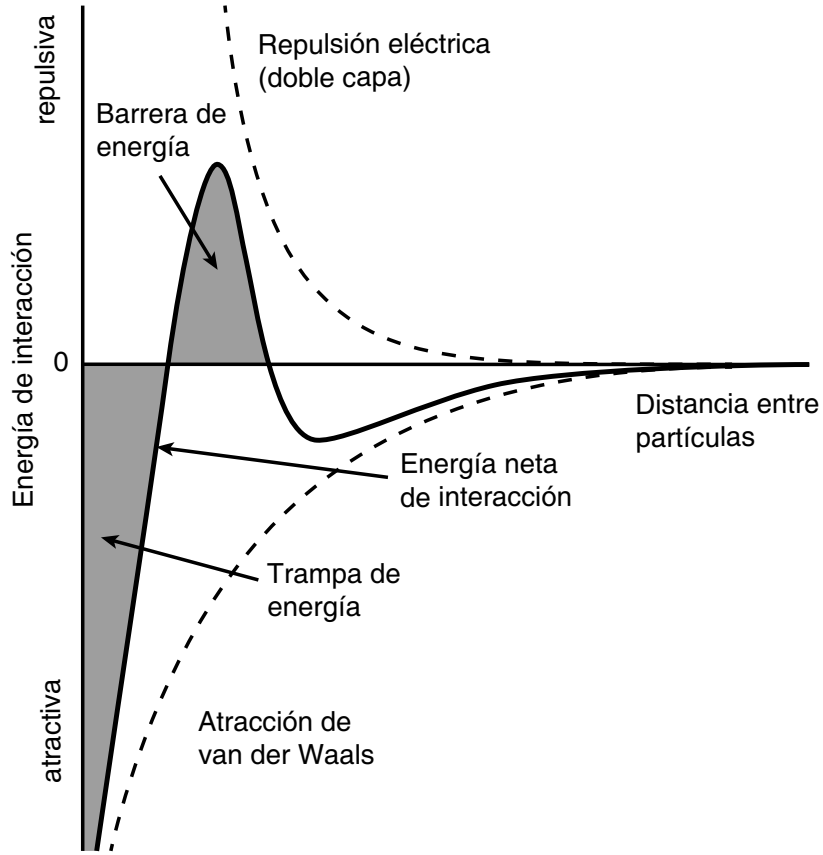
De acuerdo con la teoría de Stern, los GR nunca se podrían agregar ya que existe una fuerza repulsiva de origen eléctrico que los mantendría separados entre sí. La teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek DLVO asume que las fuerzas de London-van der Waals son lo suficientemente fuertes para competir con dicha fuerza repulsiva, y producir una trampa iónica lo bastante fuerte como para atrapar dos GR el tiempo necesario para que queden adheridos por la acción de los ligandos en el medio de suspensión [Israelachvili, 2011]. En la Figura 2.2 se esquematiza el comportamiento del potencial según la distancia entre partículas.

El potencial por unidad de superficie de London-Van der Waals para placas planas paralelas se expresa de la siguiente forma [Hiemenz y Rajagopalan, 1997]:

$$\psi(x) = -\frac{A}{12\pi x^2}, \quad (2.11)$$

donde  $A = \left(\frac{\rho N_a \pi}{M}\right) \beta$ ,  $\beta$  es la constante particular de Debye-Keesom y  $\frac{\rho N_a}{M}$  es el número de moléculas por unidad de volumen en el glóbulo rojo.

Por otro lado, el potencial repulsivo por unidad de superficie entre GR es:



**Figura 2.2:** Curva de potencial según la teoría DLVO para agregados en medio acuoso. Puede notarse la existencia de un primer pozo de potencial que actúa como una trampa energética para los iones.

$$\varphi(x) = \frac{\epsilon \zeta^2}{x_D} e^{-x/x_D}. \quad (2.12)$$

El punto de equilibrio inestable  $x_e$  de la barrera de potencial se obtiene de anular la derivada del potencial neto,  $\frac{d}{dx}(\varphi + \psi)(x_e) = 0$ . Por lo tanto, para  $x < x_e$  los GR están adheridos. Una mejor aproximación, es suponer que una capa de espesor  $\delta$  del glóbulo rojo es la que está involucrada en las fuerzas de London-Van der Waals. Con lo que el potencial asume la siguiente forma:

$$\psi(x) = -\frac{A}{12\pi} \left( \frac{1}{x^2} + \frac{1}{(x+2\delta)^2} - \frac{2}{(x+\delta)^2} \right). \quad (2.13)$$

Esto produce un mínimo secundario a distancia mayor que  $x_e$  que corresponde a un mínimo relativo de la energía potencial total. Permitiendo especular que los GR se adhieren guardando cierta distancia, sin traspasar la barrera de potencial (ver Figura 2.2). De esta forma, sólo mediante fuerzas de London-Van der Waals es posible suponer una adherencia estable de los GR. Dichas fuerzas son de corto alcance, otros factores como los introducidos por el fibrinógeno y la tensión superficial actúan como mecanismos de largo alcance resultando en una coalescencia<sup>1</sup> [Hiemenz y Rajagopalan, 1997].

## 2.4 Teoría de Skalak para la agregación eritrocitaria

Para estudiar el fenómeno de agregación, utilizando otro punto de vista, se considera la energía que se necesita para separar dos GR adheridos por un fenómeno de fractura frágil. Skalak propuso la teoría de fractura frágil formulada por Griffith (1920) para incursionar en el problema de la agregación de GR y la formación de los rouleaux.

A diferencia de la fractura dúctil, la fractura frágil ocurre en dirección perpendicular a la tensión aplicada de manera violenta. Esta se produce cuando la tasa de energía liberada por la fractura es mayor a la tasa de energía absorbida por la elasticidad del material [Skalak et al., 1973].

En la teoría de Skalak se parte de la conservación de la energía sobre una adiabática:

$$dW = dU + dT + dD - \gamma dA_c, \quad (2.14)$$

donde  $dW$  es el trabajo de las fuerzas externas,  $dU$  la energía interna (incluyendo la elástica),  $dD$  es la función de disipación (incluyendo las fuerzas de roce viscosas),  $dT$  es la energía cinética del glóbulo rojo, y  $\gamma dA_c$  es la energía de adhesión de la interfase eritrocito-eritrocito.

---

<sup>1</sup>En química, la coalescencia implica un proceso a través del cual dos dominios de fase de composición esencialmente idéntica entablan un contacto y forman un dominio de fase mayor.

$\gamma$  se obtiene de la teoría DLVO de la sección 2.3 mediante la expresión:

$$\gamma = \int_{z_0}^{\infty} \bar{f} \cdot \bar{n} dz, \quad (2.15)$$

donde  $\bar{f}$  es la densidad volumétrica de fuerza resultante entre la repulsión eléctrica y las fuerzas de London-Van der Waals entre las dos membranas,  $\bar{n}$  es la normal a la superficie y  $z_0$  es la distancia de equilibrio estacionaria. Aplicando el principio de trabajos virtuales, el equilibrio se puede hallar cuando:

$$\delta W = \frac{\partial W}{\partial A_c} \delta A_c = 0, \quad (2.16)$$

donde  $W = U - \gamma A_c$  es el trabajo compatible con los vínculos. Luego resulta:

$$\frac{\partial W}{\partial A_c} = \frac{\partial U}{\partial A_c} - \gamma = 0, \quad (2.17)$$

con lo que se obtiene:

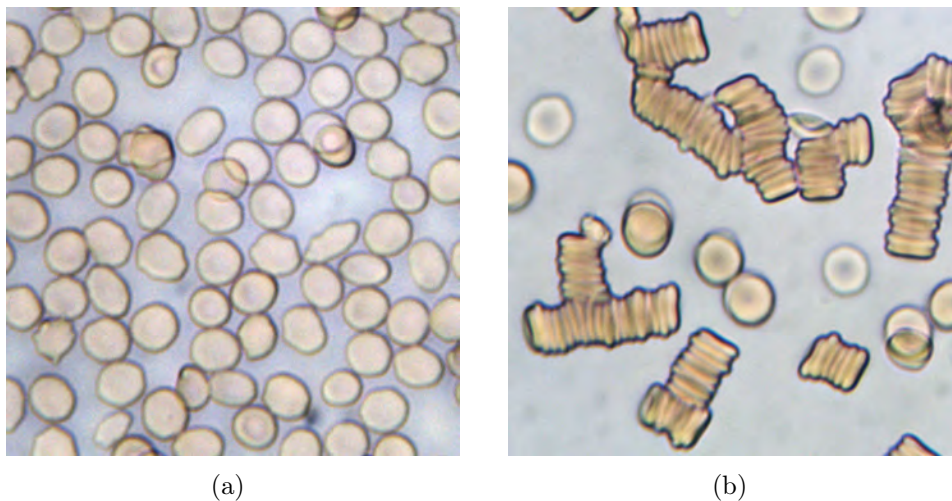
$$\gamma = \frac{\partial U}{\partial A_c}. \quad (2.18)$$

La ecuación 2.18 permite calcular la energía de interfase usando los modelos viscoelásticos del glóbulo rojo. El principal inconveniente en el uso de esta teoría es la necesidad de ensayos con tensiones de corte, pero cuando se diseña un instrumento que analiza la agregación sin usar flujo de corte, la Ecuación 2.18 sigue siendo válida [Skalak et al., 1973; Skalak y Zhu, 1990].

## 2.5 Teoría de *Depletion* y Modelo de *Bridging*

Como se introdujo en la Sección 1.2, en sangre humana estática, los GR forman agregados sueltos con una morfología cara a cara particular, denominados rouleaux.

Esta agregación es causada por la presencia de macromoléculas plasmáticas, principalmente el fibrinógeno. Comportamientos similares se obtienen al suspender los GR en polímeros solubles de alta masa molecular tales como dextrán y polietilenglicol (PEG). Sin embargo, la agregación no ocurre en soluciones salinas como la solución fisiológica o el buffer fosfato salino (PBS en sus siglas en inglés) que poseen pH 7,4 y osmolaridad 300 mOsmol/kg. La Figura 2.3 muestra GR humanos de la misma procedencia suspendidos a bajo hematocrito en solución de PBS y albúmina (a) y en plasma (b). Se adiciona albúmina sérica humana para evitar la crenación de los GR, producto del contacto con el vidrio del portaobjeto (efecto vidrio [Londero et al., 2016]), dando estabilidad al medio de suspensión. Se puede observar claramente que los GR suspendidos en plasma forman rouleaux, mientras que no ocurre agregación para los GR en PBS con albúmina, con esto se ve la importancia de las proteínas presentes en el plasma encargadas de establecer las ligaduras entre GR.



**Figura 2.3:** GR suspendidos en solución de PBS y albúmina sérica humana (a) y plasma (b). Los GR provenían de la misma muestra de sangre y fueron suspendidos en cada medio a bajo hematocrito (aproximadamente 2%). Nótese la formación de rouleaux en el plasma, mientras que no se observa agregación en PBS con albúmina.

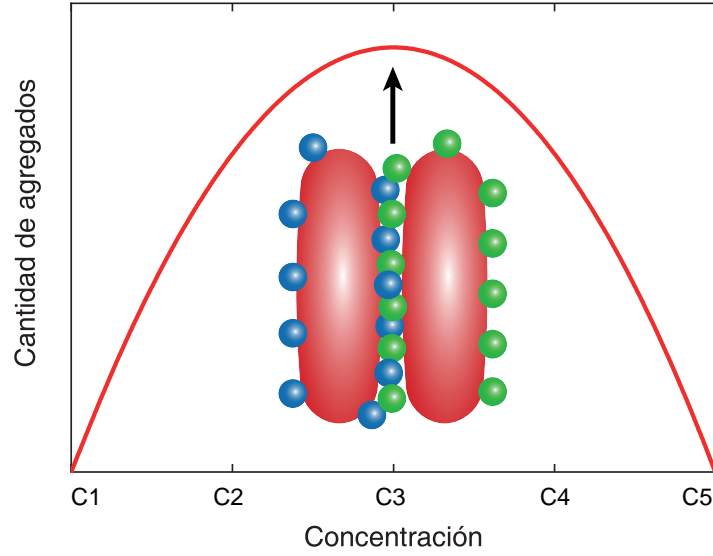
En condiciones fisiológicas normales, *in vivo*, el fenómeno de agregación eritrocitaria se ve disminuido y hasta suprimido debido a las tensiones de corte que involucra

la circulación de los GR en el organismo. Como se ha mencionado, la agregación eritrocitaria es un proceso reversible inducido por macromoléculas, sin embargo, existe una diferencia fundamental entre el fibrinógeno y ciertos expansores de plasma como el dextran. A medida que el fibrinógeno aumenta en concentración, se favorece la formación de *rouleaux*; por otro lado, un incremento de dextrán deriva en un máximo de formación de estructuras, luego de este punto, mayor concentración conlleva a la presencia de menos aglomerados de células [Buxbaum et al., 1982; Flormann et al., 2016] (Figura 2.4).

Para abordar la dinámica de las macromoléculas que intervienen en el proceso de agregación eritrocitaria, dos enfoques coexisten desde mediados del siglo XX, la teoría de *depletion* o agotamiento, y el modelo de *bridging* o puente. El modelo de bridging considera la adsorción de macromoléculas en la membrana del glóbulo rojo mientras que la teoría de depletion implica efectos coloidales. En este caso, la exclusión de macromoléculas suspendidas entre dos eritrocitos adyacentes crea un gradiente osmótico que reduce el grado de hidratación de la superficie de los GR y facilita el contacto de las membranas próximas.

### 2.5.1 *Depletion*

En esta construcción se considera un medio en el que hay esferas pequeñas rígidas, macromoléculas en el caso de la sangre, y dos grandes discos o esferas, los GR. El centro de masa de las esferas más pequeñas, no puede acercarse a la superficie de los cuerpos grandes a una distancia menor que el radio de dichas esferas pequeñas. Así se obtiene un volumen alrededor de los cuerpos grandes denominado *capa de agotamiento*. Cuando estas capas se superponen se obtienen zonas “prohibidas” como se ilustra en la Figura 2.5. Las macromoléculas no pueden ocupar este volumen que se convierte en una fase de solvente puro. De esta manera, una fuerza equivalente a la presión osmótica de la solución de macromoléculas actúa en la superficie exterior de los cuerpos grandes



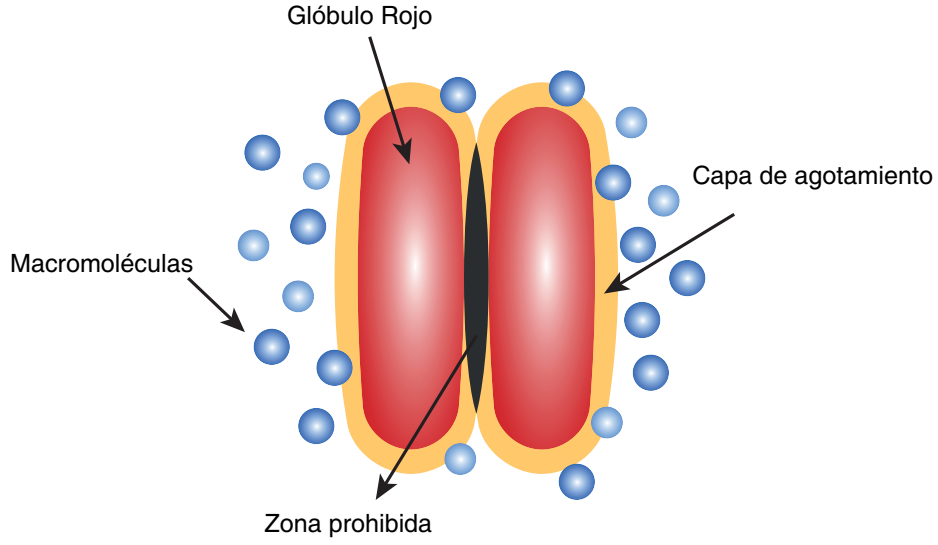
**Figura 2.4:** La curva de concentración de macromoléculas versus cantidad de agregados tiene una forma de campana, teniendo una concentración óptima para la máxima adhesión entre las células [Buxbaum et al., 1982; Flormann et al., 2016]. Las macromoléculas azules corresponden al eritrocito de la izquierda y las verdes al de la derecha. En el punto en que existe un 50 % de ocupación en cada célula, se puede inferir que la energía de interacción está en un máximo.

que origina la atracción mutua [Asakura y Oosawa, 1958].

Es posible aplicar esta teoría para explicar el mecanismo de agregación eritrocitaria. En este caso, se tienen en cuenta elementos de mayor complejidad como la capacidad de compresión de las macromoléculas cuando están cerca de una interfase [Vincent, 1990]. Además, las macromoléculas también pueden penetrar el glicocalix del eritrocito alterando el efecto atractivo originado por las moléculas exteriores [Neu y Meiselman, 2002]. Teniendo en cuenta los factores mencionados, puede escribirse la energía de interacción atractiva de la siguiente forma:

$$w_D = -2\Pi \left( \Delta - \frac{d}{2} + \delta - p \right), \quad (2.19)$$

donde  $\Delta$  es el grosor de la capa de agotamiento,  $d$  la distancia entre las caras adyacentes,  $\delta$  el grosor del glicocalix y  $p$  la distancia de penetración. El término de la presión osmótica  $\Pi$  se obtiene de la ecuación virial considerada hasta el segundo coeficiente



**Figura 2.5:** La teoría de *depletion* implica la existencia de una zona de solvente puro (color negro) entre los GR, a la cual no pueden acceder las macromoléculas (color azul), consecuencia de las capas de agotamiento (color amarillo) de ambas células.

( $B_2$ ), tal que:

$$\Pi = \frac{RT}{M_2} c_2^b + B_2 (c_2^b)^2 = -\frac{(\mu_1 - \mu_1^0)}{v_1}, \quad (2.20)$$

donde  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta,  $M_2$  es el peso molecular del polímero,  $c_2^b$  es la concentración de masa del polímero,  $\mu_1$  es el potencial químico del solvente en la solución del polímero,  $\mu_1^0$  es el potencial químico del solvente en solución libre y  $v_1$  es el volumen molecular del solvente. El espesor de la capa de agotamiento ( $\Delta$ ) se expresa considerando el equilibrio entre la energía elástica libre y las fuerzas osmóticas, en superficies que no absorben a las cadenas de polímeros, siendo:

$$\Delta = -\frac{\Pi}{2D} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{\Pi}{D}\right)^2 + 4\Delta_0^2}, \quad (2.21)$$

en la cual  $\Delta_0$  es el espesor de la capa de agotamiento para la concentración de polímero que fuga, según [Vincent, 1990] equivale a 1.4 veces el radio de giro del polímero, teniendo en cuenta su capacidad de compresión cerca de las interfases.  $D$  es función de

la concentración de masa del polímero ( $c_2^b$ ) y se expresa como:

$$D = \frac{2kT}{\Delta_0^2} \left( \frac{c_2^b N_A}{M_2} \right)^{\frac{2}{3}}, \quad (2.22)$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $N_A$  es el número de Avogadro.

La profundidad de penetración puede aproximarse de manera exponencial dependiendo de la concentración de masa del polímero, siendo:

$$p = \delta \left( 1 - e^{-c_2^b/c_2^p} \right), \quad (2.23)$$

donde  $c_2^p$  es la constante de penetración del polímero en solución y  $\delta$  se considera independiente de  $c_2^b$ . Esta simplificación no tiene en cuenta influencias locales del glicocalix ni efectos de la presión osmótica de la masa del polímero sobre las macromoléculas [Jones y Vincent, 1989; Vincent et al., 1986].

Por otro lado, para calcular la energía electrostática de interacción entre células es posible considerar un proceso de carga isotérmico teniendo la energía electrostática libre como:

$$E = \frac{1}{2} \int_0^d \int_0^\rho \psi(\rho, x) d\rho dx, \quad (2.24)$$

donde  $\psi$  es el potencial electrostático entre células, que depende de la densidad de carga  $\rho$ . Como la longitud de Debye-Hückel es pequeña en comparación con el espesor del glicocalix  $\delta$  y la distancia célula-célula  $d$ , el problema puede simplificarse aproximando el potencial electrostático entre células como una superposición de los correspondientes a células individuales. Con lo cual la energía electrostática de interacción queda como:

$$w_E = \frac{\sigma^2}{\delta^2 \varepsilon \varepsilon_0 \kappa^3} \begin{cases} \operatorname{senh}(\kappa \delta) (e^{\kappa \delta - \kappa d} - e^{-\kappa d}) & d \geq 2\delta \\ (2\kappa \delta - \kappa d) - (e^{-\kappa \delta} + 1) \operatorname{senh}(\kappa \delta - \kappa d) - \operatorname{senh}(\kappa \delta) e^{-\kappa d} & d < 2\delta \end{cases} \quad (2.25)$$

donde  $\varepsilon$  es la permitividad eléctrica del solvente,  $\varepsilon_0$  es la permitividad eléctrica del

vacío,  $\sigma$  es la densidad de carga superficial y  $\kappa^{-1}$  es la longitud de Debye-Hückel.

La energía total de interacción por unidad de área de la superficie celular para dos GR agregados está dada por la suma de las ecuaciones 2.19 y 2.25:

$$w_T = w_D + w_E. \quad (2.26)$$

Esta teoría permite explicar de manera simplificada el comportamiento de tipo campana de la Figura 2.4, puesto que los cambios en la energía de interacción total son replicados en la agregación de los GR. A mayor módulo de  $w_T$  mayor agregación y viceversa.

### 2.5.2 Bridging

A lo largo de los años se ha estudiado al fibrinógeno como una macromolécula que posibilita la adhesión de los GR, y por lo tanto contribuye al proceso de formación de rouleaux. Los primeros estudios se remontan a la década de 1960 mediante experimentos hemorreológicos. Particularmente se estudiaron las variaciones en la viscosidad de la sangre y las tensiones de corte involucradas para distintas concentraciones de fibrinógeno en el plasma. Se infirió así mayor adhesión celular debido a concentraciones mayores de fibrinógeno, registrando incrementos en la viscosidad de la suspensión de GR [Merrill et al., 1966]. Estudios posteriores se centraron en modelizar esta característica y extender las investigaciones a otras macromoléculas que mostraron comportamientos diferentes como el dextrán [Chien y Jan, 1973; Skalak y Zhu, 1990; Swenson et al., 1998]. El modelo de bridging sostiene que las macromoléculas filamentosas como el fibrinógeno, promueven la agregación al interponerse entre los eritrocitos formando *puentes* entre sus membranas, que reducen la repulsión electrostática de las células.

El marco teórico de la Física de adhesión celular se puede aplicar de manera general sin referenciar un mecanismo molecular específico y se centra en la formación del enlace

[N'Dri et al., 2003; Zhu, 1991]. La fuerza intermembrana, debido al entrecruzamiento de moléculas, es gobernada por ecuaciones de reacción, con tasas de reacción que son función de la distancia entre las membranas. El término de reacción para una célula se calcula sobre todas las demás células, obteniendo la distancia mínima entre células vecinas. Si esta distancia es menor a cierto umbral, el par formará un enlace. La ecuación de reacción para una densidad de enlaces por célula  $n_e$  es:

$$\frac{\partial n_e}{\partial t} = 2 \left[ k_+ \left( n - \frac{n_e}{2} \right)^2 - k_- n_e^2 \right], \quad (2.27)$$

donde  $n$  es la densidad de moléculas entrecruzadas en cada célula, y  $k_+$  y  $k_-$  son los coeficientes de avance y retroceso respectivamente, y están dados por:

$$k_+ = k_+^0 \exp \left[ -\frac{k_{ts} (l - l_0)^2}{2KT} \right], \quad |\mathbf{x}| = l < l_t, \quad (2.28)$$

$$k_- = k_-^0 \exp \left[ -\frac{(k_e - k_{ts}) (l - l_0)^2}{2KT} \right], \quad (2.29)$$

donde  $|\mathbf{x}|$  es la distancia entre células,  $l_t$  es la distancia umbral debajo de la cual el enlace es iniciado (fijada en 1.2 veces  $l_0$  que es la distancia sin estiramiento),  $l$  es la distancia con estiramiento,  $k_+^0$  y  $k_-^0$  son los coeficientes de avance y retroceso para el equilibrio,  $k_e$  es la constante elástica,  $k_{ts}$  es la constante elástica de transición,  $K$  es la constante de Boltzman y  $T$  es la temperatura absoluta. Los enlaces se comportan como resortes que se estiran, y la fuerza por cada uno está dada por:

$$f_e = k_e (l - l_0). \quad (2.30)$$

La fuerza de agregación  $f_{ag}$  por unidad de longitud de la membrana celular es:

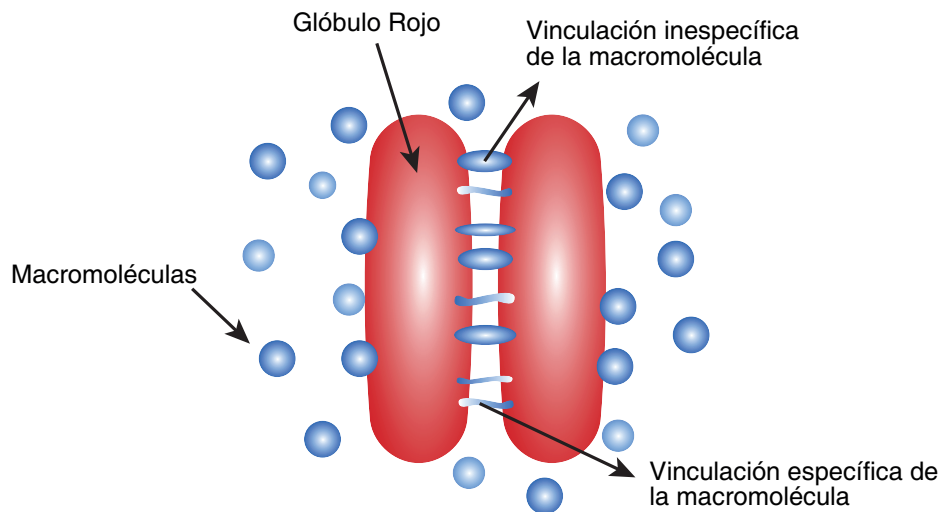
$$\mathbf{f}_{ag} = f_e n_e \frac{\mathbf{x}}{l}. \quad (2.31)$$

La aplicación de este marco teórico en simulaciones numéricas, permite establecer una relación de dependencia entre la deformabilidad del eritrocito y la estabilidad y cinética de los agregados [Bagchi et al., 2005]. Se ha encontrado que los agregados compuestos por GR más deformables son fácilmente dissociables por flujos de corte, mientras aquellos formados por otros más rígidos no lo son. Estos resultados están en consonancia con estudios clínicos que involucran patologías donde la deformabilidad de los GR está reducida [Baskurt et al., 2009b; Foresto et al., 2005; La Celle, 1975; McMahon, 2019].

El modelo de *bridging* permite explicar de manera intuitiva el comportamiento de tipo campana para la formación de agregados en presencia de macromoléculas. Si las superficies de los eritrocitos tuvieran “ocupados” todos los puntos de vínculo, no podría generarse un enlace hacia la otra célula (Figura 2.4). En consecuencia, es razonable pensar que el punto óptimo ocurrirá cuando ambas células tengan media ocupación de los puntos de vínculo en sus membranas. La suposición que sustenta este razonamiento es que ambas células agregadas contribuyen en igual número de moléculas a la formación del enlace, lo cual podría limitar en cierta forma el modelo a su ajuste empírico.

Otras interrogantes surgen, como ser la causa de la vinculación de la macromolécula al eritrocito. Se diferencian la vinculación específica y la inespecífica ilustradas en la Figura 2.6. La primera involucra elementos particulares de la macromolécula que se enlazan a ciertas proteínas en el eritrocito, la segunda refiere a varias partes de la macromolécula que se enlazan a diferentes proteínas o directamente a la membrana, consecuencia de interacciones de tipo Van der Waals [Carvalho et al., 2010].

En este capítulo se presentaron varios enfoques para abordar el comportamiento de los GR relacionado a la formación de agregados. La tendencia al día de hoy es que ocurren combinaciones de estas construcciones, en particular las propuestas en la Sección 2.5. Los fenómenos de *depletion* y *bridging* pueden coexistir en sistemas coloidales variando la concentración de los elementos mas pequeños, en nuestro caso las



**Figura 2.6:** En el modelo de *bridging*, existen vínculos específicos donde la macromolécula puede desenvolverse e interactuar con ciertas proteínas de la membrana, e inespecíficos como por ejemplo producto de fuerzas electrostáticas inducidas.

macromoléculas [Fantoni et al., 2015]. Como se ha mencionado, de acuerdo al modelo de *bridging*, la situación óptima para la formación de agregados se encuentra en ocupaciones medias para cada célula. Cuando la concentración de macromoléculas es mayor, las superficies de los GR se vuelven neutras ya que poseen ocupados todos sus puntos de vínculo, y una capa de agotamiento puede formarse llevando a las células a acercarse y formar agregados. El fenómeno de *depletion* puede ocurrir sin necesidad de tener *bridging* al 100% debido a la presión osmótica de las macromoléculas, y es por esto que ambos fenómenos coexisten.

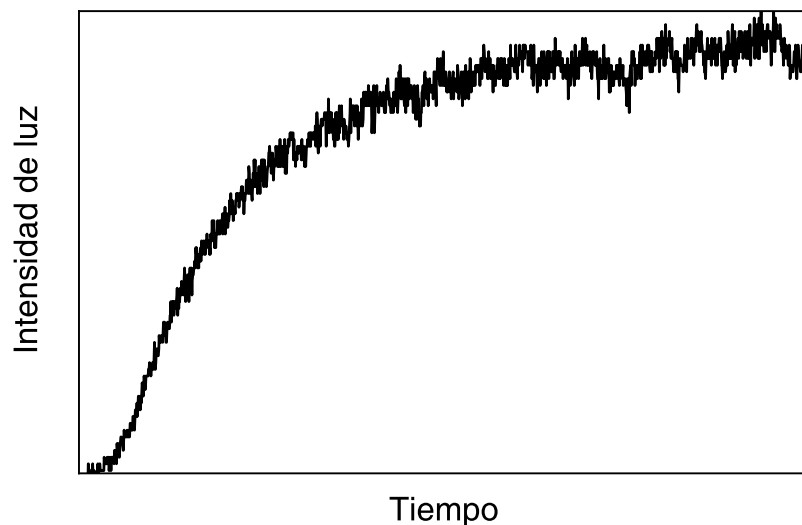
### **3. Análisis experimental de la dinámica de interacción eritrocitaria**

Las características de la dinámica de interacción de los GR pueden ser analizadas mediante diferentes métodos y técnicas, como por ejemplo:

- velocidad de eritrosedimentación (ESR) [Baskurt et al., 1998],
- índice de sedimentación zeta [Bull y Brailsford, 1972],
- viscosimetría de bajo corte [Lacombe y Lelièvre, 1987],
- análisis de imágenes en una cámara de flujo [Chen et al., 1994; D'Arrigo et al., 2009; Riquelme y Londero, 2018]
- ultra sonido [Boynard et al., 1987],
- retrodifusión láser [Altube et al., 2005; del Balzo et al., 2010]
- fotometría [Bauersachs et al., 1989]
- difractometría láser [Rasia et al., 1990; Riquelme et al., 1998]
- análisis digital de imágenes por microscopía [Dumas et al., 2004; Fontana et al., 2012; Kaliviotis et al., 2016]
- electrorreología [Antonova et al., 2008]

### 3.1 Técnicas de transmisión y retrodifusión de la luz

El registro de la intensidad de luz transmitida bajo ciertas condiciones de tensión corte, ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de la interacción eritrocitaria [Baskurt et al., 2009c]. El gráfico de variación de intensidad de luz transmitida en función del tiempo es denominado “silectograma” por su nombre en inglés “*syllectogram*” [Brinkman et al., 1966]. En la Figura 3.1 se muestra un silectograma típico obtenido en los experimentos de esta tesis. Existen también algunos instrumentos comerciales que analizan estos *silectogramas* en un sistema fotométrico para una muestra sometida a tensión de corte, mediante los principios desarrollados por Schmid-Schönbein [Klose et al., 1972].



**Figura 3.1:** Silectograma de una muestra de sangre representando la intensidad de luz (registrada por algún medio en unidades arbitrarias) en función del tiempo.

Los equipos emplean contenedores de diferentes geometrías para la aplicación de tensiones de corte, y requieren diferentes volúmenes de muestra. Es así que, las técnicas matemáticas para el análisis de los *silectogramas* son diversas, resultando entonces en distintos parámetros representativos del fenómeno. A continuación, se describen los instrumentos más utilizados [Baskurt et al., 2009d]:

- El agregómetro Myrenne (Myrenne MmbH, Rotgen, Alemania) posee un cono giratorio de 2 grados de libertad y un plato estacionario, con un camino óptico de aproximadamente 2 mm desde el centro del eje del cono. Este agregómetro requiere 30  $\mu\text{l}$  de sangre para rellenar la cámara de prueba entre el cono y el plato. El software de este dispositivo calcula el área bajo la curva del *silectograma* luego de una detención repentina del esfuerzo de corte aplicado a la muestra.
- El sistema LORCA (RR Mechatronics, Hoorn, Países Bajos) utiliza un sistema de flujo del tipo Couette con 400  $\mu\text{m}$  de espaciamiento entre cilindros y detecta la luz láser retrodifundida por las suspensión de GR. Este dispositivo requiere 2 mL de sangre para rellenar el espacio entre los cilindros. El software de LORCA calcula el cociente entre el área debajo del *silectograma* y el área total en un determinado período de tiempo, como índice de agregación. Este sistema también calcula el *tiempo-mitad* de agregación de los GR y dos constantes temporales que caracterizan las componentes rápidas y lentas del fenómeno [Hardeman et al., 2001].
- El *Eritroagregómetro* (Regulest, Francia) es también de sistema de flujo de Couette y mide la luz retrodifundida por la suspensión de GR. Determina dos parámetros: el tiempo de agregación principal (el recíproco de la pendiente del *silectograma* en el origen) y un índice de agregación calculado como en el agregómetro Myrenne.

En los últimos años se han propuesto diversos dispositivos de pequeñas dimensiones (chips) que utilizan volúmenes de muestras mucho más pequeños y se basan en fenómenos ópticos para la evaluación de la agregación eritrocitaria [Picot et al., 2015; Shin et al., 2009].

Los parámetros que pueden obtenerse mediante el análisis del *silectograma* (e.g., agregación en estasis, constante temporal) deben ser sensibles respecto a los diferentes aspectos de la agregación de GR. La sensibilidad y precisión de estos parámetros puede diferir, afectando así el valor del índice como herramienta de investigación. La probabi-

lidad de detectar una diferencia entre grupos de estudio está relacionada a la precisión y variabilidad del parámetro, este indicador de certeza puede ser utilizado para calcular la cantidad de muestra requerida en un estudio. Por esto, es importante conocer la precisión y sensibilidad del parámetro, respecto a las alteraciones de la agregación.

En el Capítulo 4 se presenta el análisis de la técnica de transmisión de luz, los resultados de su aplicación y el desarrollo de un “agregómetro eritrocitario de chip óptico portátil” de alto potencial clínico.

## 3.2 Técnica de Biospeckle

La interacción entre células sanguíneas puede ser estudiada con otro enfoque más complejo que la transmisión de luz, pero más versátil, consistente en registrar en dos dimensiones la variación de intensidad de luz dispersada, obteniendo así, secuencias temporales de “imágenes” para extraer información sobre el fenómeno físico estudiado.

### 3.2.1 El fenómeno de speckle láser

La aplicación del fenómeno conocido como *speckle* (moteado en inglés) surgió gracias al aumento en la coherencia de los láseres [Jones y Wykes, 1989]. Inicialmente, este fenómeno fue considerado como un efecto que degradaba las imágenes generadas con un láser. Sin embargo, a medida que se fue conociendo más profundamente, dejó de ser un problema para convertirse en la base de nuevas técnicas de medición.

El efecto speckle ocurre cuando una superficie ópticamente rugosa es iluminada por una onda de luz coherente. En dicha superficie, las diferencias de alturas entre puntos vecinos son del orden o mayores que la longitud de onda de la luz incidente, la cual es dispersada en direcciones aleatorias. La consecuencia de esta dispersión en un punto lejano de observación, es un campo óptico resultante de las ondas difundidas por cada punto de la superficie iluminada. De esta manera, se obtiene una distribución

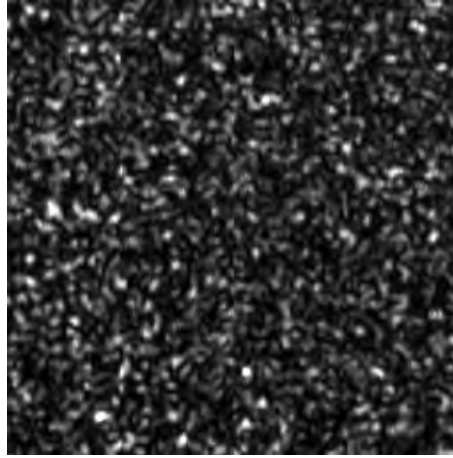
espacial de puntos claros y oscuros, producto de las zonas de interferencia constructiva o destructiva.

Debido a alteraciones del elemento dispersor, como desplazamientos, giros y deformaciones, la distribución del campo óptico se modifica [Goodman, 1975] y, en consecuencia, puede ser aprovechada para estudiar las características de dicho elemento. En virtud de esta propiedad de la distribución de speckle, se desarrollaron numerosos métodos de medición de alta sensibilidad en superficies dispersoras, dando origen a la *Interferometría de Speckle*, una técnica basada en la superposición de una distribución de speckle con otra similar o un campo uniforme. Los desarrollos tecnológicos, en lo que respecta a sistemas de cómputos y de adquisición de datos y al desarrollo de algoritmos de procesamiento de señal, hicieron posible la aplicación de cámaras de video conectadas a computadoras, que proveen capacidad para el almacenamiento y procesamiento de las imágenes adquiridas y la posibilidad de visualizar los resultados en tiempo real.

### 3.2.2 Formación de una distribución de speckle

Cuando se ilumina una superficie dispersora con una luz coherente, cada punto de la misma actuará como una fuente secundaria de ondas esféricas, de acuerdo al principio de Huygens-Fresnel. Por lo tanto, la amplitud del campo óptico en un punto dado de observación estará determinada por la suma de la totalidad de las ondas elementales provenientes de cada punto dispersado por dicha superficie. Debido al carácter aleatorio de la distribución de elementos dispersores de la superficie, los valores iniciales del campo complejo de dichas ondas elementales también tendrán valores aleatorios. En consecuencia, el valor del campo variará aleatoriamente para diferentes puntos de observación. Esta distribución de campo espacial aleatoria en intensidad y fase se denomina *speckle* y se muestra un ejemplo en la Figura 3.2.

La distribución de speckle ocupa todo el espacio atravesado por la luz difundida y puede ser observada interponiendo una pantalla (por ejemplo, el CCD de una cámara) o



**Figura 3.2:** Distribución de speckle obtenida iluminando una muestra de sangre.

proyectándola mediante un sistema óptico. En el primer caso se obtiene *speckle objetivo*, pues depende únicamente de las características globales de la totalidad de la superficie dispersora y de la posición del plano de observación respecto de la misma. En el segundo caso se obtiene *speckle subjetivo*, porque el sistema óptico a través del cual se observa la distribución de speckle condiciona sus propiedades.

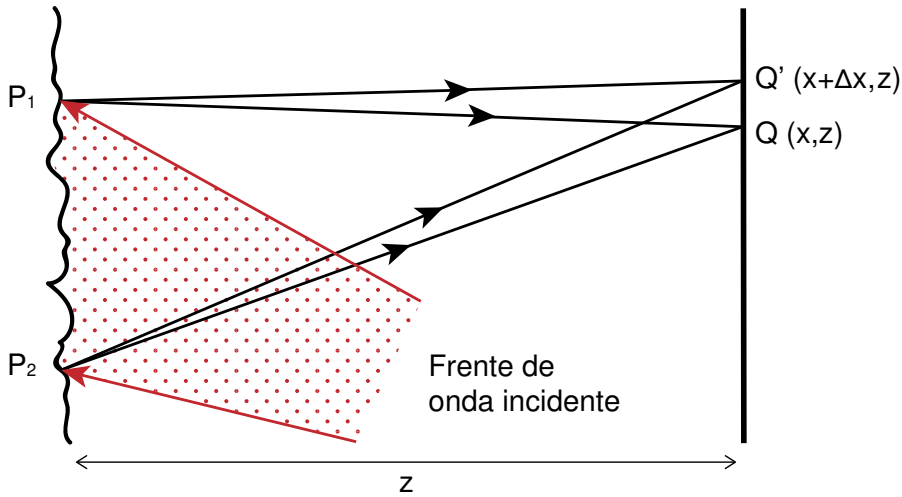
### Speckle objetivo

Cuando una fuente de luz coherente de longitud de onda  $\lambda$  ilumina una superficie localizada en el plano  $xy$ , como se muestra en la Figura 3.3, la amplitud compleja  $\Omega(\mathbf{r})$  de la luz dispersada en el punto  $Q(\mathbf{r})$  es la suma de las componentes elementales dispersadas por toda la superficie. Esta amplitud puede expresarse como [Jones y Wykes, 1989]:

$$\Omega(\mathbf{r}) = \kappa_c \iint_S \omega_i(x, y) \exp\left[\frac{2\pi j}{\lambda} G \xi(x, y)\right] dx dy, \quad (3.1)$$

donde  $j$  es la unidad imaginaria,  $\mathbf{r}$  es el vector posición de los puntos  $Q$ ,  $S$  es la superficie dispersora,  $\kappa_c$  es una constante,  $\omega_i$  representa la amplitud compleja de la luz incidente en  $(x, y)$ ,  $\xi(x, y)$  es la altura de la superficie en dicho punto y  $G$  es un factor

geométrico asociado con las direcciones de iluminación y observación, el cual puede ser considerado constante cuando  $Q$  está lo suficiente lejos de la superficie dispersora. Dado que las posiciones de los elementos dispersores varían aleatoriamente en una magnitud del orden o mayor que  $\lambda$ , los términos de fase  $G \xi(x, y)$  también variarán aleatoriamente en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, la amplitud resultante en el punto  $Q$  se describe por medio de un conjunto de vectores de fase aleatoria, los cuales, al ser sumados en forma conjunta, generan una amplitud resultante aleatoria. Este problema se conoce como *paseo aleatorio*.



**Figura 3.3:** Formación del speckle objetivo.

La amplitud total varía entre cero y un valor máximo, y se determina por la magnitud y la fase de las amplitudes individuales. A medida que el punto de observación se mueve, tanto la amplitud resultante como la intensidad asumirán un valor aleatorio diferente. A esta variación de intensidad se la denomina efecto speckle.

Si se considera que el área iluminada tiene dimensiones  $l_0 \times l_0$  y está limitada por los puntos  $P_1$  y  $P_2$ , como se indica en la Figura 3.3, la diferencia de camino  $s$  desde los puntos  $P_1$  y  $P_2$  a  $Q(x, y)$  se expresa como:

$$s = (P_1Q - P_2Q) \approx \frac{x l_0}{z} + \frac{1}{2} \frac{l_0^2}{z}. \quad (3.2)$$

De forma análoga, para un punto adyacente  $Q'(x + \Delta x, z)$  se tiene que dicha diferencia de camino está descripta por:

$$(P_1Q' - P_2Q') \approx \frac{x l_0}{z} + \frac{1}{2} \frac{l_0^2}{z} + \frac{\Delta x l_0}{z}. \quad (3.3)$$

Luego, la diferencia relativa de camino entre  $Q$  y  $Q'$  es:

$$\Delta s = \frac{\Delta x l_0}{z}. \quad (3.4)$$

Para los puntos tales que  $\Delta s < \lambda$ , las fases relativas de todas las componentes serán aproximadamente las mismas. Por otra parte, si:

$$\Delta s = \frac{\Delta x l_0}{z} \approx \lambda, \quad (3.5)$$

dichas fases relativas serán suficientemente diferentes tal que la intensidad en  $Q'$  no esté correlacionada con la incidente en  $Q$ . En consecuencia, el tamaño medio del grano de speckle  $d_{sp}$  está expresado por:

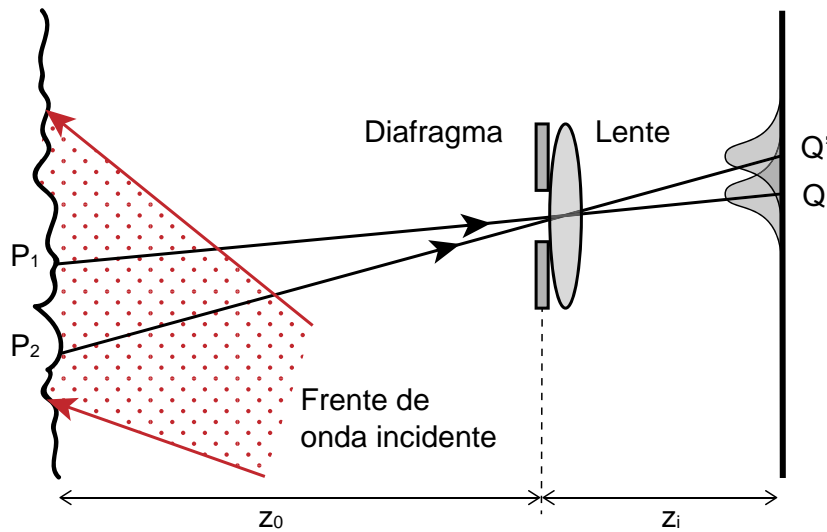
$$d_{sp} = \frac{\lambda z}{l_0}. \quad (3.6)$$

Finalmente, el tamaño de los granos de speckle, observados en la luz dispersada por una superficie ópticamente rugosa, depende del área iluminada y de la posición de la pantalla de observación, pero no del sistema óptico utilizado para visualizarlo. Por esta causa, a este tipo de speckle se lo denomina como *objetivo*.

### **Speckle subjetivo**

En este caso, la imagen de la superficie iluminada se reconstruye por medio de un sistema óptico formado por una lente y un diafragma de abertura circular, como

se indica en la Figura 3.4 [Jones y Wykes, 1989]. Un punto  $P_1$  perteneciente a la superficie del objeto iluminado forma un diagrama de difracción centrado en el punto  $Q$ . La distribución de intensidad corresponde a un patrón de difracción de Airy y la luz que proviene de  $P_1$  tiene una fase aleatoria asociada con la variación aleatoria de la rugosidad de la superficie. El punto  $Q$  también se ilumina por puntos adyacentes a  $P_1$ , los cuales producen figuras de difracción que se superponen, y que también poseen fases aleatorias debido a la rugosidad de la superficie. Un punto  $P_2$ , localizado de forma tal que su figura de difracción está centrada en  $Q'$  y con el primer mínimo coincidente con  $Q$ , no contribuye a la iluminación de éste último. Los puntos más alejados de  $P_1$  contribuirán muy poco a la iluminación de  $Q$ , dado que los máximos secundarios de sus figuras de difracción son mucho más pequeños que el máximo principal y entonces su contribución puede ser despreciada.



**Figura 3.4:** Formación del speckle subjetivo.

De este modo, la intensidad de luz en  $Q$  está dada por las contribuciones de un área de la superficie del objeto centrada en  $P_1$ , cuyo radio es la distancia entre  $P_1$  y  $P_2$ . En este caso, el tamaño promedio del grano de speckle  $d_{sp}$  corresponde al radio del disco de Airy, es decir:

$$d_{sp} = 1,22 \frac{\lambda z_i}{D}, \quad (3.7)$$

donde  $z_i$  es la distancia de la pupila al plano de observación y  $D$  es el diámetro de la pupila. La distancia  $P_1P_2$ , que es igual al radio del elemento difusor de la superficie que dispersa luz en el punto  $Q$ , está expresada por:

$$(d_{sp})_{obj} = 1,22 \frac{\lambda z_o}{D}, \quad (3.8)$$

donde  $z_o$  es la distancia entre la pupila y la superficie dispersora. A esta zona se la denomina *célula de resolución* del sistema óptico y corresponde al grano de speckle sobre el objeto.

Si denominamos con  $M_g$  al valor absoluto de la magnificación del sistema óptico y  $\mathcal{F}$  a la distancia focal imagen, se puede escribir:

$$z_i = (1 + M_g)\mathcal{F}, \quad (3.9)$$

$$z_o = \frac{z_i}{M_g} = \frac{1 + M_g}{M_g}\mathcal{F}. \quad (3.10)$$

Considerando a  $\mathcal{F}_D = \mathcal{F}/D$  como la apertura numérica del sistema óptico, el diámetro medio del grano de speckle sobre el plano de observación resulta:

$$d_{sp} = 1,22 \lambda \mathcal{F}_D (1 + M_g). \quad (3.11)$$

Finalmente, el diámetro medio del grano de speckle sobre el objeto es:

$$(d_{sp})_{obj} = 1,22 \frac{\lambda \mathcal{F}_D (1 + M_g)}{M_g}. \quad (3.12)$$

### Descripción estadística de una distribución de speckle

El estudio de las propiedades del speckle en condiciones generales es complejo, por lo que se ha desarrollado a partir del caso simplificado, en el cual tanto el objeto dispersor como la luz dispersada verifican las siguientes condiciones [Goodman, 1975; Kreis, 1996]:

- El número de elementos dispersores que contribuyen a la formación del speckle es muy grande y del mismo orden de magnitud para todos los puntos de la distribución.
- La amplitud y la fase de las ondas elementales que originan el speckle son variables aleatorias independientes entre sí.
- La fase de dichas ondas elementales es una variable aleatoria de distribución uniforme en el intervalo  $[-\pi, \pi]$ . Esta condición se puede asumir porque la superficie es ópticamente rugosa.
- La luz utilizada es monocromática.
- La luz difundida está polarizada linealmente.

En estas condiciones, la distribución obtenida se denomina *speckle completamente desarrollado*. Si las condiciones enumeradas anteriormente no se verifican en su totalidad, las propiedades de la distribución se alteran dando lugar al *speckle parcialmente desarrollado*. Las propiedades de este último se estudian como desviaciones del comportamiento ideal del speckle. De todas formas, en la mayoría de las aplicaciones prácticas se puede considerar, con un alto grado de aproximación, que el speckle es completamente desarrollado.

### 3.2.3 Biospeckle láser (BSL)

Como se explicó anteriormente, el “speckle láser” es un efecto de interferencia aleatorio debido a la iluminación con una fuente de luz coherente. Las técnicas de speckle han sido recientemente trasladadas al campo de la Biomedicina desde el área de la Metrología Óptica. En particular, el *biospeckle* es producto de un patrón de speckle dinámico puesto que varía en el tiempo, consecuencia de un proceso biológico en curso, como lo es por ejemplo la agregación eritrocitaria. Diversos trabajos recientes han incursionado en la técnica de biospeckle para caracterizar la dinámica de sistemas biológicos [Ansari y Nirala, 2015; Braga et al., 2017; Cardoso et al., 2011; White et al., 2011].

El registro digital de la evolución temporal de las distribuciones de biospeckle (BSL) y su posterior análisis numérico permite correlacionar la actividad detectada con cambios en el funcionamiento biológico de células y tejidos [Rabal y Braga, 2009]. La elección de un conjunto determinado de algoritmos de análisis está determinada por la naturaleza de la señal registrada. En el caso de un material homogéneo, se prefieren los métodos numéricos estadísticos. Por el contrario, para el caso de materiales no homogéneos, los métodos de procesamiento de imágenes han mostrado mayor eficiencia para interpretar la actividad de la muestra [Rabal y Braga, 2009]. Se ha reportado el uso de técnicas basadas en BSL en diversas áreas tales como evaluación de la capacidad germinativa y la humedad de semillas, el control de maduración de frutos, la determinación de densidad vascular funcional, la quimiotaxis y la motilidad de microorganismos, detección de hongos y el relevamiento de circulación sanguínea microvascular [Ansari y Nirala, 2015; White et al., 2011]. Son de reciente desarrollo técnicas de procesamiento de BSL en las cuales es posible caracterizar patrones con secuencia de agregación eritrocitaria en sangre [Yeom y Lee, 2015] y así detectar alteraciones en el fluido debido a la dinámica celular y la presencia de analitos.

En el Capítulo 5 se investiga esta técnica y su potencialidad a la aplicación en el ámbito clínico. Es importante destacar, que casi no existen aún desarrollos de dispositivos comerciales de estudio de la sangre que incursionen en el biospeckle, siendo un área de interés puesto que sus capacidades son cada vez más exploradas debido a la creciente disponibilidad de hardware más eficiente y menos costoso.

### 3.3 Análisis digital de imágenes microscópicas

La microscopía permite la observación directa de los componentes de la sangre, sin embargo, es fundamental la disminución de la cantidad de elementos a observar para obtener una imagen aceptable. Por ejemplo, el 40 % del volumen de la sangre normalmente se compone de glóbulos rojos, pero para permitir su visualización es necesario reducir esta cantidad con respecto al medio de suspensión al 2 % o menos.

Mediante la observación directa de estados de componentes de la sangre, es posible formular descriptores basados en el procesamiento digital de imágenes [Mancilla Canales et al., 2018]. En el caso de imágenes obtenidas por campo claro, la detección de bordes, el reconocimiento de geometrías particulares y el aislamiento de regiones de interés son, entre otros, recursos indispensables para analizar distintos aspectos de los componentes biológicos. En este sentido, se han definido parámetros que cuantifican la morfología de los agregados de GR desde una imagen digital. Por ejemplo el parámetro  $S$  y el *coeficiente de células individuales*, que relacionan el número total de células y el número de células aisladas en la imagen [Alet et al., 2015; Ponce de León et al., 2013]. Además del descriptor que evalúa la forma de los agregados (*ASP*) estudiando su área en la imagen [Fontana et al., 2012; Foresto et al., 2005].

Otros métodos, como la microscopía confocal, hacen uso de fuentes de luz láser en lugar de luz blanca y también involucran elementos reactivos (fluoróforos, anticuerpos específicos, tratamientos químicos, etc.) para estudiar de manera colocalizada los

aspectos de interés [Dumas et al., 2004]. Técnicas más recientes utilizan recursos ópticos como la microscopía confocal multifotón, pero complejizan aún más la fuente de iluminación y los elementos de detección, en pos de evitar el uso de marcadores, que son elementos invasivos que alteran la muestra observada [Djaker et al., 2007]. Esto se abordará en el Capítulo 6 aplicado al estudio de la agregación eritrocitaria.

Por el momento, las estrategias mencionadas anteriormente no son propicias para el ámbito clínico debido a varios factores: la complejidad de los principios empleados, la manipulación especial de las muestras de sangre, el eventual tratamiento con agentes externos, el procesamiento de datos por software no “enlatado”, la complejidad técnica de hardware y, principalmente, el costo y la limitada disponibilidad de los equipos.

### 3.3.1 Microscopía CARS

La microscopía o espectroscopía por dispersión Raman es una técnica que ha experimentando un gran auge en el campo de la Biofísica. Como en el caso de la espectroscopía de infrarrojo (IR), la microscopía Raman es una técnica basada en vibraciones moleculares que proporciona detalles sobre la composición química, la estructura molecular y las interacciones moleculares en células y tejidos. Dado que las disfunciones biológicas generalmente conducen a cambios en la composición molecular de los tejidos afectados, es posible detectarlos en los espectros vibracionales. Además, si los cambios espectrales son lo suficientemente específicos, pueden usarse como marcadores fenotípicos de la enfermedad.

El efecto Raman fue descubierto por C.V. Raman en 1928 [Raman y Krishnan, 1928]. Cuando una luz monocromática ilumina una sustancia se produce una dispersión de origen electrónico. La mayor parte es la dispersión de Rayleigh, que tiene la misma frecuencia que la luz incidente. Una parte mucho más pequeña de la luz dispersada cambia de frecuencia, debido a una transferencia de energía a las moléculas (o viceversa) durante la oscilación del electrón.

La energía  $E_0$  de un fotón del haz del láser se define como:

$$E_0 = h\nu_0 = h\frac{c}{\lambda_0}, \quad (3.13)$$

donde  $\nu_0$  es la frecuencia del fotón,  $h$  es la constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-34} Js$ ) y  $c$  es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8 m/s$ ).

Cuando la energía del fotón incidente se transfiere a la energía de vibración molecular o viceversa, la luz dispersada pierde (dispersión de Stokes) o gana (dispersión anti-Stokes) una cantidad energía  $\Delta E$ , definida por:

$$\Delta E = E_\nu = h\nu_\nu = h\frac{c}{\lambda_\nu} = hc\tilde{\nu}, \quad (3.14)$$

donde  $\tilde{\nu}$  es el número de onda, expresado en  $cm^{-1}$ , correspondiente a la frecuencia Raman.

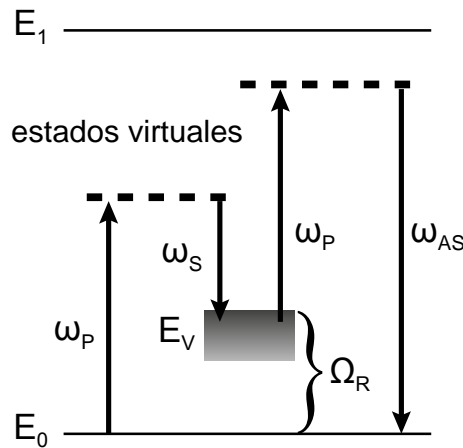
La dispersión Raman es muy débil en comparación con la dispersión de Rayleigh y la dispersión de fluorescencia, siendo la probabilidad de emisión de un fotón Raman de uno en un millón. Por este motivo, la dispersión Raman resultó ser difícil de usar hasta el desarrollo de potentes fuentes láser y filtros muy selectivos que permitieron filtrar la intensa señal de dispersión de Rayleigh.

Las imágenes basadas en la dispersión Raman no solo proporcionan información espectral y estructural sobre las moléculas intrínsecas de la muestra, sino también sobre la distribución espacial de estas moléculas de interés, sin ningún tratamiento químico o marcado cromático. El uso de esta técnica cubre varios aspectos de investigación en el campo biomédico, como por ejemplo el estudio de la estructura de proteínas y ADN [Benevides et al., 1991; Berjot et al., 1987; Kneipp et al., 1998], virus [Overman y Thomas Jr, 1998], células humanas vivas [Puppels et al., 1994; Schut et al., 1997] y diagnóstico de tumores cancerígenos [Choo-Smith et al., 2002; Ling et al., 2002].

La dispersión espontánea de Raman (SRS) y las imágenes IR son métodos comunes

en la microscopía vibracional. El IR está limitado por una baja resolución espacial debido a las grandes longitudes de onda involucradas. Como la microscopía SRS funciona en las longitudes de onda visibles o del IR cercano, evita este problema, sin embargo, está limitada por su baja sección eficaz ( $\sigma = 10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ s}$ ).

La espectroscopía anti-Stokes Raman coherente (CARS) presenta una señal que es consecuencia de una oscilación vibracional colectiva con una fase bien definida y su intensidad crece cuadráticamente con el número de moléculas. Los fotones se emiten en la dirección donde la señal es constructiva, esta condición se conoce como “condición de concordancia de fase” (*phase-matching* en inglés) [Zumbusch et al., 1999]. La muestra estudiada se ilumina simultáneamente con una frecuencia de pump ( $\omega_P$ ) y una frecuencia de Stokes ( $\omega_S$ ). Un fotón anti-Stokes es emitido de forma estimulada a la frecuencia  $\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$  siendo la diferencia entre ellas la frecuencia vibracional resonante del enlace molecular excitado [Potma et al., 2002],  $\Omega_R = \omega_P - \omega_S$ , como se muestra en la Figura 3.5. Los fotones de otras frecuencias que no satisfagan esta condición, constituirán ruido electrónico y contribuciones no resonantes.



**Figura 3.5:** Diagrama de energía para el proceso CARS. La emisión anti-Stokes ( $\omega_{AS}$ ) se genera combinando los haces de pump ( $\omega_P$ ) y Stokes ( $\omega_S$ ). Desde el estado fundamental  $E_0$ , nunca se alcanza el estado electrónico excitado  $E_1$ .  $E_V$  es el estado vibracional del modo resonante Raman y tiene frecuencia  $\Omega_R$ .

## Descripción teórica

Cuando fuentes de luz coherente, monocromática, direccional y de alta intensidad interactúan con un material, dan lugar a lo que se conoce como generación óptica *no lineal*. En este caso, la respuesta del material excitado con un campo óptico intenso depende de la intensidad del mismo campo de manera no lineal. Las propiedades ópticas del material comienzan a depender de forma cuadrática o cúbica de la intensidad de excitación, así como de la naturaleza espectral, temporal y espacial del campo electromagnético resultante. La relación constitutiva entre la polarización inducida  $\mathbf{P}_i$  en el material y el campo eléctrico  $\mathbf{E}$  de la luz incidente admite un desarrollo en potencias de los componentes de polarización del campo, que tiene la siguiente forma:

$$\mathbf{P}_i = \epsilon_0 \left[ \chi_{ij}^{(1)} \mathbf{E}_j + \chi_{ijk}^{(2)} \mathbf{E}_j \mathbf{E}_k + \chi_{ijkl}^{(3)} \mathbf{E}_j \mathbf{E}_k \mathbf{E}_l + \dots \right], \quad (3.15)$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío y  $\chi^{(i)}$  es el tensor susceptibilidad eléctrica de orden  $i$ .

Asumiendo un material isótropo, y caracterizado por una susceptibilidad lineal  $\chi^{(1)}$  puramente real (lo que equivale a despreciar la absorción lineal), es posible escribir la polarización  $\mathbf{P}(\omega)$  mediante sus componentes [Shen, 2003]:

$$\mathbf{P}(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \mathbf{E}(\omega) + \mathbf{P}^{NL}(\omega), \quad (3.16)$$

donde  $\mathbf{P}^{NL}(\omega)$  es la polarización no lineal inducida en el medio.

Para escribir la ecuación de onda no lineal se combinan el conjunto de ecuaciones de Maxwell que describe la propagación de ondas en un medio material. En el caso de un medio no magnético donde las densidades de carga y la corriente macroscópica son nulas (lo cual es generalmente el caso en la óptica), se obtiene:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}. \quad (3.17)$$

Luego, reemplazando la ecuación 3.16 en la ecuación 3.17 se obtiene:

$$\nabla^2 \mathbf{E}(\omega) + n^2(\omega) \frac{\omega^2}{c^2} \mathbf{E}(\omega) = -\frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \mathbf{P}^{NL}(\omega), \quad (3.18)$$

donde  $n(\omega) = \sqrt{1 + \chi^1(\omega)}$  es el índice de refracción del medio a la frecuencia  $\omega$ . Además,  $\mathbf{E}(\omega) = E(z, t)e^{i(kz - \omega t)}$  y  $\mathbf{P}^{NL}(\omega) = P^{NL}(z, t)e^{-i\omega t}$ .

La ecuación 3.18 se conoce como *ecuación de ondas no lineal*. Tiene la forma de la ecuación de onda habitual para un medio con un índice de refracción  $n(\omega)$  con un término adicional proporcional a la polarización no lineal del medio. Los productos de amplitud de campo contenidos en  $\mathbf{P}^{NL}(\omega)$  describen la interacción entre las ondas láser presentes en el medio no lineal y los coeficientes de acoplamiento entre ondas son proporcionales a las susceptibilidades no lineales del material.

La dispersión anti-Stokes Raman coherente es una mezcla de cuatro ondas que implica al parámetro de susceptibilidad  $\chi^{(3)}$ . Por lo tanto, es un proceso no lineal de tercer orden basado en la dispersión Raman, en el que interactúan un láser pump  $\omega_P$  y un láser de Stokes  $\omega_S$  ( $\omega_P > \omega_S$ ). Los respectivos campos electromagnéticos con amplitudes  $E_P$  y  $E_S$ , que tienen los vectores de onda  $k_P$  y  $k_S$ , interactúan con un medio e inducen una polarización de tercer orden que se describe por [Lotem et al., 1976; Shen, 2003]:

$$P^{(3)}(\omega_{AS}) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{AS}; \omega_P, \omega_P, -\omega_S) E_P^2(\omega_P) E_S^*(\omega_S). \quad (3.19)$$

En general la ecuación 3.18 no puede resolverse, sin embargo es posible aplicar la *aproximación de envolvente de variación lenta* (SVEA), que consiste en suponer que las envolventes de campo varían lentamente en tiempo y espacio con respecto a la longitud de onda, despreciando la derivada segunda en la ecuación de propagación. De

esta manera, en función del campo anti-Stokes  $E_{AS}$  se tiene:

$$\left( \frac{\partial}{\partial z} + \frac{n}{c} \frac{\partial}{\partial t} \right) E_{AS}(z, t) = \frac{i}{2\epsilon_0} \frac{\omega_{AS}}{nc} P^{(3)} e^{-ik_{AS}z}. \quad (3.20)$$

Reemplazando la polarización (ecuación 3.19) en la ecuación anterior e integrando a lo largo del eje óptico con condición inicial  $E_{AS} = 0$  se obtiene:

$$E_{AS}(D) = i \frac{\omega_{AS}}{nc} \chi^{(3)} E_P^2 E_S^* \frac{e^{i\Delta k D} - 1}{i\Delta k}, \quad (3.21)$$

donde  $D$  es la distancia de interacción CARS o la sección de la muestra. Finalmente, como la intensidad es proporcional al cuadrado del campo eléctrico resulta:

$$I_{AS} \propto |E_{AS}|^2 = \left( \frac{\omega_{AS}}{nc} \right)^2 |\chi^{(3)}|^2 I_P^2 I_S D^2 \left( \frac{\text{sen}(\Delta k D/2)}{\Delta k D/2} \right)^2. \quad (3.22)$$

El parámetro ( $\Delta k = k_{AS} - (2k_P - k_S)$ ) expresa la relación entre los vectores de onda de los campos implicados y define la anteriormente mencionada *phase-matching*, siendo  $\Delta k D \ll \pi$ , lo que ocurre si  $\Delta k = 0$  o  $D \approx 0$ . En la microscopía CARS,  $\Delta k = 0$  se satisface siempre debido al uso de objetivos de inmersión con gran apertura numérica. Según la ecuación 3.22, la intensidad de la señal anti-Stokes depende linealmente de la intensidad del láser de Stokes ( $I_S$ ) y de forma cuadrática de la intensidad del láser pump ( $I_P$ ), así como del parámetro  $\chi^{(3)}$  que es específico para cada medio. Este parámetro es el que dará la especificidad de CARS como herramienta, la cual consiste en la capacidad de sintonizar los modos resonantes de interés en la muestra [Djaker et al., 2007].

CARS resulta una técnica útil para estudios no invasivos en elementos biológicos ya que previene el daño fotoquímico, pues no hay población de estados electrónicos excitados de la molécula, tiene selectividad química y capacidad de seccionamiento 3D y, lo que es más importante, no requiere el uso de marcaje como mecanismo de contraste.

**II**

## **Desarrollos experimentales**

## 4. Técnica de transmisión de luz

### 4.1 Introducción

La manera en que la luz se comporta al incidir en un medio, brinda gran cantidad de información sobre lo que está ocurriendo en el mismo. La luz puede ser absorbida, dispersada o, si es un medio transparente, transmitida. En el caso de los fluidos biológicos y particularmente la sangre, contamos con medios que generarán las tres respuestas. Es importante notar, que la señal registrada se compondrá de luz no dispersada y luz dispersada hacia adelante (*forward-scattering*), obteniendo intensidades de señal superiores a la luz retrodispersada (*back-scattering*), siendo una ventaja que proporciona un medio semitransparente como la sangre.

Las estructuras de los *rouleaux* y los aglomerados de células son tridimensionales y complejas, además, otros procesos ocurren en simultáneo, como la sedimentación de las células o deshidratación de la muestra. La dinámica de agregación eritrocitaria ocurre en aproximadamente 5 minutos, es un proceso relativamente lento pero que tiene fases marcadas y tiempos característicos. De esta manera, a medida que la dinámica de interacción eritrocitaria se desarrolla, y se registra el paso de luz a través de la muestra, es razonable pensar que si las células se agrupan y redistribuyen, el paso de luz será mayor. Sin embargo se debe recordar que no es simplemente un plano de células, sino un volumen de elementos suspendidos. Así, la cantidad de elementos dispersores es un factor a tener en cuenta, y determinará el rango de intensidad de luz obtenida y la

posibilidad, o no, de que los cambios que se pretenden registrar sean medibles.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Equipamiento

Durante el desarrollo del trabajo se utilizó el instrumental típico de laboratorio, tubos de plástico contenedores, guantes de latex, micropipetas automáticas de volumen variable Boeco de diversas capacidades máximas (1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , y 50  $\mu\text{L}$ ), portaobjetos de vidrio comunes (B&C Germany de 75x25 mm<sup>2</sup>), baños térmicos, etc. Una computadora provista de hardware y software específico se utilizó para el control y ejecución de los procesos de medición.

Para la observación y obtención de imágenes digitales de los GR y de los agregados se utilizó un Microscopio Óptico Invertido (Union Optical Tokyo), un Microscopio Óptico Leica con contraste de fase, a los cuales se les acopló una Cámara Fotográfica Digital (Canon PowerShot A640) con un adaptador de 52 mm, y un Microscopio Óptico Biológico Boeco (BM-117) con cámara Arcano de 5.0 Mp incorporada.

La medición de la transmisión de luz a través de las muestras de sangre se realizó en las primeras etapas, mediante un Elipsómetro marca Rudolph Series 434 con láser diodo. Posteriormente, luego de varios ensayos se desarrolló un sistema con iluminación LED, y finalmente un agregómetro portátil de completo diseño propio de hardware y software. Los elementos que componen el sistema experimental se detallan en la sección siguiente.

### 4.2.2 Sistema experimental

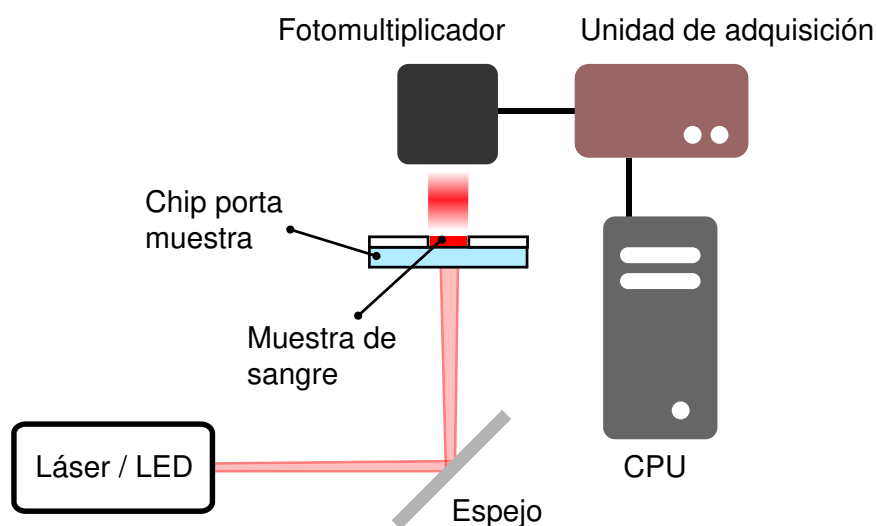
Como se ha mencionado en la sección 3.1, los resultados se condicionan por la obtención de un silectograma adecuado para el posterior análisis, con lo que se incursionó

en el montaje de un sistema apto para dicho fin.

El sistema experimental puede organizarse en tres bloques de elementos:

- El chip óptico, portador de la muestra de sangre a analizar.
- El sistema de emisión y captación de luz (Elipsómetro, LED, fotosensor).
- El bloque de control y registro de la información del proceso (unidad de adquisición Photomultiplier Photometer Model 1118A11 y computadora, Raspberry Pi).

La Figura 4.1 muestra un esquema del sistema experimental para la medición.



**Figura 4.1:** Esquema del sistema de medición por transmisión de luz.

### 4.2.3 Chip óptico

El chip óptico es el soporte físico para la muestra de sangre. Tiene la función de disponer de la manera óptima la muestra, para que se produzca el fenómeno de agregación sin alteraciones introducidas por factores externos, y pueda registrarse correctamente la intensidad de luz que atraviesa la misma. A modo de reducir los efectos

de sedimentación de los GR, se trabajó en un plano horizontal nivelado en superficies perpendiculares al eje vertical del sistema.

El diseño del chip óptico contó con varias etapas (ver Apéndice C) hasta llegar a la versión final que se muestra en la Figura 4.2.



**Figura 4.2:** Esquema del diseño final del chip óptico consistente en una unidad de prueba individual descartable.

#### 4.2.4 Descripción y metodología

Se valió de la disposición física de un elipsómetro (Rudolph Series 434) y su capacidad para medir intensidad de luz transmitida a través de la muestra en el tiempo. Este aparato consta de dos brazos coplanares regulables en ángulo, unidos por un disco graduado. Uno de los brazos tiene adosado un láser de diodo de 630 nm y el otro un fotomultiplicador capaz de registrar variaciones en la intensidad lumínica que incide sobre él. Dicho fotomultiplicador se encuentra en comunicación con la unidad de control del elipsómetro, que regula la escala en la medición y los voltajes intervinientes. Las intensidades de luz son dadas en unidades arbitrarias referenciadas por el voltaje que circula en el sistema. Los brazos fueron colocados de tal forma que el ángulo entre ellos fuera de  $90^\circ$ . Así, se colocó el chip contenedor de la muestra de manera horizontal atravesando el camino del haz de luz que, mediante un espejo adicionado, seguía una

trayectoria perpendicular al plano del chip e impactaba en el fotomultiplicador. Las características adicionales se detallan en el Apéndice C.

A medida que se realizaron estudios con el sistema descrito anteriormente, fueron introduciéndose modificaciones. Una de ellas implicó el reemplazo del diodo láser por un LED en el espectro rojo de mucho más bajo costo, puesto que no es requerida alta coherencia de la fuente de luz en esta técnica. Además, como se comentó en la sección 4.2.3 el chip fue rediseñado y optimizado. Las mediciones de la segunda etapa tienen una duración de alrededor de 5 minutos, que es la duración del proceso de agregación eritrocitaria, logrando menos ruido en la señal experimental debido a una mejor y más uniforme iluminación de la muestra.

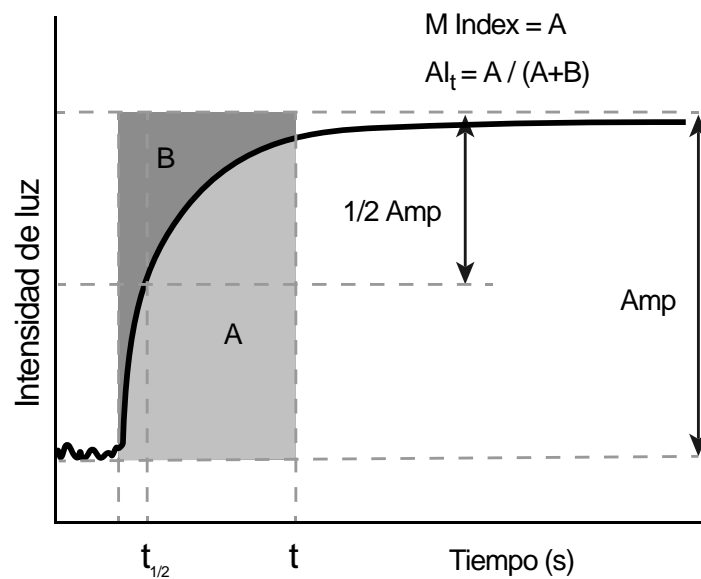
## 4.3 Parámetros de agregación

### 4.3.1 Parámetros de agregación a partir del silectograma

Para estudiar la dinámica eritrocitaria a través de los datos empíricos, se propusieron parámetros característicos como descriptores matemáticos de la curva de intensidad de luz en función del tiempo. A la evolución temporal de la intensidad de luz,  $I(t)$  se la ajustó mediante la función

$$I(t) = I_f \cdot e^{-t/T_f} + I_s \cdot e^{-t/T_s} + I_0, \quad (4.1)$$

donde  $T_f$  y  $T_s$  denotan constantes temporales del proceso de agregación. Éste puede considerarse como un conjunto de eventos múltiples, dobletes, rouleaux, y formaciones tridimensionales, que ocurren en minutos. Las constantes temporales  $T_f$  y  $T_s$  representan la rápida formación de rouleaux y la agregación tridimensional lenta, respectivamente. A tiempo  $t = 0$ , se puede obtener la intensidad mínima,  $I_{(t=0)} = I_{min}$ , la cual, luego de normalizar, será cero.



**Figura 4.3:** Representación de los parámetros de agregación en el silectograma.

Los parámetros de agregación que se muestran en la Figura 4.3, son los siguientes:

- Amplitud (Amp): La diferencia entre  $I_{min}$  y la intensidad de luz en un tiempo  $t_i$  determinado.
- Tiempo mitad ( $t_{1/2}$ ): El tiempo requerido para alcanzar la intensidad de luz  $I_{min} + Amp/2$ , indicando la constante temporal característica para alcanzar el nivel medio de agregación en  $t_i$ .
- M-index: El área debajo del silectograma en un período de tiempo  $t_i$ , indicando el grado de acumulación de agregados durante ese tiempo.
- Índice de Agregación (AI): El cociente entre el área bajo el silectograma (A) y el área total (A+B) en cierto período de tiempo  $t_i$ , indicando la cantidad de agregación normalizada acumulada.

Los tiempos  $t_i$  elegidos para el cálculo de los parámetros de agregación fueron optimizándose de acuerdo a los experimentos realizados.

### 4.3.2 Parámetros de Kaliviotis y Yianneskis

Kaliviotis y Yianneskis en 2011 propusieron que la formación de agregados se comporta de manera similar al fenómeno de sedimentación [Kaliviotis y Yianneskis, 2011]. En este modelo, se asume una competencia de dos fenómenos, la agregación y la desagregación espontánea, siendo esta última proporcional al número total de glóbulos rojos. Partiendo de la ecuación de Smoluchowski [Kaliviotis y Yianneskis, 2011] se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{2}AN^2 + \frac{1}{2}DN_0, \quad (4.2)$$

donde  $A$  es la tasa de agregación,  $D$  es la tasa de desagregación,  $N(t) = \sum_i^{\infty} n_i(t)$  es el número total de agregados ( $n_i(t)$  es la cantidad de agregados formados por  $i$  GR) y  $N_0 = \sum_{i=2}^{\infty} in_i(t)$  es el número total de GR, el cual se supone que permanece constante. Integrando la ecuación 4.2 con condiciones iniciales nulas (es decir se parte de la base que todos los GR están desagregados) resulta:

$$N(t) = N_0 \sqrt{\frac{D}{A}} \tanh(N_0 \sqrt{ADt}), \quad (4.3)$$

dando una expresión para el número total de agregados en función del tiempo.

## 4.4 Alteración *in vitro* de los factores de interacción eritrocitaria

Para evaluar la sensibilidad de la técnica, se diseñaron experiencias que permitieran obtener perfiles de dinámica eritrocitaria asociados a los resultados de los experimentos. Para ello se estudiaron distintas condiciones de los GR y su medio de suspensión induciendo alteraciones controladas en las muestras a estudiar. Es importante notar

que luego de obtener la alteración *in vitro* de la célula o del medio, se realizó la correspondiente resuspensión de los glóbulos rojos al hematocrito deseado para cada experimento.

### **Alteración de la carga eléctrica superficial del eritrocito**

El estudio de la incidencia de la carga eléctrica superficial de los GR en la agregación eritrocitaria, fue modelizado a través de la digestión del glicocalix con soluciones de tripsina de diferentes concentraciones (ver Apéndice A). Obteniendo muestras de GR *glicados* con tripsina en concentraciones de 1, 2 y 2,5 mg/mL [del Balzo, 2010].

El fundamento de esta reducción *in vitro* de la carga superficial eléctrica se basa en que la tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos (pH óptimo de 7,5 y una temperatura óptima de 37°C). De esta manera, las terminales de ácido siálico son “clivadas”, y la carga eléctrica negativa reducida con lo cual se reduce la repulsión electrostática entre las células.

### **Reducción de la proteína plasmática fibrinógeno**

Como se explicó en la sección 1.2, la proteína plasmática que interviene fundamentalmente en la agregación eritrocitaria es el fibrinógeno. Para evaluar en forma controlada este factor, se realizaron estudios de alteraciones del plasma reduciendo la concentración de fibrinógeno. Para esto se preparó una solución de SF y albúmina humana al 2% (SFA) según el protocolo del Apéndice A. Se utilizaron diluciones de 75%, 50%, 25% y 0% de plasma con dicha solución además del control (100% plasma) para alterar de manera controlada el contenido de proteínas plasmáticas (fibrinógeno) en el medio de suspensión.

## Agentes anestésicos

Se ha observado que las técnicas anestésicas afectan los parámetros hemorreológicos, hemostáticos, y hemodinámicos del paciente durante una cirugía [Beilin et al., 2006; Caglayan et al., 2006]. Además, estas drogas afectan la velocidad de sedimentación eritrocitaria, y la anestesia general puede conducir a una disminución en el balance electrolítico de los GR, afectando la unión de ligandos a la membrana y modificando su morfología [Alet et al., 2015; Caglayan et al., 2006]. El *Propofol* por ejemplo, presenta efectos cardiovasculares secundarios tales como disminución de la resistencia vascular periférica, disminución de la saturación de oxígeno venoso yugular e inducción de hemólisis. Para estudiar la influencia de estos compuestos, se trataron las muestras en 3 condiciones diferentes (*Propofol* 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sangre entera, *Remifentanilo* 10  $\text{ng}/\text{mL}$  plasma y *Bromuro de Vecuronio* 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasma). La preparación se detalla en el Apéndice A.

## Larvas de *Trichinella spiralis*

La triquinosis es una zoonosis producida por el parásito *Trichinella*, siendo la especie *spiralis* la de mayor prevalencia a nivel mundial. El complejo ciclo evolutivo de *Trichinella spiralis* (Ts) incluye la migración de las larvas recién nacidas (LRN) por el torrente circulatorio hasta su enquistamiento en las fibras musculares. Durante este pasaje por la circulación sanguínea, las larvas del parásito establecen un íntimo contacto con los eritrocitos del hospedador. Diversos estudios han demostrado que Ts puede captar ácido siálico de las células con las que tiene íntimo contacto, produciendo una alteración de la agregación eritrocitaria [López Murúa et al., 2015].

Para estudiar el efecto de esta zoonosis, se prepararon suspensiones de GR de 4 donantes sanos distintos, previa separación del plasma, que fueron incubados en partes iguales con concentrados de LRN de  $(3000 \pm 500)$  larvas/ $\text{mL}$ , durante 1 y 2 horas con

agitación controlada a 37°C (ver Apéndice A). Se utilizó como muestra control GR incubados en igual volumen de SF. Finalizada la incubación, los eritrocitos fueron lavados y suspendidos en plasma autólogo.

## **Glicosilación no enzimática de GR**

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de un defecto en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos mecanismos. La hiperglucemia crónica se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [American-Diabetes-Association, 2014]. Gran cantidad de estudios han demostrado que pueden producirse alteraciones en el perfil hemorreológico durante la evolución de la diabetes, afectando la agregación de eritrocitos, por ejemplo, aumento de la agregación y formación de clusters, aumento del contenido de fibrinógeno, incremento de la viscosidad sanguínea y plasmática, y cambios en la deformabilidad y la viscoelasticidad de los eritrocitos [Carrera et al., 2008; Delannoy et al., 2015].

El fenómeno principalmente involucrado en la diabetes es la glicosilación no enzimática, la cual se define químicamente como la reacción de grupos amina primaria, péptidos y proteínas con el grupo carbonilo de los azúcares reductores. La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el cuerpo, su concentración en la sangre está sujeta a un mecanismo de regulación en personas sanas y aumenta sustancialmente en personas con diabetes. En condiciones fisiológicas, la aparición de estos compuestos está determinada por la concentración de azúcares reductores y por el tiempo de exposición de la proteína a ellos [Horvat y Jakas, 2004].

Para evaluar con las técnicas desarrolladas el efecto de la glicosilación no enzimática *in vitro* de la membrana eritrocitaria [Riquelme et al., 2005], las muestras de sangre se dividieron en 5 tubos que contenían volúmenes iguales de GR y soluciones de glucosa preparadas en PBS de diferente concentración (0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 g/dL). La mues-

tra control se preparó incubando volúmenes iguales del paquete celular y la solución de glucosa-PBS. Luego de la incubación, los RBC se lavaron 3 veces con PBS y se suspendieron a un hematocrito del 40 %.

## **4.5 Resultados**

Como primera instancia se incursionó en la construcción de un chip óptico que cumpliera las necesidades experimentales. Se tuvieron en cuenta factores como el costo y la disponibilidad de materiales, pues debía ser un elemento descartable y de fácil utilización. Estas pruebas fueron realizadas en muestras con diversos hematocritos, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % y 50 % de GR en plasma autólogo a fin de conocer los rangos de intensidad de luz con los que se trabajaría, y habituarse al sistema de medición y los procedimientos.

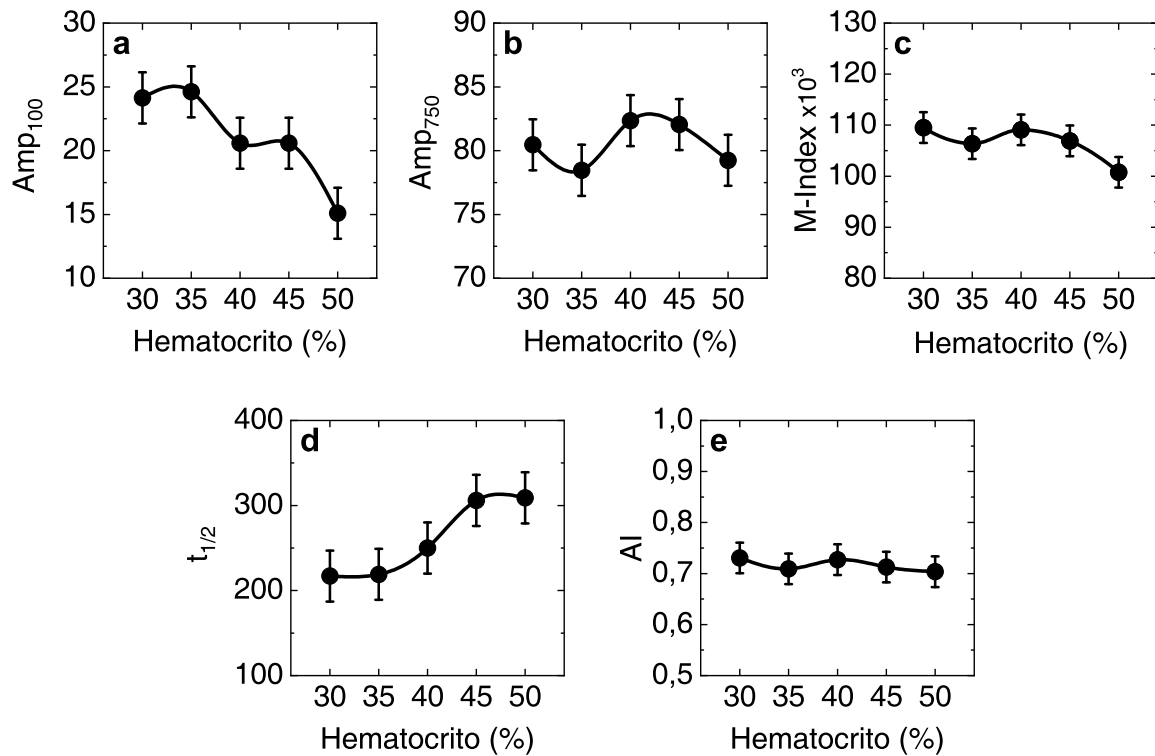
En el Apéndice C se explican los ensayos preliminares en los que se probaron configuraciones del sistema experimental y se estudiaron diversos factores responsables en la eficacia de las mediciones y la optimización del volumen de muestra a un hematocrito del 40 %. Se realizaron pruebas para determinar la variación de los silectogramas para distintos volúmenes de sangre y la reproducibilidad de los experimentos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los experimentos realizados para la evaluación del fenómeno de agregación eritrocitaria y determinación de índices representativos de características específicas de la sangre, de acuerdo a las alteraciones de la sección 4.4.

### **4.5.1 Dependencia de los parámetros de agregación respecto al hematocrito**

Se realizaron estudios variando el hematocrito en el rango fisiológico (entre 30 % y 50 %) a partir de muestras de sangre normal. De esta manera se observó cuales

parámetros son más sensibles al número de células presentes en la cámara de prueba. La Figura 4.4 muestra como  $Amp_{100}$  disminuye y  $t_{1/2}$  aumenta con incrementos del hematocrito, sin embargo  $Amp_{750}$ , M-Index y AI no muestran variaciones significativas en el rango de concentración de GR analizado.



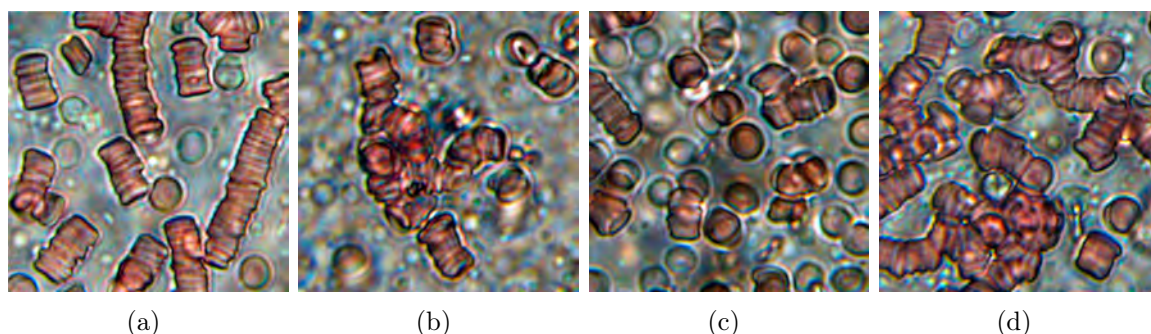
**Figura 4.4:** Índices de agregación en función del hematocrito para una muestra de sangre normal.  $Amp_{100}$  (a),  $Amp_{750}$  (b), M-Index (c),  $t_{1/2}$  (d), AI (e).

#### 4.5.2 Alteración *in vitro* de la carga eléctrica superficial eritrocitaria

Mediante el tratamiento con tripsina se alteró la carga superficial de la membrana eritrocitaria, responsable de la repulsión electrostática entre GR, como se explicó en la sección 4.4. La reducción de la carga superficial del glóbulo rojo origina en la sangre un aumento en la intensidad de luz transmitida, relacionada con una agregación mayor de GR.

Para estos estudios se realizaron 8 mediciones con cada muestra (control, tripsina

1 mg/mL, 2 mg/mL y 2,5 mg/mL) dentro de las 48 h de extraída la sangre y realizados los tratamientos. La Figura 4.5 muestra imágenes de GR agregados luego de ser tratados con tripsina, donde se observan estructuras más desordenadas similares a “clusters” a medida que se incrementa la concentración de la enzima en la incubación. Los silectogramas fueron analizados y procesados, calculando los parámetros de agregación en cada caso. Luego se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los índices para cada tipo de muestra según se muestra en la Tabla 4.1.



**Figura 4.5:** Fotografías de agregados de GR control (a) y tratados con tripsina 1mg/mL (b), 2 mg/mL (c) y 2,5 mg/mL (d). Microscopio óptico con objetivo 40x, hematocrito 1,5 %.

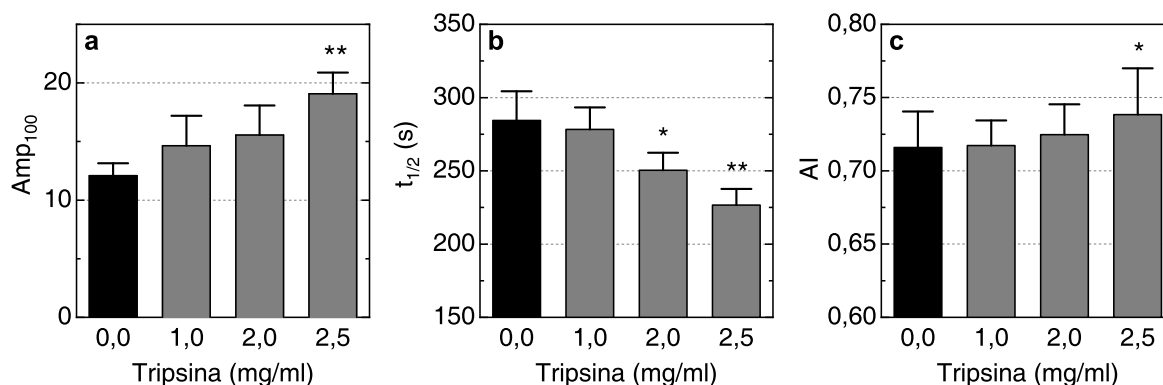
En la Figura 4.6 se muestran de manera gráfica los parámetros de la Tabla 4.1 que mostraron variaciones más significativas. Aquí puede notarse que la amplitud al inicio del fenómeno es mayor a medida que se incrementa la concentración de tripsina en la incubación y por lo tanto, puede asociarse a la disminución de la carga superficial del eritrocito.

De estos experimentos, se observa que las diferencias más notables comienzan a manifestarse para la concentración más alta de tripsina, es decir 2,5 mg/mL. En este caso, el proceso de agregación se produce más rápidamente obteniéndose una agregación mayor en los primeros minutos y un tiempo mitad más reducido. Por otro lado, la cantidad total de agregación no presenta variaciones significativas. Es importante destacar, que el efecto producido por la tripsina es condicionado por su tiempo de incubación, en este caso 20 minutos.

**Tabla 4.1:** Índices de agregación calculados de 8 mediciones realizadas para cada muestra de GR control, tratados con tripsina 1 mg/mL, 2 mg/mL y 2,5 mg/mL. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD.

Muestras	Amp <sub>100</sub>	Amp <sub>750</sub>	t <sub>1/2</sub> (s)	AI 1500 s	M-Index 1500 s
Control	12,1 $\pm$ 1,1	85,0 $\pm$ 4,1	284 $\pm$ 31	0,716 $\pm$ 0,025	107400 $\pm$ 3600
Tr. 1 mg/mL	14,6 $\pm$ 2,5	83,0 $\pm$ 2,7	278 $\pm$ 28	0,717 $\pm$ 0,017	107600 $\pm$ 2500
Tr. 2 mg/mL	15,5 $\pm$ 2,5	84,7 $\pm$ 2,2	250 $\pm$ 15*	0,725 $\pm$ 0,021	108700 $\pm$ 3000
Tr. 2,5 mg/mL	19,0 $\pm$ 1,8**	86,6 $\pm$ 2,4	226 $\pm$ 18**	0,738 $\pm$ 0,032*	110800 $\pm$ 4700

\* p < 0,05; \*\* p < 0,001.



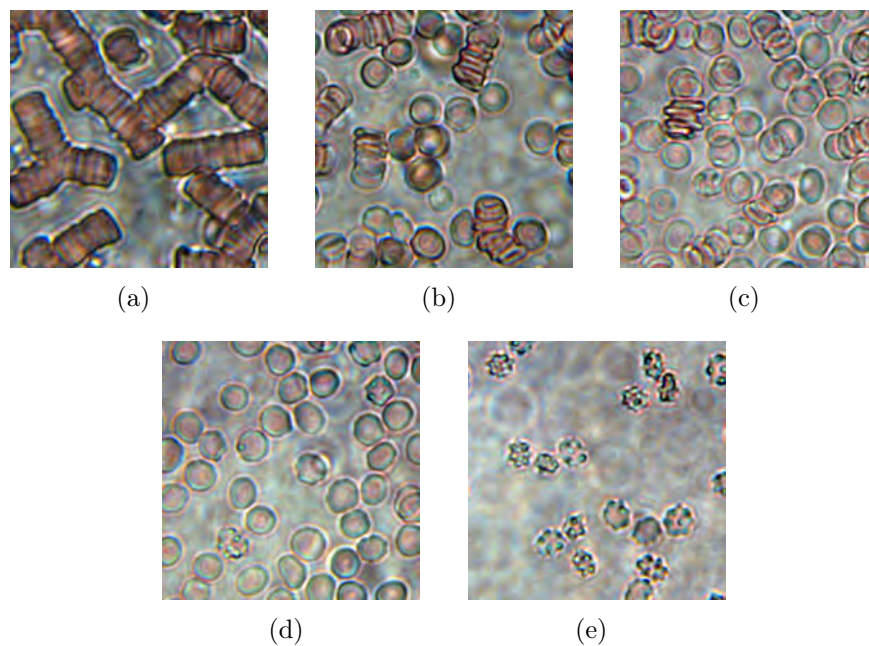
**Figura 4.6:** Índices Amp en 100 s (a), t<sub>1/2</sub> (b) y AI 1500 s (c) para cuatro muestras: Control, tratados con tripsina 1 mg/mL, 2 mg/mL y 2,5 mg/mL. \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

### 4.5.3 Alteración *in vitro* del contenido de proteínas plasmáticas en el medio

En este caso se modificaron las características del medio de suspensión, diluyendo el plasma en SFA. En las fotos de la Figura 4.7 se observa como a medida que se diluye más el plasma se obtiene menor cantidad de agregados y más pequeños. En las muestras con 0 % de plasma se observan GR crenados conocidos como equinocitos (con espículas), perdiendo la capacidad de agregación. Al igual que en el caso con tripsina, se calcularon los índices característicos para 8 mediciones con cada muestra (Tabla 4.2).

La dilución del plasma con SFA tiene un efecto de disminución en la agregación.

Esto se debe a la menor concentración de las proteínas plasmáticas, principalmente del fibrinógeno. En consecuencia, el tiempo mitad de agregación crece a medida que aumenta la dilución del plasma como se ve en la Figura 4.8 y el AI, que representa el grado de agregación acumulada, disminuye presentando valores inferiores al control.



**Figura 4.7:** Fotografías de agregados de GR en plasma diluido con SFA. Control 100 % plasma (a) 75 % plasma (b), 50 % plasma (c), 25 % plasma (d), 0 % plasma (e). Microscopio óptico con objetivo 40x, hematocrito 1,5 %.

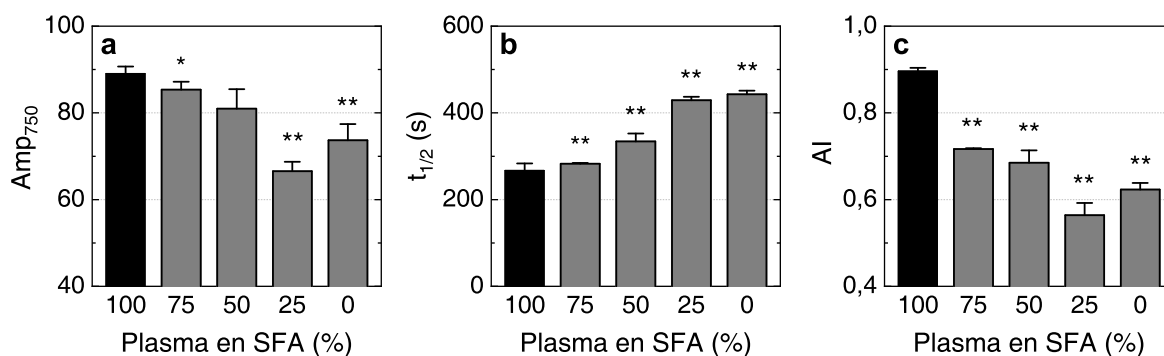
#### 4.5.4 Aplicación del modelo de Kaliviotis y Yanneskis

Para aplicar el modelo de Kaliviotis y Yanneskis se utilizó la ecuación 4.3 de la sección 4.3.2. Realizando un ajuste no lineal mediante la rutina *curve\_fit* del paquete Python SciPy, se obtuvieron los valores de  $A$  y  $D$  a partir de las mediciones presentadas en las dos secciones anteriores (ver Tabla 4.3). Se puede observar que ambos índices son mayores que el control para el caso en que la carga eléctrica superficial fue reducida (tripsina), y menores para un contenido de proteínas plasmáticas disminuida (plasma diluido).

**Tabla 4.2:** Índices de agregación calculados de 8 mediciones realizadas para cada muestra: control, plasma con SFA al 75 %, 50 %, 25 % y 0 %. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD.

Muestras	Amp <sub>100</sub>	Amp <sub>750</sub>	t <sub>1/2</sub> (s)	AI 1500 s	M-Index 1500 s
Pl. 100 %	12,8 $\pm$ 0,8	89,0 $\pm$ 1,6	267 $\pm$ 16	0,90 $\pm$ 0,01	115500 $\pm$ 1100
Pl. 75 %	11,3 $\pm$ 5,4	85,3 $\pm$ 1,8*	283 $\pm$ 2**	0,72 $\pm$ 0,01**	107500 $\pm$ 300**
Pl. 50 %	13,2 $\pm$ 1,4	80,9 $\pm$ 4,5	334 $\pm$ 18**	0,68 $\pm$ 0,03**	104000 $\pm$ 2600**
Pl. 25 %	8,6 $\pm$ 0,2**	66,5 $\pm$ 2,2**	429 $\pm$ 8**	0,56 $\pm$ 0,03**	84600 $\pm$ 4200**
Pl. 0 %	7,6 $\pm$ 1,1**	73,7 $\pm$ 3,7**	443 $\pm$ 8**	0,62 $\pm$ 0,02**	93500 $\pm$ 2200**

\* p < 0,05; \*\* p < 0,001.



**Figura 4.8:** Índices de agregación eritrocitaria para cinco muestras de GR en medios con distinto contenido de proteínas plasmáticas: control, 75 % plasma, 50 % plasma, 25 % plasma, y 0 % plasma en SFA. Los gráficos corresponden a los índices Amp en 750 s (a), t<sub>1/2</sub> (b) y AI (c). \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

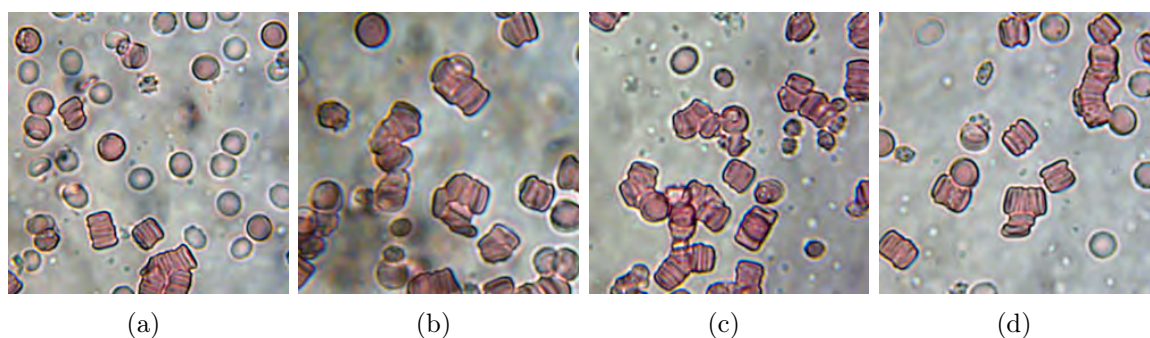
Estos resultados son congruentes con los parámetros calculados en las secciones anteriores, advirtiendo un grado de agregación mayor que en la sangre no alterada para el caso glicado, y por debajo para el caso en que se redujo el fibrinógeno presente en el plasma. Sin embargo, los resultados no son significativos (p > 0,05).

#### 4.5.5 Acción de agentes anestésicos

En la Figura 4.9 se muestran algunas fotografías de GR incubados con los distintos agentes anestésicos. En estas imágenes no se observan a simple vista alteraciones en la agregación eritrocitaria. Para los estudios de agregación con el agregómetro de chip se realizaron 5 mediciones con cada tipo de muestra.

**Tabla 4.3:** Se muestran los valores de A y D con sus respectivas incertezas, calculados por medio de ajuste computacional para las muestras: control, GR alterados con tripsina (2 mg/mL), y contenido de proteínas plasmáticas reducido.

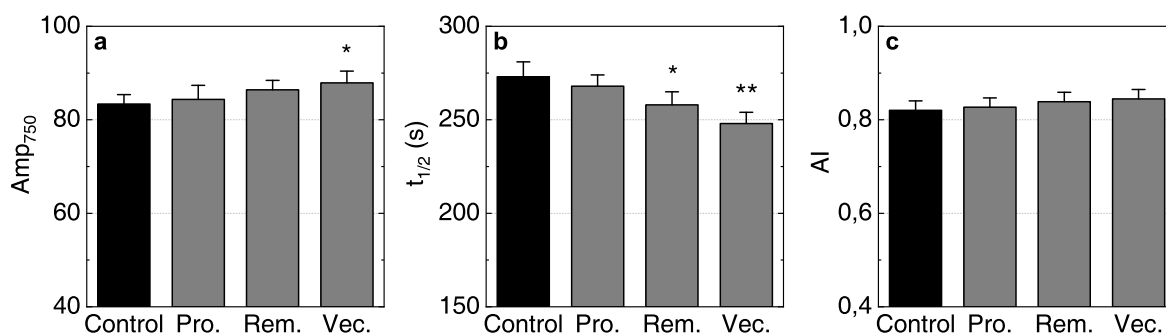
Muestra	Índice de agregación (A)	Índice de desagregación (D)
Control	$0,0022 \pm 0,0006$	$0,0019 \pm 0,0005$
Tripsina (2,5 mg/mL)	$0,0026 \pm 0,0006$	$0,0023 \pm 0,0005$
Plasma 75 %	$0,0022 \pm 0,0006$	$0,0021 \pm 0,0005$
Plasma 50 %	$0,0021 \pm 0,0006$	$0,0019 \pm 0,0005$
Plasma 25 %	$0,0013 \pm 0,0006$	$0,0013 \pm 0,0005$
Plasma 0 %	$0,0015 \pm 0,0006$	$0,0014 \pm 0,0005$



**Figura 4.9:** Fotografías de agregados de GR en plasma con agentes anestésicos. Control (a); *Propofol* 4 mg/mL (b); *Remifentanilo* 10 ng/mL (c); *Bromuro de Vecuronio* 0,15 mg/mL (d). Microscopio óptico con objetivo 40x, hematocrito 0,5 %.

En la Figura 4.10 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros de agregación, donde es posible observar leves alteraciones en relación a la muestra control.

En estas experiencias se observó que los índices que resultaron ser más sensibles a las alteraciones son  $Amp_{750}$  y  $t_{1/2}$  implicando cinéticas de agregación más rápidas para el caso de muestras alteradas. En particular el *Bromuro de Vecuronio* tiene el tiempo mitad menor e índices de agregación más altos, lo que implica una cinética más rápida y más agregación acumulada, el *Remifentanilo* sigue la tendencia del *Bromuro de Vecuronio*, pero con menor intensidad, y el *Propofol* no produce alteraciones significativas.



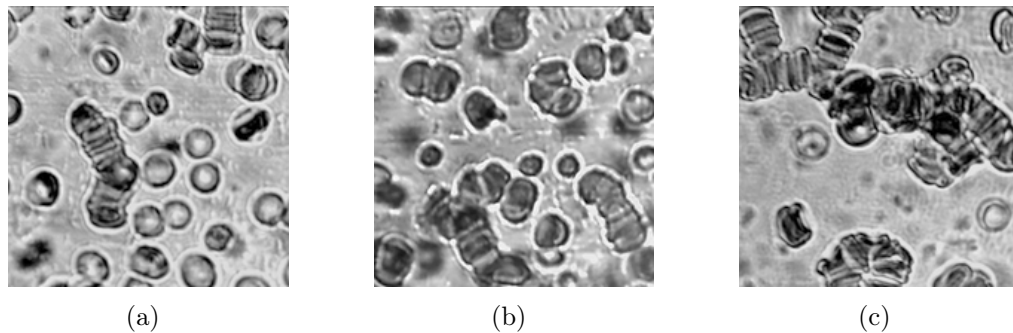
**Figura 4.10:** Índices de agregación eritrocitaria para cuatro muestras de GR en medios con distintos agentes anestésicos. Amp en 750 s (a),  $t_{1/2}$  (b), AI (c). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.5.6 Alteraciones por larvas de *Trichinella spiralis*

En las imágenes microscópicas de la Figura 4.11, puede notarse una mayor presencia de *rouleaux* a medida que aumenta el tiempo de contacto de las LRN con los GR. Mediante el análisis de las imágenes digitales, se obtuvo la distribución del tamaño de agregados según la cantidad de GR que los componen.

Los eritrocitos incubados con LRN presentaron una disminución en el porcentaje de células aisladas y un mayor tamaño de los agregados formados en relación con los controles, como se ve en la Figura 4.12. El análisis estadístico indica que la agregación de los glóbulos rojos alterados fue mayor al aumentar el tiempo de incubación. Esto posiblemente esté relacionado con la pérdida de ácido siálico en la superficie, ya que es capturado por las LRN.

La Tabla 4.4 muestra los valores de los parámetros de agregación para estas alteraciones. Los experimentos indican que Amp<sub>750</sub> aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) con el tiempo de incubación, lo que se asocia con la presencia de agregados más grandes y globulares. Además,  $t_{1/2}$  disminuyó ( $p < 0,001$ ) como se muestra en la Figura 4.13, lo que indica una cinética de agregación más rápida, probablemente relacionada con una alteración en la carga eléctrica de la superficie producida por la acción de las LRN. Un mayor tiempo de incubación está estrechamente relacionado con una reduc-



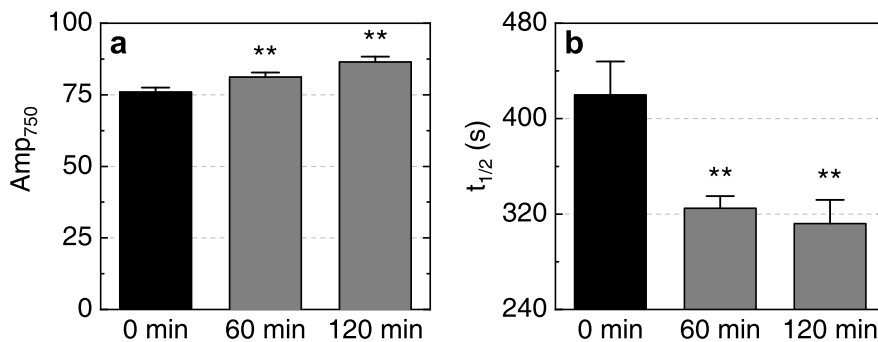
**Figura 4.11:** Fotografías de agregados de GR incubados con LRN de *Trichinella spiralis* en plasma durante: 0 min de incubación (a), 60 min (b) y 120 min (c). Microscopio óptico con objetivo 40x, hematocrito 0,3 %.

ción en la carga eléctrica de la superficie de los glóbulos rojos y, en consecuencia, con alteraciones en el proceso de agregación eritrocitaria produciendo agregados anómalos.

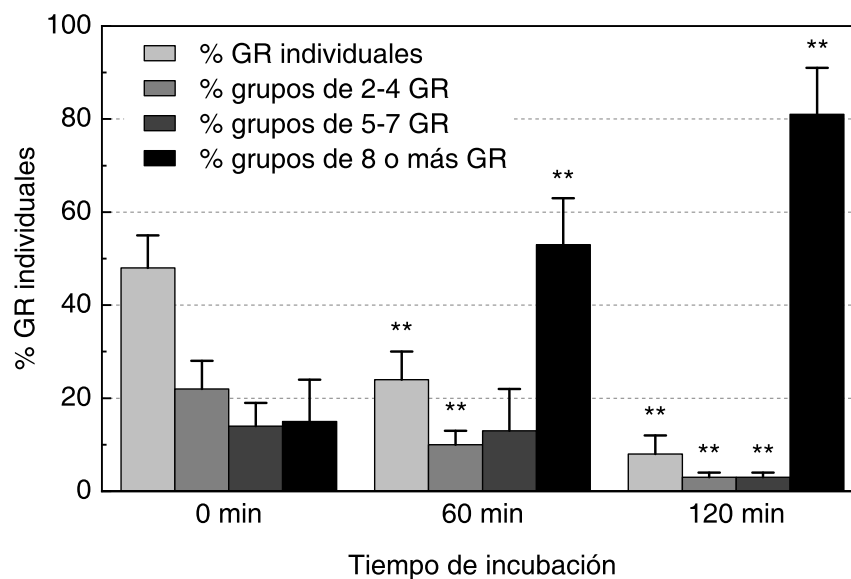
**Tabla 4.4:** Índices de agregación para GR incubados con LRN de *Trichinella spiralis* por 0 min, 60 min y 120 min.

Tiempo de incubación	Amp <sub>750</sub>			t <sub>1/2</sub> (s)		
	0 min	60 min	120 min	0 min	60 min	120 min
<b>Muestra 1</b>	69,4 ± 0,9	78,1 ± 1,6**	78,5 ± 1,5**	500 ± 30	425 ± 20**	350 ± 30**
<b>Muestra 2</b>	75,9 ± 1,6	81,2 ± 1,6**	86,5 ± 1,8**	420 ± 28	325 ± 10**	312 ± 20**
<b>Muestra 3</b>	80,6 ± 0,3	83,8 ± 1,4*	86,0 ± 0,4*	350 ± 10	270 ± 10**	220 ± 10**
<b>Muestra 4</b>	74,3 ± 0,9	80,5 ± 0,8**	82,2 ± 1,8**	380 ± 28	337 ± 10**	310 ± 14**

\* p < 0,05; \*\* p < 0,001.



**Figura 4.13:** Índices de agregación eritrocitaria para GR alterados mediante LRN de *Trichinella spiralis* correspondientes a la muestra 2. Amp en 750 s (a), t<sub>1/2</sub> (b). \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

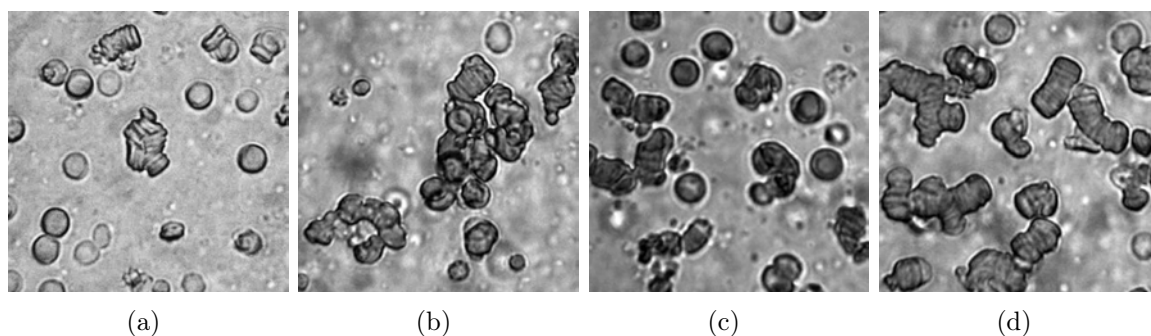


**Figura 4.12:** Valores medios de la distribución de tamaño de agregados de GR alterados por LRN de *Trichinella spiralis* para 0 min, 60 min y 120 min de incubación. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.5.7 Alteración de la agregación de GR por glicosilación no enzimática

La Figura 4.14 muestra agregados de GR para diferentes medios de incubación con glucosa. Se observa claramente la alteración de la morfología de los agregados eritrocitarios en la Figura 4.14 (b) que corresponde a una concentración de incubación de glucosa de 0.5 g/dL. Este tipo de agregados “cluster” se asemejan a las estructuras típicas presentes en pacientes diabéticos.

Mediante el agregómetro de chip óptico se observó que los parámetros  $Amp_{100}$  y  $t_{1/2}$ , describen mejor las diferencias en el proceso de agregación de GR relacionadas a la glicosilación no enzimática como se ve en la Tabla 4.5.  $Amp_{100}$  muestra un incremento respecto al control y  $t_{1/2}$  disminuye hasta que la concentración 0,5 g/dL, indicando un aumento en la velocidad de agregación. Para concentraciones más altas se observa un comportamiento diferente, disminuye  $Amp_{100}$  y se incrementa  $t_{1/2}$ , indicando la formación más lenta de agregados.



**Figura 4.14:** Fotografías de agregados de GR glicosilados con distintas concentraciones de glucosa, 0.2 g/dL (a), 0.5 g/dL (b), 1 g/dL (c) 2 g/dL (d) suspendidos en plasma. Microscopio óptico con objetivo 40x, hematocrito 0,5 %.

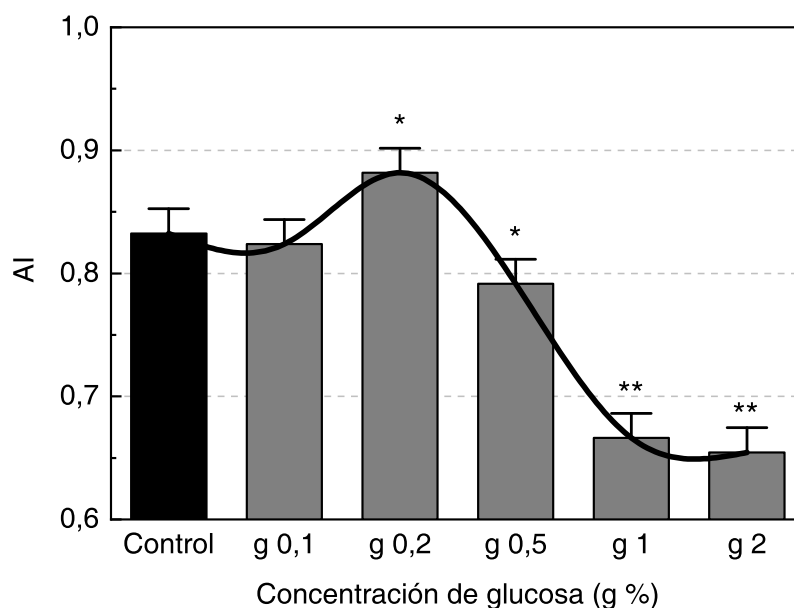
**Tabla 4.5:** Parámetros de agregación de GR glicosilados para las mediciones obtenidas por quintuplicado. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD.

Glucosa (g/dL)	Amp <sub>100</sub>	Amp <sub>600</sub>	t <sub>1/2</sub> (s)	AI <sub>1200</sub>
0	40,8 $\pm$ 0,5	94,4 $\pm$ 0,5	130 $\pm$ 1	0,84 $\pm$ 0,02
0,1	41,9 $\pm$ 0,5*	92,1 $\pm$ 0,5**	129 $\pm$ 1	0,82 $\pm$ 0,02
0,2	53,6 $\pm$ 0,5**	97,3 $\pm$ 0,5**	89 $\pm$ 1**	0,88 $\pm$ 0,02*
0,5	48,1 $\pm$ 0,5**	84,7 $\pm$ 0,5**	108 $\pm$ 1**	0,79 $\pm$ 0,02*
1	18,4 $\pm$ 0,5**	74,5 $\pm$ 0,5**	326 $\pm$ 1**	0,66 $\pm$ 0,02**
2	17,5 $\pm$ 0,5**	72,9 $\pm$ 0,5**	343 $\pm$ 1**	0,65 $\pm$ 0,02**

\* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

Los resultados indican que para la concentración de glucosa entre 0,2 g/dL y 0,5 g/dL se produce una formación más rápida de “clusters”. Es posible que por el efecto de mayores concentraciones de glucosa, la presencia de agregados globulares combinada con la sedimentación, enmascaran el proceso de formación de *rouleaux*. Esto daría lugar al conocido comportamiento de “campana” discutido en la sección 2.5, como se ve en la Figura 4.15. Se observa además que AI resulta menor para concentraciones de glucosa más altas, en concordancia con la presunción de mayor presencia de “clusters” de GR.

Para estas alteraciones de los GR, se complementó el estudio obteniendo parámetros de deformabilidad de las células mediante un Reómetro Eritrocitario previamente



**Figura 4.15:** Gráfico del Índice de Agregación (AI) para muestras de GR glicosilados. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

desarrollado en el laboratorio [Albea et al., 2013; Riquelme et al., 1998]. Este aparato mide la capacidad de los glóbulos rojos para cambiar su forma discoidal a elipsoidal cuando se somete a un esfuerzo cortante definido. Analizando las características geométricas del patrón de difracción generado por la muestras que están relacionadas con la deformabilidad de los eritrocitos, se obtienen los siguientes parámetros reológicos:

- ID: Índice de deformabilidad eritrocitaria
- $\mu$ : el módulo elástico de la membrana eritrocitaria, representa la elasticidad de la membrana que está relacionada fundamentalmente con la estructura del citoesqueleto.
- $\eta$ : la viscosidad superficial de la membrana de los eritrocitos, que representa una medida de la fluidez de la membrana y está relacionada con la bicapa lipídica.

A medida que aumenta el nivel de glucosa en el medio de incubación, se observó cómo el parámetro  $\mu$  disminuye hasta que se alcanza una concentración de 1 g%.

Los parámetros ID y  $\eta$  no evidenciaron variaciones significativas con respecto a la muestra de control como se muestra en la Tabla 4.6. Estos experimentos indican que la glicosilación no enzimática influye principalmente en la elasticidad de la membrana, así como también en la capacidad estructural del citoesqueleto de la célula. Relacionando de esta manera estados de mayor agregación de GR, con eritrocitos más elásticos y más fácilmente deformables.

**Tabla 4.6:** Parámetros viscoelásticos de GR glicosados, Las mediciones se realizaron por quintuplicado y se presentan como media  $\pm$  SD.

Glucosa (g/dL)	ID	$\mu$ ( $10^{-6}$ N/m)	$\eta$ ( $10^{-7}$ Ns/m)
0	0,64 $\pm$ 0,04	7,81 $\pm$ 0,02	2,1 $\pm$ 0,6
0,1	0,72 $\pm$ 0,05	7,77 $\pm$ 0,02*	1,8 $\pm$ 0,6
0,2	0,67 $\pm$ 0,03	7,57 $\pm$ 0,02**	1,8 $\pm$ 0,6
0,5	0,58 $\pm$ 0,06	7,40 $\pm$ 0,02**	2,6 $\pm$ 0,6
1	0,64 $\pm$ 0,07	7,40 $\pm$ 0,02**	1,6 $\pm$ 0,6
2	0,68 $\pm$ 0,05	7,48 $\pm$ 0,02**	2,1 $\pm$ 0,6

\* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

## 4.6 Agregómetro de chip óptico portátil

Las experiencias realizadas utilizando la técnica de transmisión de luz, permitieron la construcción de un prototipo de instrumental biomédico basado en los desarrollos experimentales. El agregómetro de chip óptico portátil permite evaluar de manera sistemática la cinética de agregación eritrocitaria mediante los parámetros previamente definidos que se calculan con software específico.

El dispositivo puede funcionar independientemente, debido a su pantalla táctil (7 pulgadas de diagonal) y software propio, y también en conexión con una PC para mayor flexibilidad y visualización en los análisis. De ambas formas, la funcionalidad es idéntica. Además, el elemento portante de la muestra (chip óptico) es descartable

permitiendo una sencilla operación y requiriendo una mínima capacitación para el uso del aparato. El prototipo es de dimensiones pequeñas (aproximadamente 20x20x20 cm), portátil y operable en cualquier mesada de trabajo de laboratorio, como se ve en la Figura 4.16.

En este prototipo se realizan mediciones de aproximadamente 5 min de duración, y en su diseño se incorporaron todas las características mejoradas expuestas en este Capítulo referentes a la técnica de transmisión de luz. Para una primera validación, se realizaron pruebas con muestras de GR de dadores sanos y se calcularon los parámetros de agregación de manera manual y por el software específico del aparato. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7, donde puede notarse que los parámetros presentan concordancia entre ambos métodos de cálculo. En la Figura 4.17 puede verse la interfaz de usuario diseñada para la pantalla táctil.

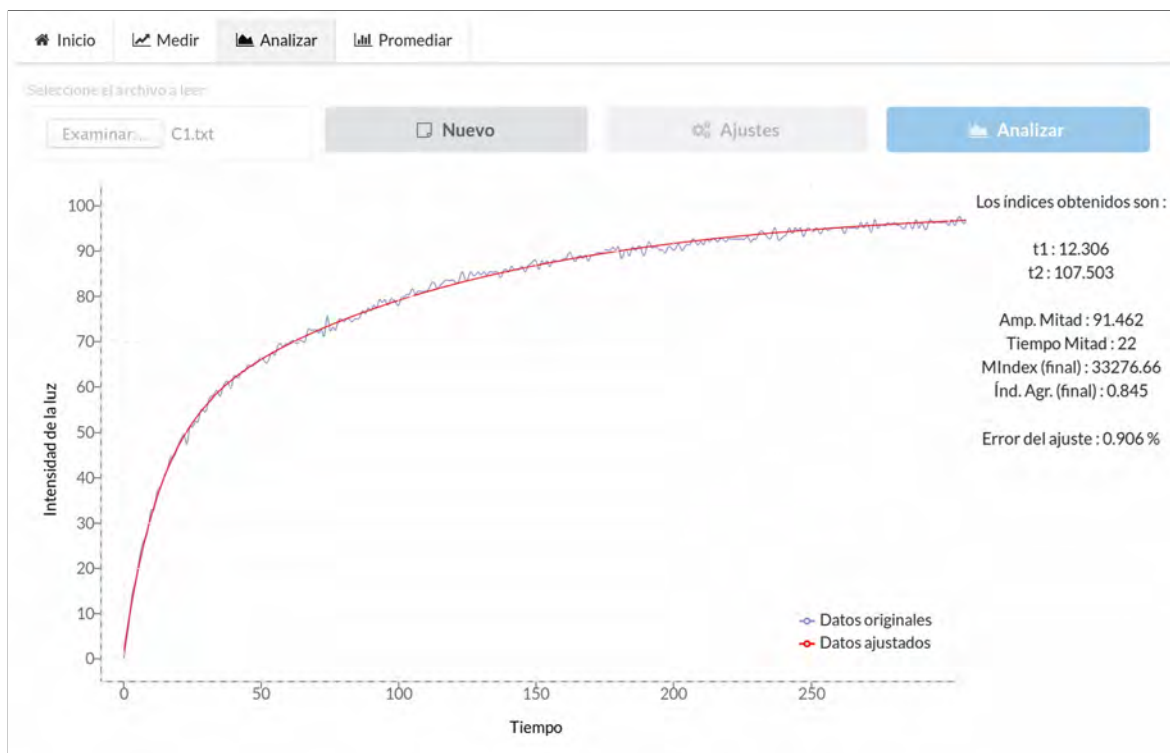
Las características mencionadas le confieren el potencial de devenir en un producto comercial, previa su protección intelectual, una vez definida su configuración final y superando la etapa de prototipo. La ejecución de este proyecto se dio en un ámbito de fuerte contenido multidisciplinario estrechando colaboraciones entre participantes de la FCByF y la FCEIA de la UNR (“Desarrollo de un prototipo de agregómetro eritrocitario de chip óptico portátil para aplicaciones biomédicas” en el marco de la 4<sup>o</sup> Convocatoria de Proyectos de Vinculación Tecnológica y Desarrollo Productivo "Vinculación Inclusiva" de UNR 2017).



Figura 4.16: Fotografías del prototipo de agregómetro de chip óptico portátil.

Tabla 4.7: Parámetros de agregación de GR calculados por software propio y genérico.

Índice / Muestra	Software propio			Cálculo manual por software genérico		
	$t_{1/2}$ (s)	AI	Incerteza	$t_{1/2}$ (s)	AI	Incerteza
c1	29	0,80	2,61 %	29	0,80	2,00 %
c2	24	0,83	1,19 %	25	0,82	2,00 %
c3	36	0,82	1,27 %	35	0,82	2,00 %
c4	31	0,84	0,93 %	31	0,84	2,00 %
c5	32	0,85	0,59 %	32	0,83	2,00 %
<b>Promedio</b>	<b>30 ± 4</b>	<b>0,83 ± 0,02</b>		<b>30 ± 4</b>	<b>0,83 ± 0,02</b>	



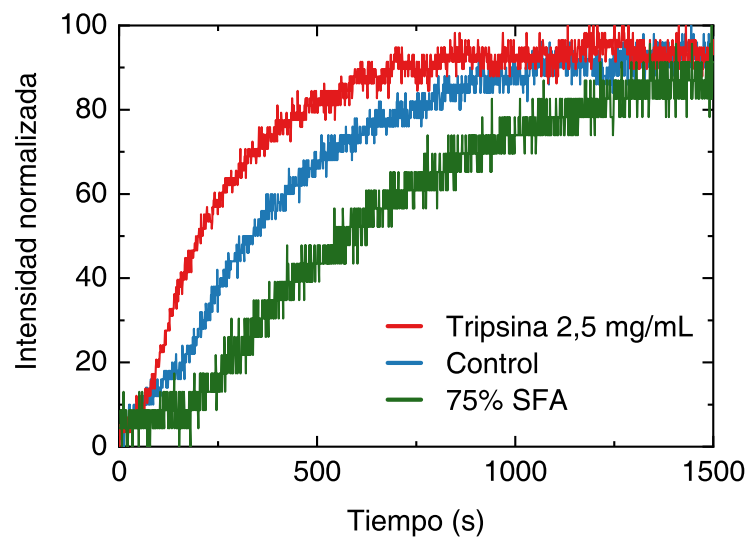
**Figura 4.17:** Interfaz gráfica del software para operar el agregómetro de chip óptico, donde se muestra el resultado de una medición.

## 4.7 Discusión

En las secciones anteriores se presentaron experimentos basados en la técnica de transmisión de luz y se calcularon los parámetros de agregación eritrocitaria para muestras de sangre de dadores sanos y alterada *in vitro*. Se desarrollaron protocolos de trabajo y se definieron directivas experimentales que llevaron al desarrollo particular de un método de estudio de la agregación eritrocitaria por técnicas ópticas. En particular, se diferenciaron dos situaciones: la alteración de las características del glóbulo rojo, mediante la utilización de tripsina, parásitos, agentes anestésicos y glucosa; y la alteración del medio en el cual se desarrolla la agregación, disminuyendo la concentración de proteínas plasmáticas por dilución del plasma con SFA.

En este sentido, pueden compararse los procesos registrados y ver su comportamien-

to respecto a una muestra control, como por ejemplo en la Figura 4.18. La disminución de la carga superficial, aumenta la tendencia de formar agregados globulares, y permite un incremento más acelerado en la transmisión de luz, presentando una curva por encima del control. La dilución del plasma en SFA por otro lado, tiene un efecto de retardo en la agregación, lo que da lugar a curvas menos pronunciadas y de crecimientos iniciales menores. Bajas concentraciones de proteínas plasmáticas, dan lugar a una prevalencia del fenómeno de sedimentación debido a una disminución de la agregación.



**Figura 4.18:** Silectograma de ensayos con tripsina, SFA y control.

Se han podido obtener descripciones de los estados particulares de adhesión de GR. La modelización *in vitro* de características relacionadas con la hipertensión y la diabetes fueron cuantificadas por medio de índices de agregación definidos. Los resultados indican que el parámetro  $t_{1/2}$  se ve influenciado por estos efectos, además del AI que resulta mayor respecto a los controles.

De acuerdo a lo estudiado, la acción de agentes anestésicos en la agregación eritrocitaria, particularmente *Propofol*, *Remifentanilo* y *Bromuro de Vecuronio*, no es fuertemente evidenciada por este método de estudio. Sin embargo, los parámetros de agregación mostraron pequeñas variaciones particularmente  $t_{1/2}$  en el caso del *Bromuro de Vecuronio*.

La incubación de GR con LRN de *Trichinella spiralis* alteró significativamente el proceso de agregación. Los resultados de este estudio aportaron información útil de aplicación clínica en la triquinosis [Ponce de León et al., 2017; Ponce de León et al., 2020]. El contacto de las LRN con los GR produce alteraciones en la carga eléctrica superficial de las células y modifica la dinámica de agregación eritrocitaria.

Los primeros experimentos con el agregómetro de chip óptico portátil, tuvieron como objetivo la obtención de los rangos de variación de los parámetros asociados a muestras de sangre de dadores sanos. De esta forma, en un futuro se podrá presentar los resultados con el agregómetro de manera similar a un examen bioquímico tradicional, donde se da el valor obtenido y el rango recomendado.

## **5. Técnica de Biospeckle**

### **5.1 Introducción**

Mediante el uso de algoritmos computacionales es posible obtener información de la cinética de agregación de glóbulos rojos, morfología de los agregados y otros parámetros de interés a partir del análisis de distribuciones de biospeckle. El desarrollo de esta técnica tiene como meta la implementación de tecnologías de diagnóstico no invasivas referentes al estudio de la sangre y sus componentes.

### **5.2 Ensayos preliminares**

Preliminarmente se estudió la velocidad de muestreo para la aplicación de la técnica de BSL en canales con distintas geometrías. Se varió la velocidad de flujo de la sangre entre 0 y 10 mL/h y se registraron secuencias de 1000 imágenes de speckle a 6, 15 y 20 imágenes por segundo (fps). Cada secuencia de imágenes registrada se analizó mediante los siguientes métodos de procesamiento de imágenes: FUJII y Diferencias Generalizadas Ponderadas (WDG). De esta manera se determinó la factibilidad de utilizar muestreos de baja velocidad para los experimentos y la velocidad de flujo límite para cada canal, la cual pudo ser contrastada con otros experimentos en similares condiciones experimentales [Yeom y Lee, 2015].

### 5.2.1 Método

En los experimentos realizados, cuando se capturan sucesivas imágenes de speckle, los valores de intensidad cambian de una imagen (cuadro o frame) a la siguiente, así se puede generar una matriz 3D que agrupe las  $N$  imágenes consecutivas. Sobre dicha matriz es posible aplicar varios métodos gráficos para procesar la información recopilada, como así también generar un video de la evolución temporal del experimento. Se utilizó el método de FUJII propuesto originalmente para la medición del flujo sanguíneo por Fujii et al. en 1985 [Fujii et al., 1985]. Paralelamente, se utilizó el método WDG ya que el fenómeno observado es rápido, y son necesarios pocos frames para detectar variaciones de intensidad, que se representan mejor cuando las diferencias generalizadas se limitan a frames cercanos [Rabal y Braga, 2009].

Para la realización de los experimentos se iluminaron con luz coherente (láser He-Ne,  $\lambda = 632,8$  nm, 75 mW) diferentes canales, rectangular, “Y” y tubular (Figura 5.1) conectados a una bomba de infusión de caudal controlado a jeringa (Cole Parmer 780100C) que inyectaba los GR suspendidos al 40 % en plasma autólogo. Para guiar el camino óptico se utilizó un espejo (E) y una lente expansora (LE) seguido por un pinhole (PH) para una iluminación más homogénea, como se muestra en la Figura 5.2. Las imágenes de BSL fueron capturadas por una video cámara (Dalsa modelo CA-D6, 256 x 256 píxels, 10  $\mu\text{m}$  por píxel), utilizando un software desarrollado previamente en el laboratorio. Las imágenes de BSL capturadas conforman una matriz 3D de intensidades de 256x256x1000 elementos (filas por columnas por frames).

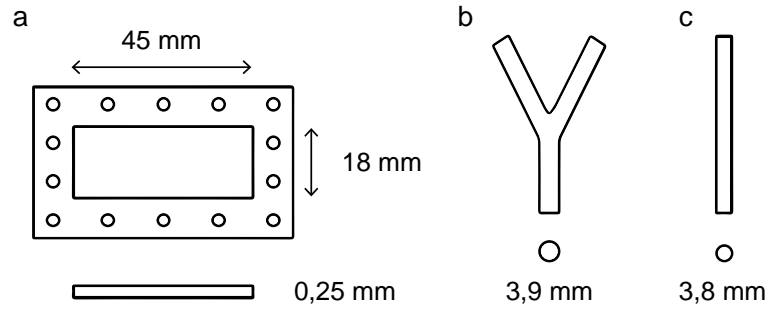
La técnica FUJII utiliza dicha matriz de intensidades como datos de entrada, y opera elemento a elemento recorriendo la tercera dimensión, a través de la ecuación:

$$FUJII = \sum_{k=1}^{N-1} \frac{|I_k - I_{k+1}|}{I_k + I_{k+1}}. \quad (5.1)$$

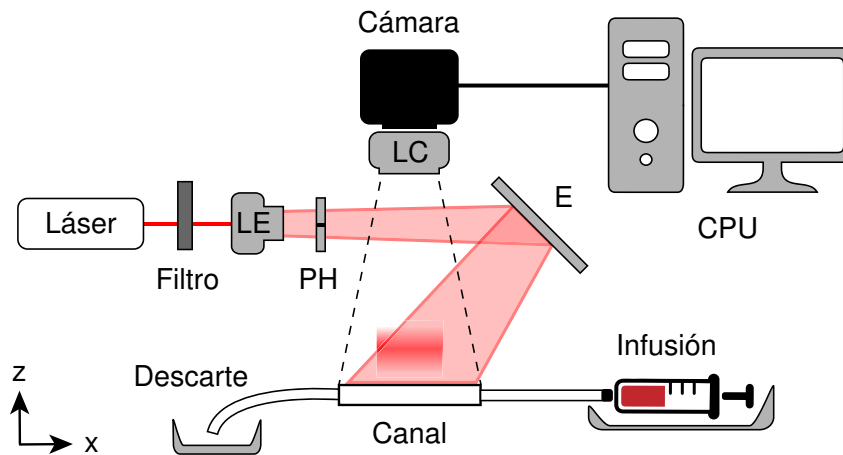
donde  $N$  es la cantidad total de imágenes de la secuencia analizada e  $I_k$  corresponde a

la  $k$ -ésima imagen de dicha secuencia.

Se obtuvo una matriz 2D que contiene información de la variación temporal de intensidad de cada píxel. Con este resultado, en el interior de los canales se realizó un histograma para los diferentes caudales empleados.



**Figura 5.1:** Canales utilizados: rectangular (a), “Y” (b) y tubular (c).



**Figura 5.2:** Esquema del sistema experimental. La intensidad de luz inicial se controló con un filtro dimmer. Lente expansora (LE), pinhole (PH), espejo (E), lente colectora (LC).

El coeficiente WGD está definido por la ecuación:

$$WGD = \sum_{k=1}^{N-m} \sum_{l=1}^m |I_k - I_{k+l}| \cdot p_l, \quad (5.2)$$

donde  $p_l$  asume el valor 1 dentro del subconjunto de  $m$  imágenes de interés y 0 en otra región.

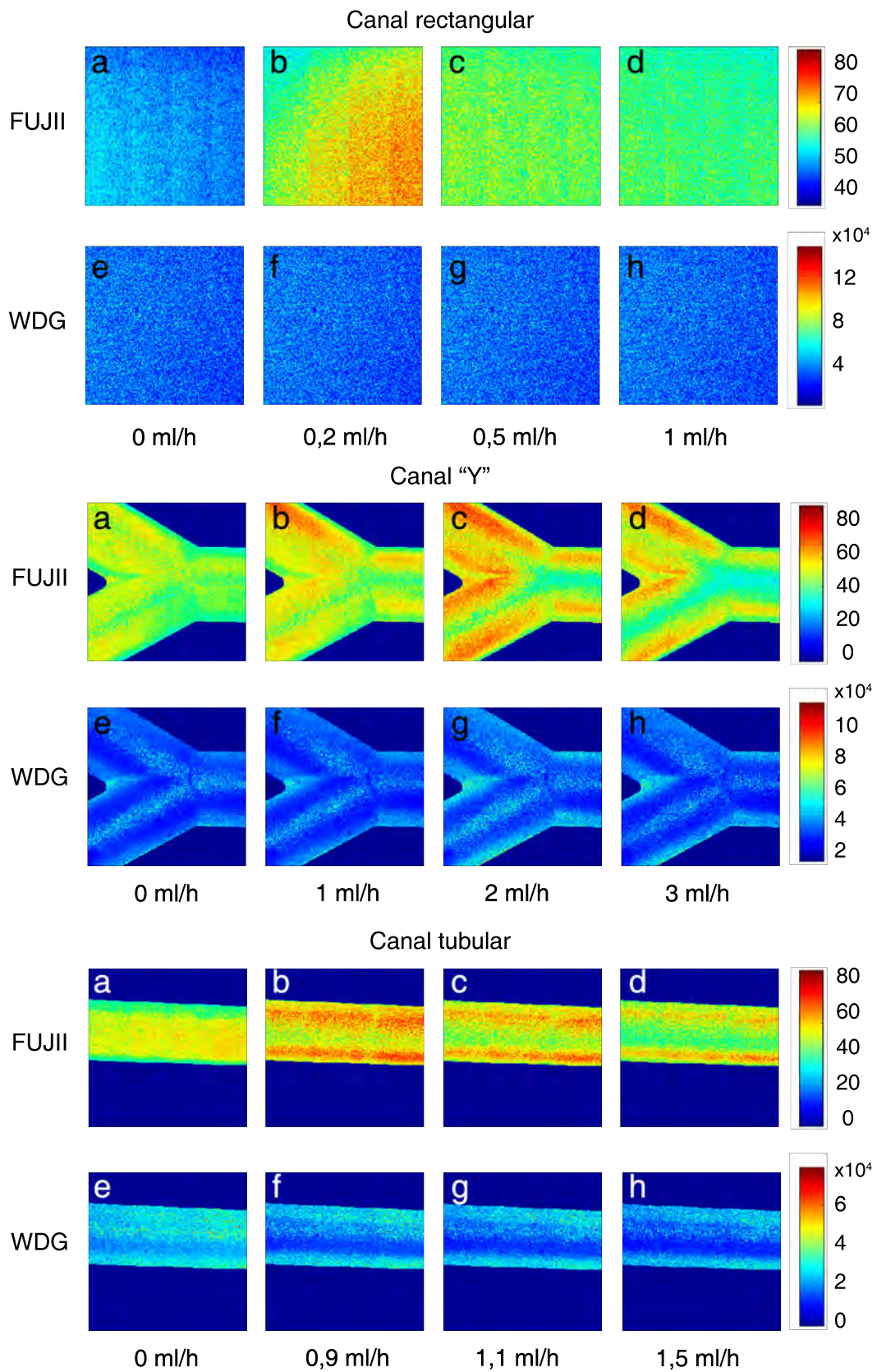
### 5.2.2 Resultados

Los caudales mayores a 3 mL/h resultaron en imágenes con predominancia del efecto de *blurring* o difuminado en todos los casos. En la Figura 5.3 se puede ver un ejemplo de la distribución gráfica del valor del coeficiente FUJII y WDG para el muestreo de 6 fps. Las zonas de color naranja o rojo corresponden a valores mayores de los coeficientes y, por lo tanto, a variaciones más bruscas en la intensidad de los píxels respecto a sus vecinos. Este comportamiento registrado es consecuencia directa de la variación temporal del patrón de speckle, producto del movimiento del fluido y los elementos dispersores.

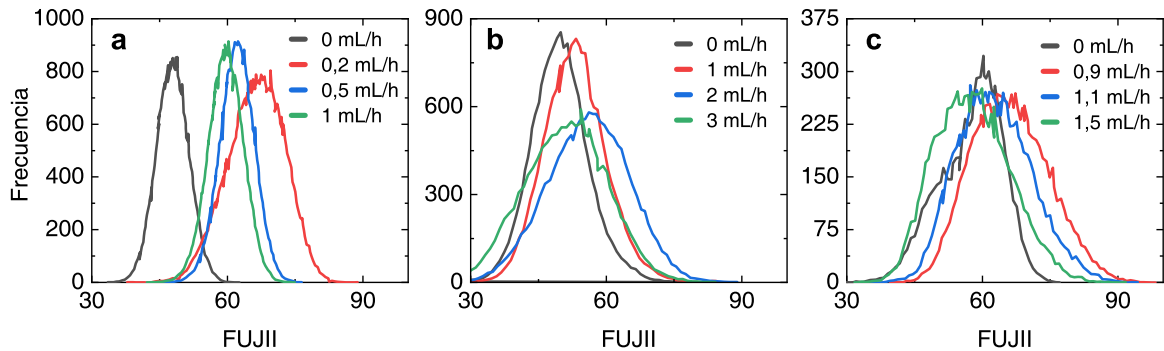
En este sistema en particular, el coeficiente WDG, no evidencia una sensibilidad marcada frente a las perturbaciones debido a la velocidad de flujo del medio dispersor. Por otro lado, el coeficiente FUJII permite visualizar zonas de mayor flujo, dependiendo de la velocidad de muestreo.

Se observa que a partir de 0,2 ml/h, 1 ml/h y 0,9 ml/h, para el canal rectangular, "Y" y tubular respectivamente, se producen pérdidas de sensibilidad de la técnica, obteniendo coeficientes menores para las velocidades mayores, tal como se muestra mediante la escala de colores en la Figura 5.3. Los histogramas del coeficiente FUJII para 20 fps presentados en la Figura 5.4, evidencian también la pérdida de sensibilidad, dado que muestran un retroceso del máximo central hacia valores menores del coeficiente a partir de dichos caudales.

Estos experimentos preliminares permitieron validar el muestreo entre 6 y 20 fps para flujos y turbulencias mínimas, como las producidas luego de la interrupción de tensiones de corte debidas al proceso de desagregación de GR. En consecuencia, se fijó para los experimentos siguientes 8 fps lo que corresponde a un registro de 1600 a 2000 imágenes de BSL con una duración de la medición de 200 a 250 s.



**Figura 5.3:** Distribuciones gráficas de FUJII y WDG para canales rectangular, "Y" y tubular (6 fps).



**Figura 5.4:** Histograma del coeficiente FUJII para 20 fps para los distintos canales, rectangular (a), “Y” (b), tubular (c).

### 5.3 Dinámica de GR en un tubo capilar

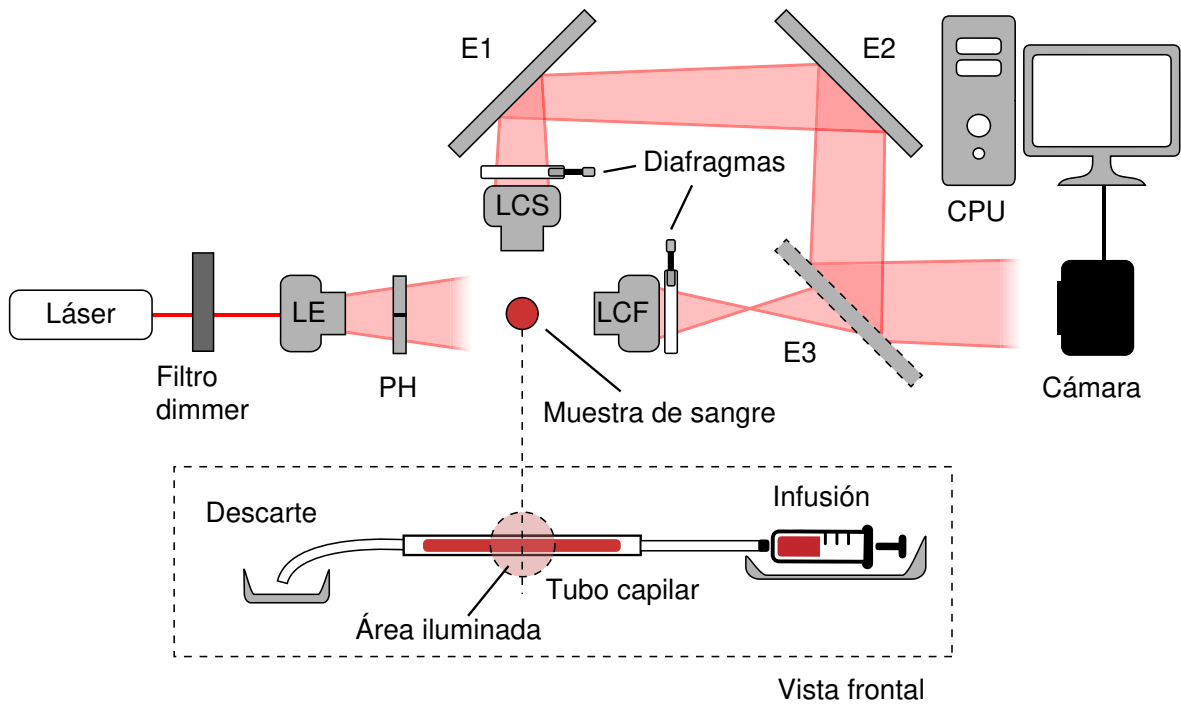
En esta sección se presentan los estudios de la dinámica de interacción de GR mediante BSL subjetivo en un tubo capilar, variando el hematocrito de la muestra. Como se mencionó anteriormente, la muestra iluminada dispersa la luz en todas direcciones y, tratándose de un medio semitransparente, es posible investigar desde distintos puntos de vista el comportamiento del elemento dispersor.

Se utilizaron muestras de sangre de 5 donantes sanos para preparar suspensiones de GR como se explicó en el Apéndice A. Los hematocritos a estudiar se establecieron entre 25 % y 50 %, con intervalos de 5 %. Paralelamente, se verificó la integridad de las células por microscopía de campo claro.

#### 5.3.1 Sistema experimental

La Figura 5.5 muestra el sistema experimental empleado. Se utilizó un láser He-Ne ( $\lambda=632,8$  nm, 60 mW, Melles Griot) para iluminar la muestra de sangre. La intensidad del haz era ajustada por un filtro dimmer, mediante una lente expansora de 10x (LE). Se controló el área de iluminación y un pinhole (PH) fue utilizado para homogeneizar la iluminación de la muestra. Se utilizaron dos lentes de magnificación 4x para recolectar

la luz dispersada hacia adelante (LCF) y en la dirección vertical (LCS). Después de las lentes se posicionaron dos diafragmas para controlar el tamaño de grano en la distribución de *speckle subjetivo*.



**Figura 5.5:** Representación esquemática de la configuración experimental vista desde el lateral, y una vista frontal del tubo capilar que contiene la muestra de sangre. Lente expansora (LE), pinhole (PH), espejo (E), lentes colectoras (LCS) y (LCF).

La muestra fue ubicada en el camino óptico de ambas lentes, ligeramente fuera de foco. Se debe notar que no se busca la reconstrucción de la imagen de la muestra, sino captar las interferencias constructivas y destructivas que resultan de la dispersión de la luz. Los espejos E1, E2, y E3 permitieron la observación del haz dispersado en la dirección vertical que produce la imagen de *side scattering* (SSC). Removiendo E3 se obtenía la imagen de *forward scattering* (FSC). Los datos fueron registrados por una video cámara (Dalsa modelo CA-D6, 256×256 píxeles, 10  $\mu\text{m}$ , por píxel) controlada externamente por un frame grabber (Coreco Imaging PIC-DIG) y una CPU. Los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente controlada de 24°C y el sistema

fue montado en una mesa óptica Melles Griot para evitar interferencias vibracionales.

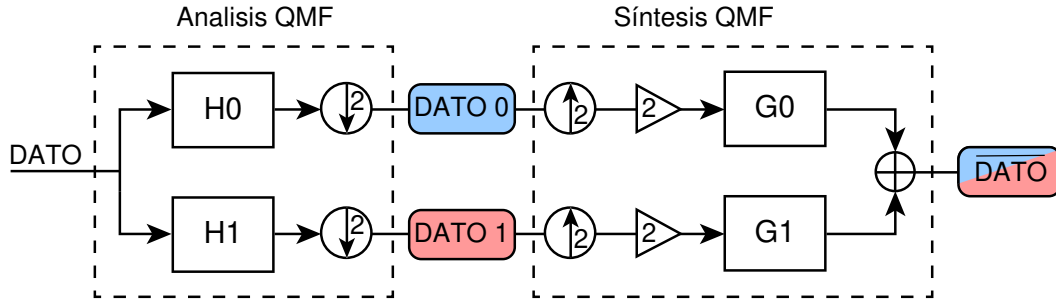
### 5.3.2 Adquisición de datos y análisis

Una vez encendido, el láser se dejó 10 minutos para la estabilización del haz y el software se inició fijando un muestreo de 8 fps. Un tubo capilar de diámetro interno de  $(0,8 \pm 0,1)$  mm se llenó con aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  de sangre y se fijó en posición con mangueras con jeringas en ambos extremos. Luego de posicionar la muestra, los GR fueron desagregados por agitación hacia atrás y adelante, como se propone en el método desarrollado por Baskurt [Baskurt et al., 2011]. Finalmente, la muestra se dejó en reposo y se registraron 1600 imágenes de BSL durante 200 s. Quitando o reposicionando el espejo E3, se tomaron lotes de imágenes correspondientes a FSC-BSL y SSC-BSL.

Los datos fueron analizados utilizando un software propio mediante el siguiente procedimiento: Inicialmente, se creó una matriz 3D del mapa de intensidades de cada píxel para cada frame. A los datos registrados se aplicó un filtro de espejo en cuadratura basado en la transformada wavelet discreta (DWT) [Agrawal y Sahu, 2013; Vetterli y Herley, 1992], para mejorar la identificación de la información correspondiente al comportamiento dinámico de los GR. La Figura 5.6 muestra el esquema de tratamiento de la señal para este filtrado. De esta manera, se utilizó un número reducido de muestras (coeficientes) para representar la información de una banda de frecuencia específica de la señal original. Es importante notar que estos coeficientes no tienen una relación inmediata con la señal original, de modo que para reconstruir los datos, es necesario hacer la transformada wavelet discreta inversa (IDWT).

Mediante la descomposición, las frecuencias bajas y las frecuencias altas se separaron con un corte en  $1/4$  de la frecuencia de muestreo. Posteriormente, se realizó el proceso inverso pero obviando los *coeficientes bajos* y los *coeficientes altos* para cada reconstrucción. El resultado final consistió en dos matrices 3D que contienen la información de 0 a  $f/4$  Hz y  $f/4$  a  $f/2$  Hz respectivamente, siendo  $f$  la frecuencia de

muestreo.



**Figura 5.6:** Esquema de descomposición de frecuencias y reconstrucción de los datos por transformada wavelet. DATO 0 y DATO 1 pueden modularse mediante una constante y controlar la proporción de las frecuencias en la reconstrucción final.

### 5.3.3 Parámetros de BSL: Coeficiente de Correlación y Momento de Inercia

Para estudiar la dinámica de la distribución de BSL se utilizaron dos parámetros basados en el cálculo numérico, el Coeficiente de Correlación (CC) y el Momento de Inercia (IM).

El Coeficiente de Correlación  $CC(k)$  entre la primer imagen y las siguientes se define como [Federico et al., 2006]:

$$CC(k) = \frac{\langle I(0)I(k) \rangle - \langle I(0) \rangle \langle I(k) \rangle}{[(\langle I^2(0) \rangle - \langle I(0) \rangle^2)(\langle I^2(k) \rangle - \langle I(k) \rangle^2)]^{1/2}}, \quad (5.3)$$

donde  $k$  es el número de frame y asume los valores  $0, 1, \dots, (K - 1)$ , siendo  $K$  el número total de imágenes de la secuencia registrada durante el experimento.  $I(k)$  es el mapa de intensidad de los píxels (matriz compuesta por los niveles de gris de cada píxel correspondientes al frame  $k$ ) y  $\langle \rangle$  denota el operador valor medio, *i. e.* el promedio matemático de los elementos de matriz.

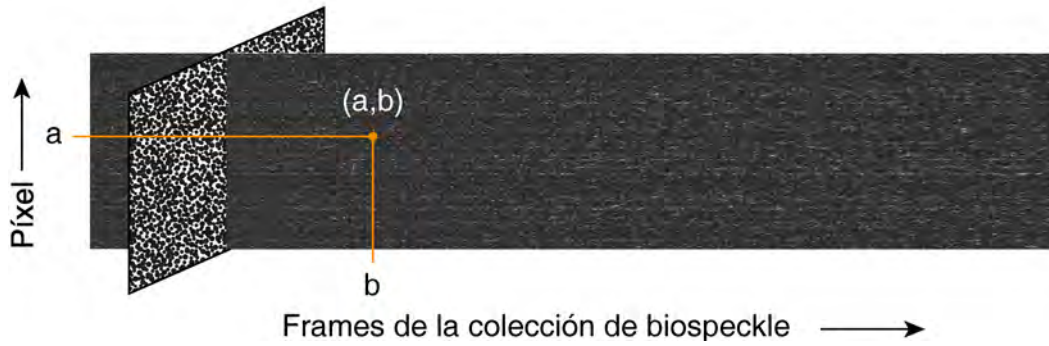
Este coeficiente proporciona una comparación cuantitativa de la similitud de cada patrón de biospeckle  $I(k)$  de la serie temporal, con respecto al primero  $I(0)$  elegido

como estado de referencia. Además, la gráfica de  $CC(k)$  en función del número de frame  $k$  proporciona una medición cualitativa de la dinámica del proceso bajo análisis. Este índice está relacionado con el movimiento de los GR dentro del tubo capilar.

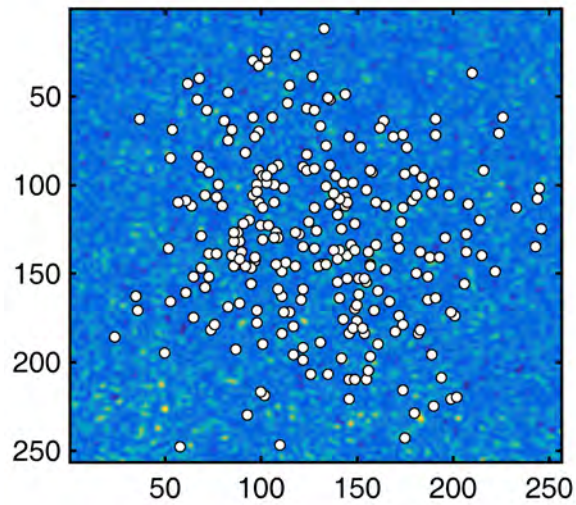
El cálculo del Momento de Inercia requiere la construcción previa del “Time History Speckle Pattern” (THSP) [Oulamara et al., 1989] y seguidamente la Matriz de Co-ocurrencia (COM) [Arizaga et al., 1999]. El THSP almacena la evolución temporal de la intensidad de píxels. Gráficamente, el THSP se representa como una imagen donde la coordenada vertical corresponde a cada píxel y la horizontal a cada frame de la colección, el valor de intensidad del punto de coordenadas  $(a, b)$  es el valor del píxel  $a$  en el frame  $b$  como se observa en la Figura 5.7. Frecuentemente, a simple vista el THSP permite apreciar evoluciones temporales de mayor o menor actividad, en función de la continuidad de las líneas horizontales en su expresión gráfica. La formación de éstas líneas indica la permanencia de un píxel en cierto valor de intensidad a lo largo del tiempo. Una práctica común para la selección de los píxels para el THSP es la adopción de una columna de la matriz de la distribución temporal de BSL. En este trabajo, sin embargo, se utilizó una selección al azar para un mejor enfoque, en consonancia con la distribución estadística de la muestra. En particular, los puntos analizados fueron seleccionados aleatoriamente, basándose en una distribución gaussiana en 2 dimensiones alrededor del píxel central de las imágenes de la matriz de BSL, como se ve en la Figura 5.8. Esta selección se realiza para cada colección de imágenes.

La COM evalúa la dispersión de píxels consecutivos en el THSP, representando un histograma de transición de intensidades. El elemento de matriz  $COM(i, j)$  es el número de ocurrencias de un cierto valor de intensidad  $i$  que es seguido inmediatamente por un valor de intensidad  $j$ . Los puntos se distribuyen a lo largo de la diagonal principal de la matriz, como se ve en la Figura 5.9, indicando la *actividad* de la muestra. Esta actividad, se atribuiría al movimiento Browniano de las células aisladas, a la formación de agregados y al proceso de sedimentación. De manera visual, cuanto mayor es la

actividad, mayor es la dispersión alrededor de la diagonal principal.



**Figura 5.7:** Ejemplo del Time History Speckle Pattern (THSP) construido a partir de los píxeles de una línea vertical. Cada fila representa la evolución temporal de la intensidad del píxel correspondiente.

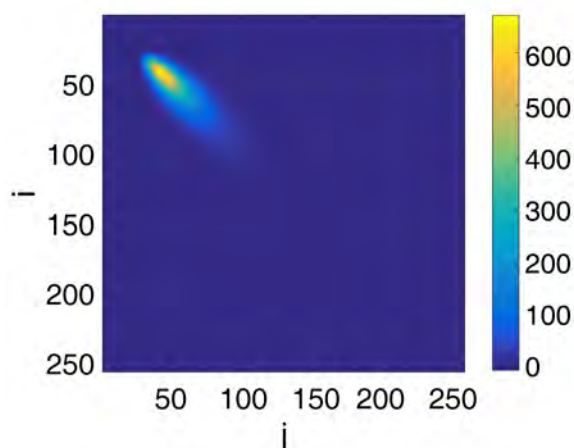


**Figura 5.8:** Distribución gaussiana para 256 píxeles (círculos blancos) elegidos aleatoriamente alrededor del centro de la imagen, utilizados para construir el THSP.

La distribución alrededor de la diagonal principal se puede cuantificar por el IM, que se define como:

$$IM = \sum_i \sum_j \frac{COM(i, j)}{Norm} |i - j|^2, \quad (5.4)$$

donde  $i$  y  $j$  son las coordenadas de la matriz COM, y  $Norm$  es la normalización de la COM [Cardoso y Braga, 2014].



**Figura 5.9:** Matriz de Co-ocurrencia (COM) calculada a partir del THSP con selección de distribución gaussiana.

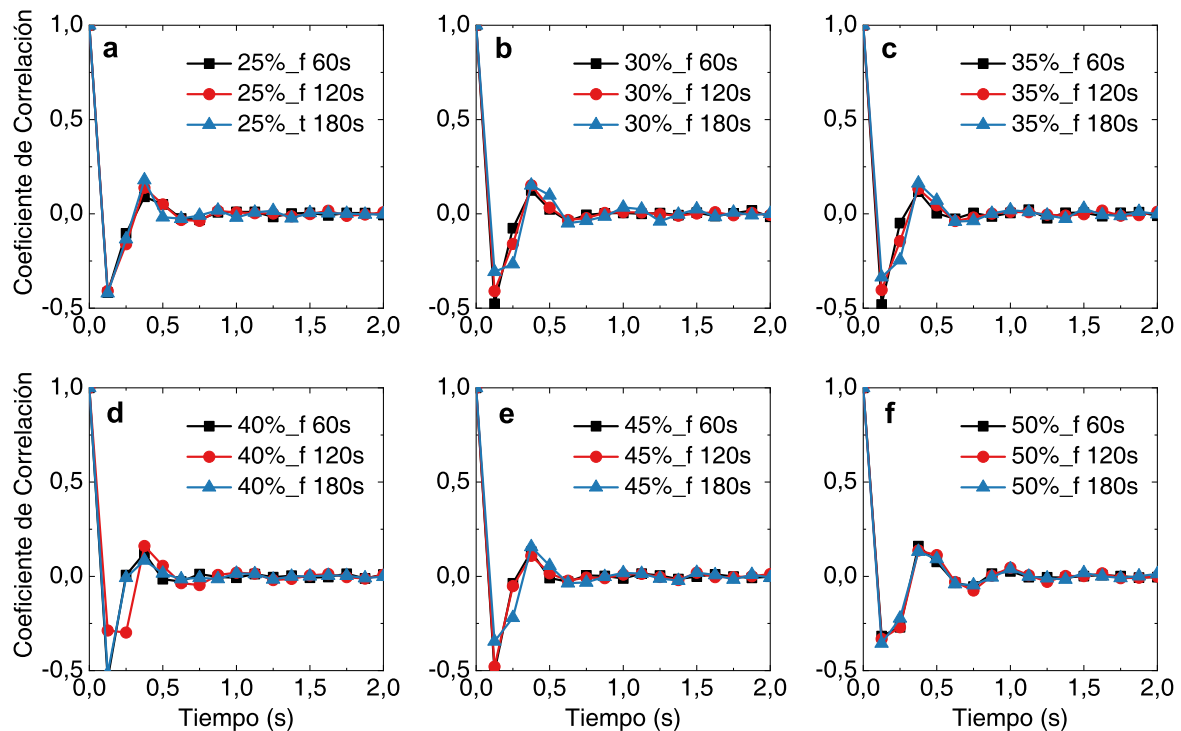
### 5.3.4 Resultados

Las interacciones de GR se estudiaron mediante análisis de BSL en muestras con diferentes hematocritos. Se observaron variaciones de los parámetros y se evaluó su sensibilidad obteniendo los siguientes resultados.

#### Coeficiente de Correlación

Las determinaciones se centraron en las imágenes obtenidas por FSC-BSL ya que los datos de SSC-BSL mostraron pérdida de correlación en los primeros 0,5 s para todas las muestras, con el CC alcanzando rápidamente un valor mínimo. Para estudiar la evolución del proceso de interacción eritrocitaria en diferentes instantes de tiempo, se calculó el CC fijando el primer frame de referencia luego de 60 s, 120 s y 180 s. Se observó una rápida pérdida de correlación para la banda de altas frecuencias, sin distinción entre el hematocrito de la muestra o el frame inicial considerado para el

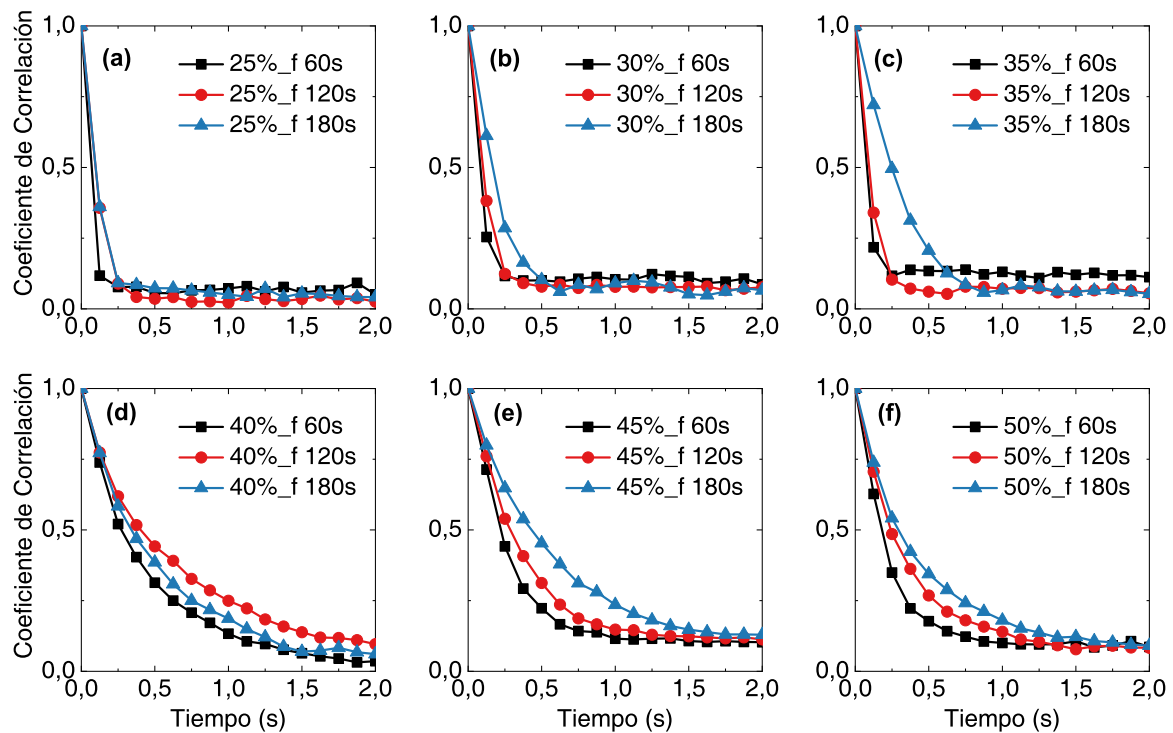
cálculo del CC, como se ve en la Figura 5.10.



**Figura 5.10:** CC para datos de FSC-BSL luego del filtrado DWT pasa alto. (a) a (f) corresponden a hematocritos de 25 % a 50 % respectivamente. Se produce una rápida decorrelación para cada muestra para cada tiempo inicial.

Por otro lado, el CC mostró variaciones en el tiempo para la banda de bajas frecuencias, lo que implica distinta decorrelación del patrón de BSL (Figura 5.11). Además, se observa que existen diferencias de acuerdo al hematocrito de la muestra. Es pertinente aclarar que para todos los casos, sean señales de SSC-BSL o FSC-BSL, los CC alcanzan rápidamente un mínimo cuando se utiliza el primer frame de la colección como referencia, esto se atribuye a la turbulencia residual de la muestra en el instante en que se interrumpe la desagregación. Además, también debe considerarse el hecho de que los GR poseen un período de relajación para recuperar su forma de discocito.

Considerando la evolución del CC como una función exponencial, es posible linealizar la dependencia del CC aplicando el logaritmo natural. El logaritmo natural del CC se ajustó linealmente, como se ve en la Figura 5.12 (a), y la pendiente obtenida se de-

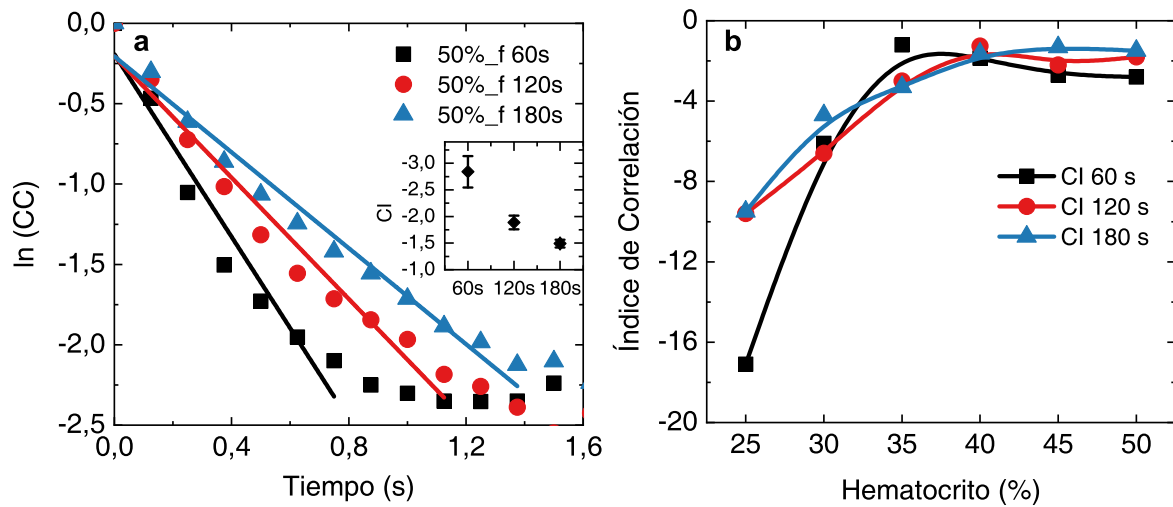


**Figura 5.11:** CC para datos de FSC-BSL luego del filtrado DWT pasa bajo. (a) a (f) corresponden a hematocritos de 25 % a 50 % respectivamente.

finió como el Índice de Correlación (CI). El coeficiente de determinación  $R^2$  para cada ajuste lineal, asumió valores entre 0,95 y 0,99. La Figura 5.12 (b) muestra los valores medios de CI para los experimentos de FSC-BSL en la banda de frecuencias bajas. Se observa que CI se estabiliza a partir del 40 % de hematocrito aproximadamente en -2.

### Momento de Inercia

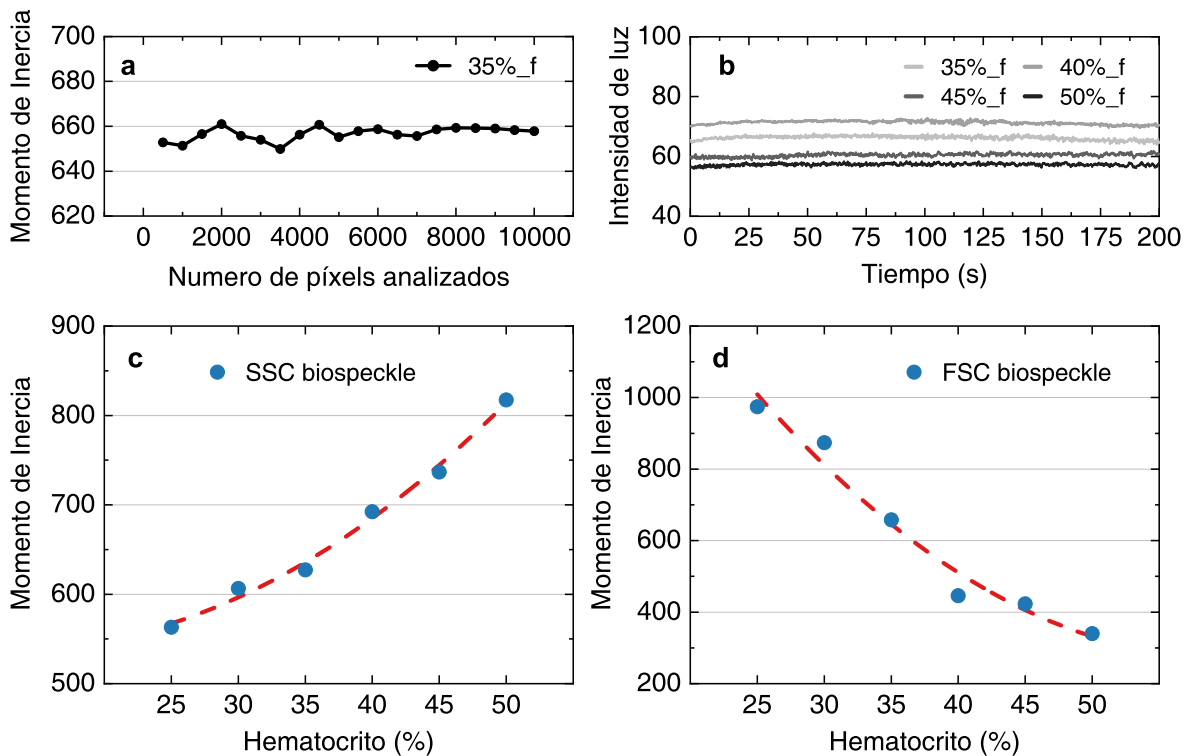
El IM se calculó para distintas cantidades de píxeles aleatoriamente seleccionados, como se explicó en la sección 5.3.3, iniciando con 500 hasta 10000 píxeles, con pasos de a 500. El tiempo de cómputo de cada secuencia por hematocrito por muestra, fue menor a 2 minutos y los cálculos de realizaron sobre la señal original. Los valores de IM obtenidos de iteraciones mayores a 4000 puntos de análisis no mostraron variaciones significativas para todos los hematocritos analizados. Consecuentemente, esta cantidad de puntos se estableció como óptimo para futuros cálculos de esta índole, ahorrando



**Figura 5.12:** Logaritmo natural del CC y ajuste lineal correspondientes a un hematocrito del 50 % (a), donde el gráfico incrustado muestra el CI para cada tiempo inicial. Índices de Correlación calculados para FSC-BSL correspondientes a diferentes hematocritos (b). Los valores de CI corresponden al promedio obtenido a partir de 5 muestras para cada hematocrito.

capacidad de cómputo. La Figura 5.13 (a) muestra la gráfica de IM versus el número de píxels analizados para el caso particular de 35 % de hematocrito. Puede notarse que, luego de 4000 píxels, analizados el IM tiende a su valor medio.

A medida que aumenta el hematocrito, la intensidad de la luz disminuye debido a un mayor número de células presentes en la muestra. Para solucionar este problema, se ajustó la intensidad de la luz a fin de lograr las mejores condiciones de contraste con respecto a la compatibilidad entre la cámara y el fenómeno observado. La Figura 5.13 (b) muestra la variación en el tiempo de la intensidad de luz media en el tiempo para cuatro hematocritos diferentes. La intensidad de luz media es aproximadamente la misma para cada experimento y se mantiene constante a lo largo de cada medición. La Figura 5.13 (c) y (d) muestra la dependencia del IM con respecto al hematocrito en cada experimento. En el caso de FSC-BSL, los valores de IM son más bajos para un mayor número de células, pero la tendencia se revierte para SSC-BSL. Los valores de IM reportados corresponden a la media obtenida de cinco muestras para cada hematocrito.



**Figura 5.13:** Valores de IM obtenidos con varias iteraciones de distribuciones gaussianas aleatorias de puntos, para una muestra de hematocrito 35 % (a). Intensidad de luz media durante la medición y para diferentes hematocritos (b). IM para muestras de distintos hematocritos con SSC-BSL (c) y con FSC-BSL (d).

### 5.3.5 Discusión

Esta técnica se basa en registrar la luz dispersada aleatoriamente por una muestra. Por lo tanto, no existe ninguna referencia geométrica asociada al patrón de BSL observado. La información registrada es el resultado de la contribución de todas las partículas que constituyen el volumen analizado.

Los granos de BSL son consecuencia de la interferencia constructiva y destructiva de la luz dispersa, por lo que no hay visualización directa de los GR. En consecuencia, esta técnica no distingue inhomogeneidades en la densidad de partículas relacionadas con aspectos geométricos dentro del capilar. Además, las eventuales fluctuaciones locales del hematocrito dentro del tubo quedarían enmascaradas por el comportamiento global

de la muestra de sangre.

Los resultados para los datos correspondientes a la banda de alta frecuencia mostraron el mismo comportamiento independientemente de la muestra de sangre analizada. El medio de suspensión, *i.e.*, el plasma, es el elemento que permanece invariable en cada prueba. Por otro lado, la evolución CC calculada a partir del filtrado WDT pasa bajo muestra variaciones con el hematocrito, lo que implica diferencias en la dinámica de las células. Estos resultados sugieren que los datos del ancho de banda de alta frecuencia contienen principalmente información sobre las fluctuaciones del medio de suspensión, como se propone de manera similar en [Braga et al., 2007, 2009].

A pesar de que las condiciones iniciales y de adquisición fueron las mismas para cada experimento, el CC calculado a partir de SSC-BSL cae rápidamente a cero, no siendo así en el caso de FSC-BSL. En consecuencia, las fluctuaciones plasmáticas y la interacción de los GR podrían tener una mayor influencia en SSC-BSL.

Se observó que los valores de IM siguen una tendencia inversa para los datos recopilados de cada configuración experimental. Los valores de IM obtenidos por SSC-BSL aumentan a medida que aumenta el hematocrito, pero los obtenidos por FSC-BSL disminuyen. Es importante tener en cuenta que las consecuencias de la interacción de GR y las proteínas del plasma, por ejemplo en la formación de agregados, tienen además una marcada influencia en el proceso de sedimentación de los dispersores. A través de los experimentos, se observa la dinámica de sedimentación desde diferentes puntos de vista, lo que posiblemente influya en el resultado final de los valores de IM. Por ejemplo, esto puede producir la tendencia inversa antes mencionada, añadiendo el hecho de que la cantidad de GR modifica la actividad presente en la muestra.

Las variaciones de la IM con respecto a la concentración de GR en plasma alienta el uso de este índice como un identificador de hematocrito. Para cada prueba, la intensidad de la luz se ajustó para tener la mejor calidad de imagen de BSL y por lo tanto, la intensidad media no está determinada por las características específicas de cada

muestra. Este hecho permitiría utilizar las curvas de IM versus hematocrito sin el requisito de una calibración inicial, mientras se preserve la calidad de imagen de BSL, siempre que se conserve la configuración experimental.

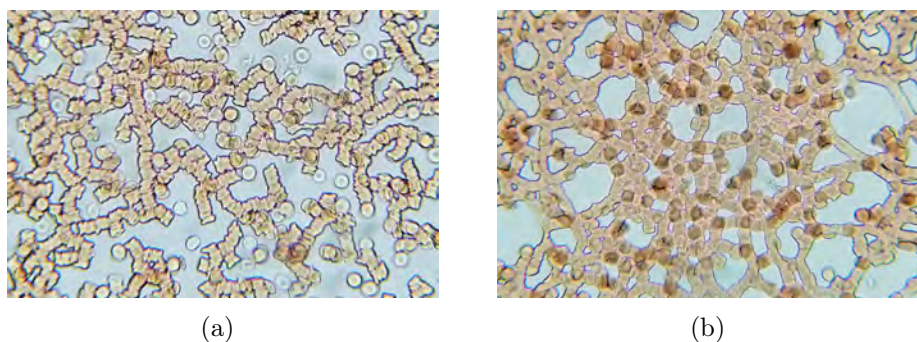
La simplicidad de la disposición experimental junto con el requerimiento de componentes de costo moderado y su potencial característica no invasiva, hacen que el método de BSL se destaque entre las técnicas basadas en luz coherente. Estas características lo hacen adecuado para evaluar la dinámica de los eritrocitos para mejorar el diagnóstico y seguimiento de las patologías vasculares, en particular debido a la naturaleza estadística y la dependencia temporal de los resultados. Los objetivos a corto plazo se relacionan con la evaluación de descriptores adicionales de BSL para obtener tanta información como sea posible de una medición, esto reside principalmente en la calidad de imagen BSL lograda.

## 5.4 Estudio de la agregación de GR

En esta etapa se trabajó con BSL objetivo. En consecuencia, el sistema experimental fue diferente y el enfoque se centró en posibles variaciones en el tamaño de grano de la distribución de BSL. Con este fin, se propuso otro parámetro basado en la autocovarianza de la colección de imágenes.

Para controlar el grado de agregación eritrocitaria presente en la muestra de sangre se utilizó dextrán. Como se ha mencionado, este polisacárido altera la adhesión de las células, dependiendo de su concentración en el medio de suspensión. Se prepararon suspensiones de GR en PBS y plasma con concentraciones de dextrán 500 entre 0,2 y 1,2 g/dL, como se explica en el Apéndice A. Al presentar la muestra de sangre actividad en el tiempo debida a la agregación y la dinámica celular, el “área iluminada” varía de acuerdo a la formación de estructuras por la adhesión celular. En el caso de agregación eritrocitaria aumentada por la formación de grandes *rouleaux* o *clusters*,

se prevé una disminución del área iluminada debido a la menor cantidad de células aisladas y la formación de “claros” en la muestra, como se muestra en la Figura 5.14. Recordando la ecuación 3.6 de la sección 3.2.2, la reducción del área iluminada produce como consecuencia el aumento del tamaño de grano de BSL.

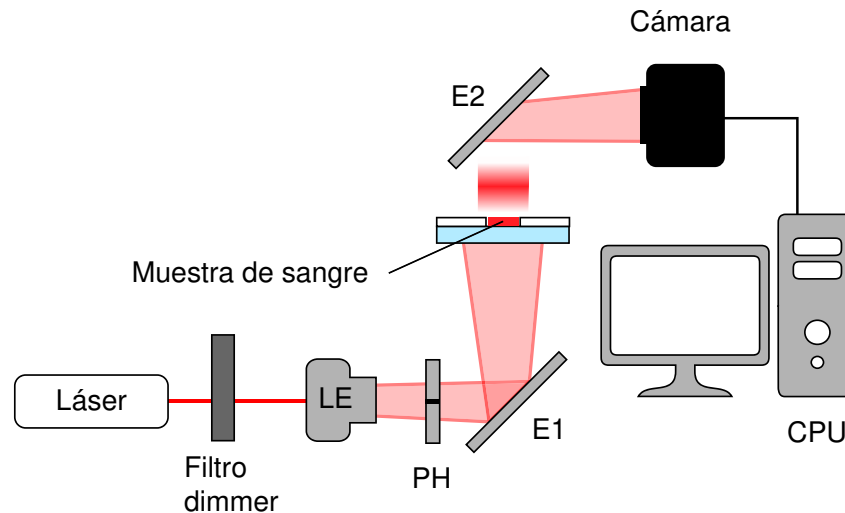


**Figura 5.14:** Fotografías de agregados de GR en plasma (a) y en medio de suspensión de plasma con concentración de dextrán 0,8 g/dL (b). Microscopio óptico con lente 40x, hematocrito 2,5%.

### 5.4.1 Sistema experimental

En este caso, como portamuestras se utilizó el chip óptico desarrollado para el agregómetro de transmisión de luz. De esta forma, se realizaron determinaciones con el agregómetro paralelamente a los experimentos de BSL, siendo consistentes con la geometría de la cámara de prueba. El dispositivo experimental de BSL objetivo, esquematizado en la Figura 5.15, constó de un láser He-Ne ( $\lambda=632,8$  nm, 60 mW, Melles Griot) para iluminar la muestra de sangre. La intensidad del haz era ajustada por un filtro dimmer, se controló el área de iluminación mediante una lente expansora de 10x (LE) y se usó un pinhole (PH) para homogeneizar la fuente de luz. El chip óptico se colocó en el camino del haz entre los espejos E1 y E2. El espejo E2 permitió la observación del haz dispersado hacia adelante, obteniendo una imagen de FSC-BSL. Los datos fueron registrados por una video cámara (Dalsa modelo CA-D6, 256 x 256 píxels, 10  $\mu\text{m}$  por píxel) controlada externamente por un frame grabber (Coreco Imaging PC-DIG) y

una CPU. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente controlada de 24°C y el sistema fue montado en una mesa óptica Melles Griot para evitar interferencias de vibraciones mecánicas externas.



**Figura 5.15:** Representación esquemática de la configuración experimental de BSL objetivo, vista lateral. Lente expansora (LE), pinhole (PH), espejo (E).

#### 5.4.2 Análisis del tamaño de grano de BSL

De manera análoga a lo explicado anteriormente para los experimentos del tubo capilar, el muestreo fue fijado en 8 fps. Luego de posicionar el chip óptico con 15  $\mu\text{L}$  de sangre previamente desagregada con micropipeta, se registraron 2000 imágenes de BSL durante 250 s. Los datos fueron analizados con software propio, se aplicó el filtrado DWT descrito en la sección 5.3.2 y de manera análoga se calculó el CC.

Para estimar el tamaño de grano de BSL se calculó la función de autocovarianza normalizada de la distribución de intensidades registrada en la matriz 3D para cada frame. Este método utiliza la función de autocorrelación de la intensidad que proporciona una medida del radio promedio de un grano de speckle [Piederrière et al., 2005].  $I(x_1, y_1)$  e  $I(x_2, y_2)$  son las intensidades de dos puntos en el frame  $(x, y)$ , la función de autocorrelación de la intensidad se define por la siguiente ecuación:

$$R_I(\Delta x, \Delta y) = \langle I(x_1, y_1) I(x_2, y_2) \rangle, \quad (5.5)$$

donde  $\Delta x = x_1 - x_2$ ,  $\Delta y = y_1 - y_2$  y  $\langle \rangle$  es el operador valor medio. Si  $x_2 = 0$ ,  $y_2 = 0$ ,  $x_1 = x$  e  $y_1 = y$  se tiene:

$$R_I(\Delta x, \Delta y) = R_I(x, y). \quad (5.6)$$

La función de autocovarianza normalizada de la intensidad,  $AC_I(x, y)$  se escribe como:

$$AC_I(x, y) = \frac{R_I(x, y) - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2}. \quad (5.7)$$

Según el teorema de Wiener-Khintchine, la función de autocorrelación está dada por la Transformada Inversa de Fourier ( $FT^{-1}$ ) de la Densidad Espectral de Potencia ( $PSD$ ) que se expresa como:

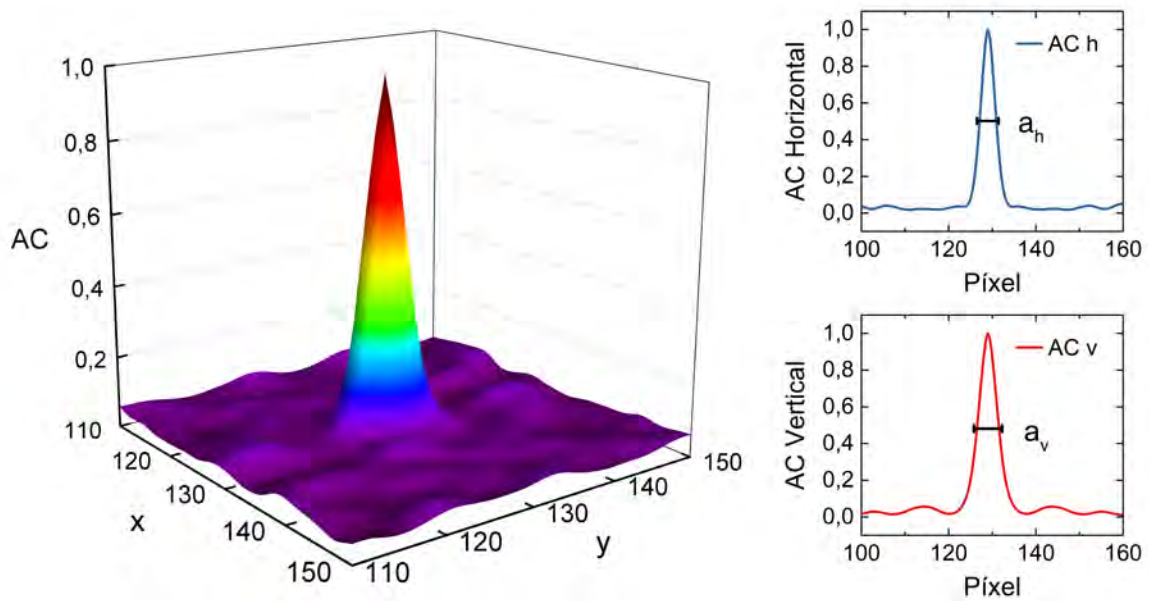
$$PSD_I(v_x, v_y) = |FT[I(x, y)]|^2, \quad (5.8)$$

donde ( $FT$ ) es la Transformada de Fourier.

De esta manera,  $AC_I(x, y)$  calculada a partir de la distribución de BSL resulta:

$$AC_I(x, y) = \frac{FT^{-1}[|FT[I(x, y)]|^2] - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2}, \quad (5.9)$$

donde,  $AC_I(x, 0)$  y  $AC_I(0, y)$  son los perfiles horizontal y vertical de  $AC_I(x, y)$  respectivamente. Luego, el ancho a la mitad del máximo de la función  $AC$  se define como  $a_h$  y  $a_v$  para el perfil horizontal y el vertical respectivamente, como se muestra en la Figura 5.16. Estos parámetros brindan información representativa de las dimensiones del grano de speckle. Adicionalmente se definió  $S_g = a_h \times a_v$  como una aproximación de la superficie que ocupa el grano en la distribución de BSL.

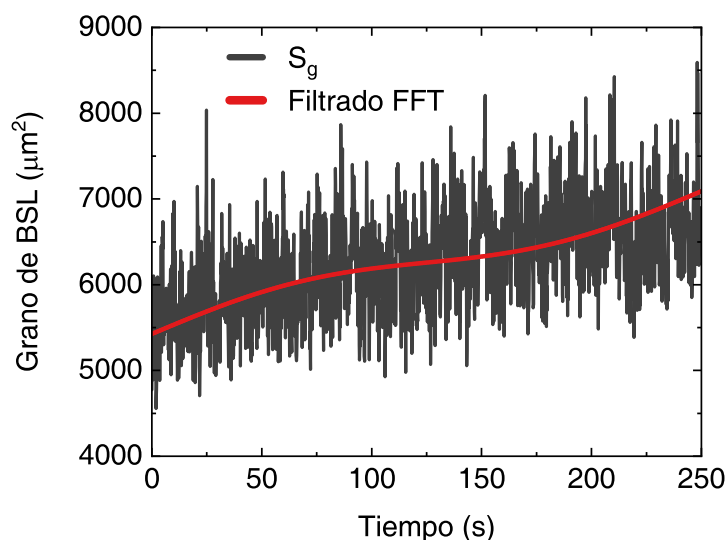


**Figura 5.16:** Reconstrucción 3D de la función de autocovarianza para un frame particular de la colección obtenida de BSL de una muestra de sangre (a), perfil horizontal y semi ancho  $a_h$  (b), perfil vertical y semi ancho  $a_v$  (c).

### 5.4.3 Resultados

Se observaron variaciones en la superficie que ocupa el tamaño de grano según distintas características en la muestra, corroborando la hipótesis de la factibilidad de la utilización del BSL objetivo como descriptor del fenómeno de agregación eritrocitaria. La Figura 5.17 muestra  $S_g$  en función del tiempo para una muestra de GR suspendidos en plasma autólogo. En esa primera etapa de puesta a punto se trabajó con los datos sin filtrado WDG sin lente expansora, obteniendo una tendencia creciente enmascarada bajo oscilaciones de alta frecuencia.

Además del tamaño de grano, se estudió el comportamiento de los parámetros anteriormente definidos para BSL subjetivo, el CC y el IM, en este caso frente a variantes en el medio de suspensión.



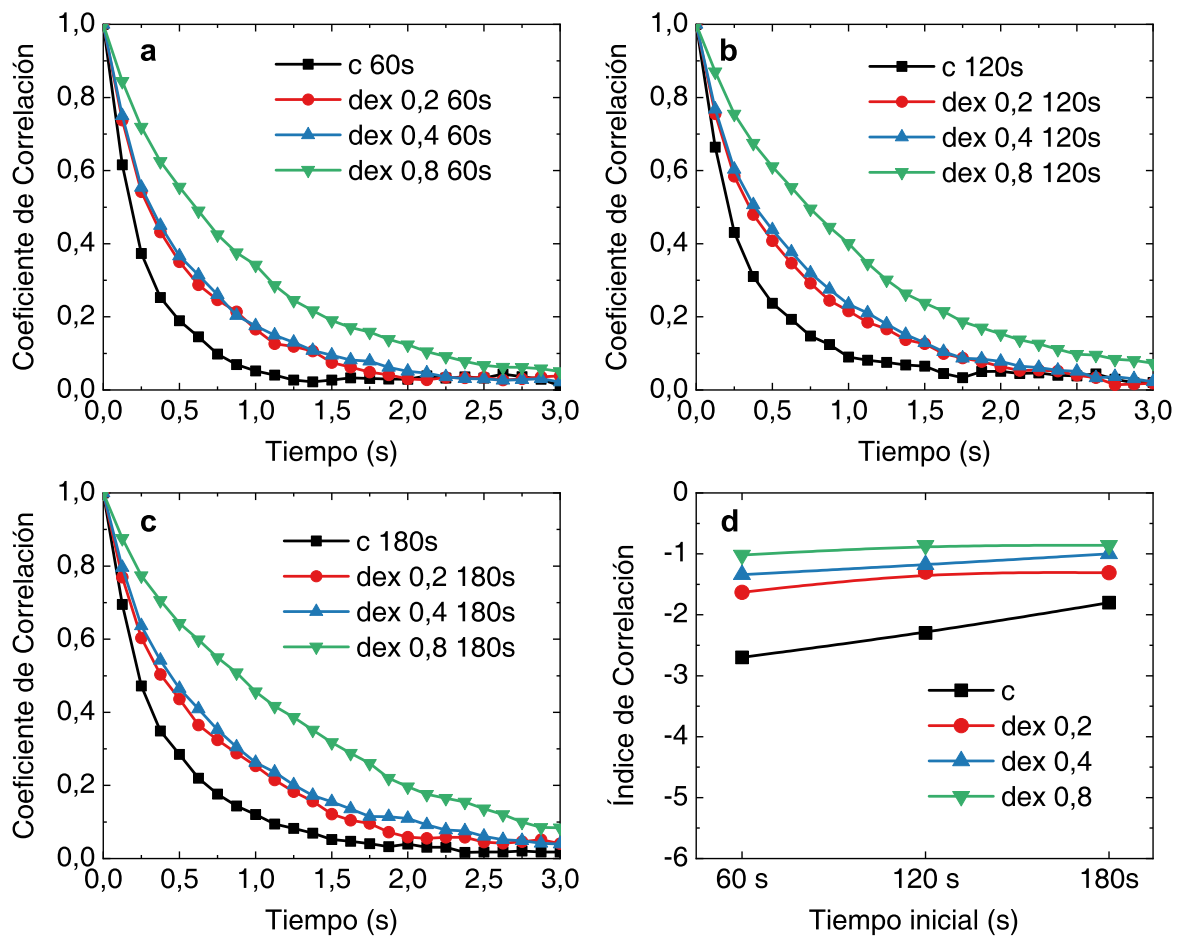
**Figura 5.17:** Evolución temporal del tamaño de grano para una muestra de sangre de hematocrito 40 %. Mediante el filtrado por Transformada de Fourier Rápida se observa más claramente una tendencia al incremento.

### GR suspendidos en plasma con dextrán

Los GR se suspendieron en soluciones de plasma autólogo con dextrán obteniendo concentraciones finales de 0,2, 0,4 y 0,8 g/dL. Es importante recordar que en este caso se cuenta con la presencia de fibrinógeno debido al plasma, y se adiciona el dextrán a este medio. El hematocrito fue fijado en 40 %.

El CC presentó diferentes evoluciones de acuerdo a la concentración de dextrán presente en la muestra. A medida que la agregación eritrocitaria es mayor debido al efecto del polisacárido en la formación de los enlaces entre GR, el decaimiento del CC es menos pronunciado, como se muestra en la Figura 5.18 (a), (b), y (c).

En línea con lo esperado, el CI no presenta marcadas variaciones dentro de un mismo tipo de muestra para distintos tiempos iniciales de cálculo, puesto que se observó que para BSL subjetivo este parámetro se estabiliza a partir de un hematocrito del 40 % cerca del valor -2. Además, los valores en este caso oscilan entre -3 y -0,5, incrementándose a medida que aumenta la concentración de dextrán, como se observa en



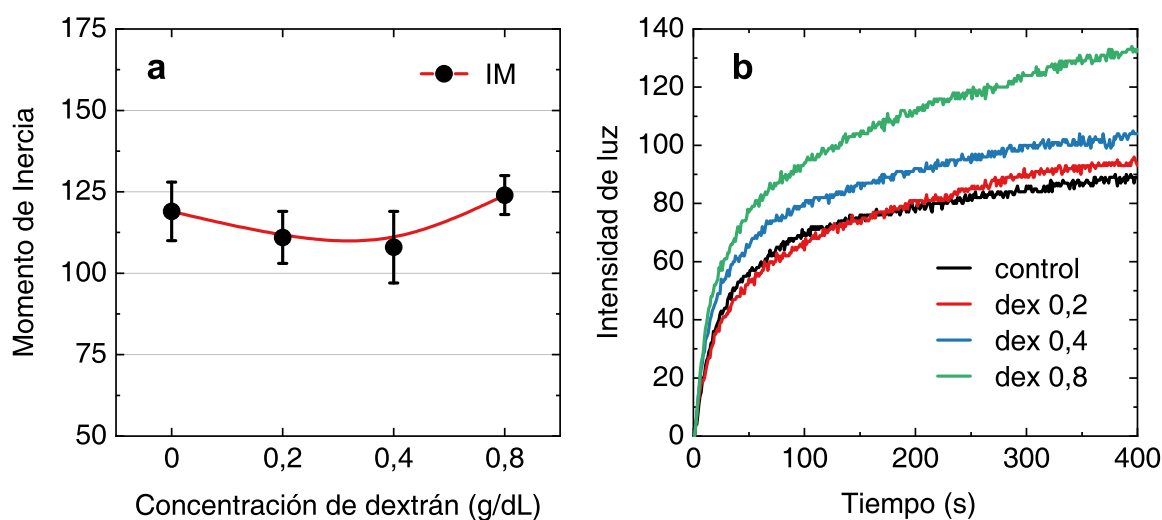
**Figura 5.18:** CC y CI para muestras de GR en plasma y con dextrán 0,2, 0,4 y 0,8 g/dL.

la Figura 5.18 (d). Por lo tanto, el CI difiere entre tipos de muestra. En cambio, las pruebas indican que el CC tiene un comportamiento similar para los dos tipos de BSL.

El IM no presenta discrepancias entre las muestras (Figura 5.19 (a)), con lo cual se infiere un comportamiento similar al FSC-BSL subjetivo. La Figura 5.19 (b) exhibe mediciones de intensidad de luz transmitida en función del tiempo realizadas con el agregómetro de chip óptico. Se observan curvas de crecimiento más acelerado y con mayor amplitud para concentraciones de dextrán creciente.

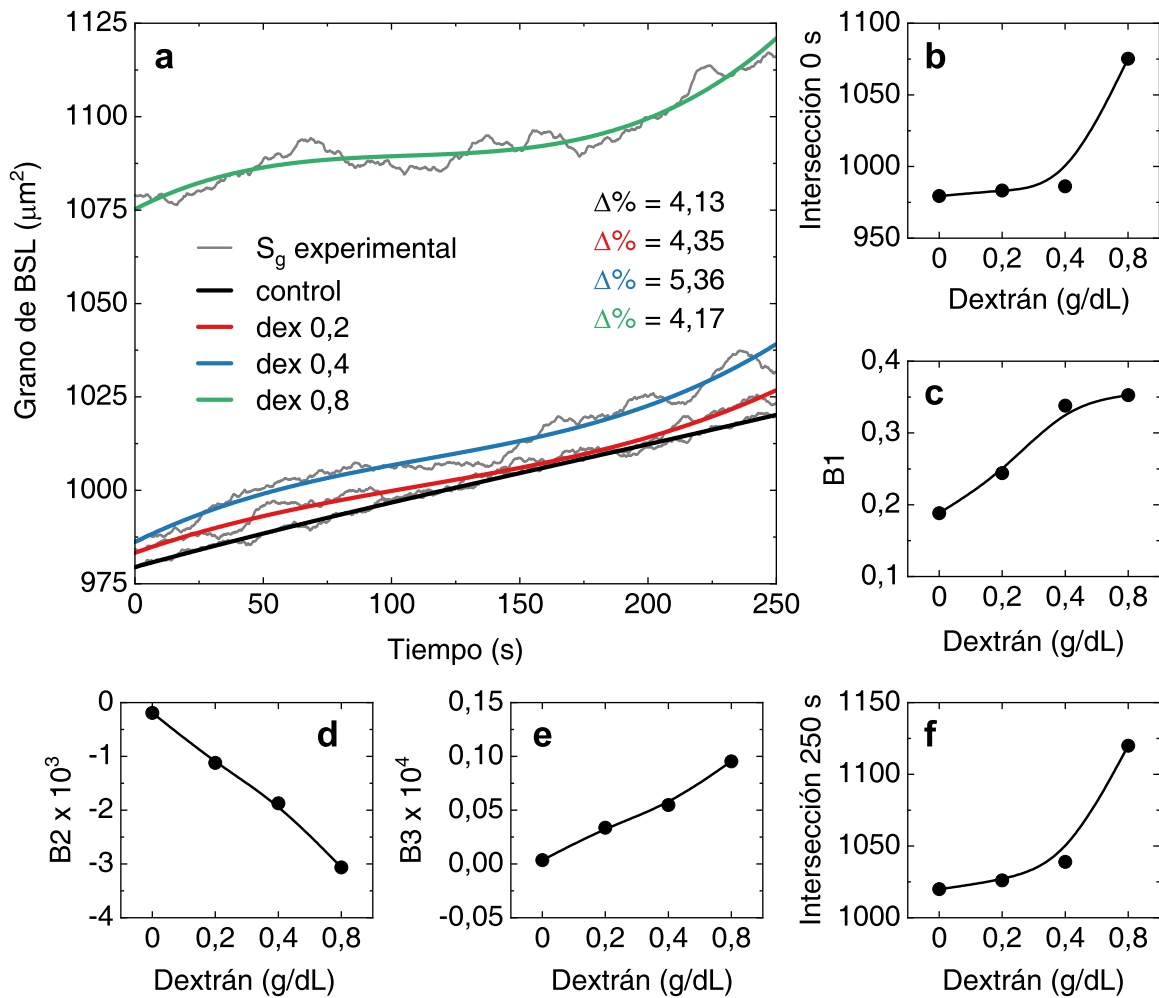
Se observaron variaciones en el tamaño de grano de BSL a lo largo del tiempo y entre distintas muestras. La Figura 5.20 (a) muestra el crecimiento del grano para cada caso, y su variación porcentual entre el inicio y el final de la medición ( $\Delta \%$ ). Los

datos experimentales se ajustaron mediante un relación cúbica dando tres coeficientes de ajuste (B1, B2 y B3), además de las intersecciones de los polinomios con los ejes correspondientes a 0 s y 250 s. Los gráficos de la Figura 5.20 (b), (c), (d) y (e) exhiben la variación de estos parámetros respecto a la concentración de dextrán. Se observan comportamientos monótonos, en su mayoría crecientes.



**Figura 5.19:** IM (a) y silectogramas (b) para muestras de GR en plasma y con dextrán 0,2, 0,4 y 0,8 g/dL.

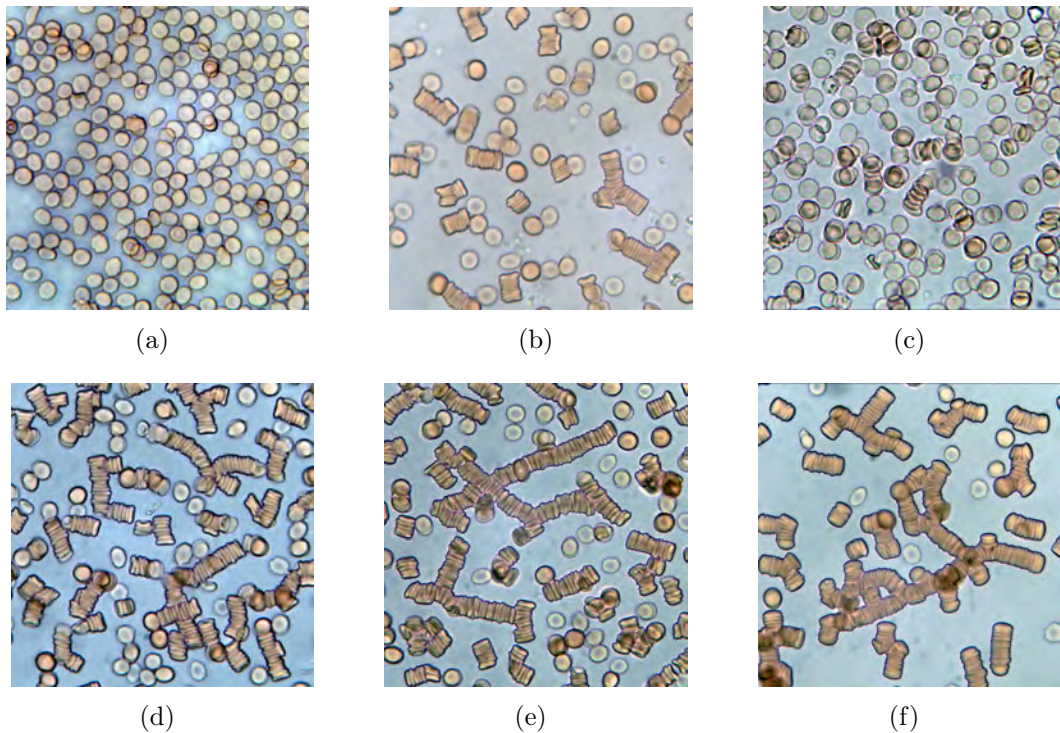
Se observa claramente un salto del valor inicial del tamaño de grano, para la concentración de dextrán correspondiente a 0,8 g/dL. Sin embargo, su evolución temporal es similar a las demás, pero con un crecimiento más pronunciado a partir de los 200 s. Esto podría deberse a la presencia de aglomerados de células que no fueron disgregados desde el comienzo de la medición debido al efecto combinado del dextrán y el fibrinógeno en la formación de los mismos.



**Figura 5.20:** Evolución temporal del tamaño de grano de BSL para muestras con plasma y dextrán, y ajuste por un polinomio de grado 3:  $Intersec0 + B1x + B2x^2 + B3x^3$  (a); variación con la concentración de dextrán de los coeficientes de ajuste polinomial: Intersec0 (b), B1 (c), B2 (d), B3 (e) y el valor del tamaño de grano al final de la medición (f).

### GR suspendidos en PBS con dextrán

La suspensión de GR en solución sin plasma permitió controlar la totalidad del proceso de agregación eritrocitaria. De esta manera, en el medio de suspensión sin dextrán se observan células aisladas (Figura 5.21 (a)). A medida que la concentración de dextrán aumenta se obtienen agregados más complejos, alcanzando aglomerados de células tal como se observa en las Figuras 5.21 (b)-(f).



**Figura 5.21:** Fotografías de GR en suspensiones de PBS (a), plasma (b), dextrán 0,2 g/dL (c), 0,4 g/dL (d) 0,6 g/dL (e) y 1,2 g/dL (f). Microscopio óptico con lente 40x, hematocrito 1,5 %.

Las evoluciones temporales de los CC calculados, presentaron mayor tiempo de decaimiento para mayor concentración de dextrán. La Figura 5.22 (a) muestra a modo de ejemplo los CC correspondientes a las muestras para el tiempo de referencia inicial de 120 s. Los CI se vieron diferenciados para cada tiempo inicial según la concentración de dextrán, como se observa en la Figura 5.22 (b).

Los experimentos demostraron que el IM es influenciado por el cambio en la dinámica celular debido a una mayor presencia de dextrán en el medio de suspensión. De esta manera, este índice indica la menor actividad acumulada de la intensidad de los píxeles durante el período registrado para 1,2 g/dL de dextrán. La Figura 5.23 (a) muestra la disminución del IM cuanto mayor es la concentración de dextrán. Las pruebas con el agregómetro de chip óptico, indican un comportamiento aproximadamente constante de la intensidad de luz transmitida para GR en PBS, según lo esperado. Las muestras

con mayor presencia de dextrán resultan en silectogramas con amplitudes mayores y crecimientos iniciales más rápidos, como se ve en la Figura 5.23 (b).

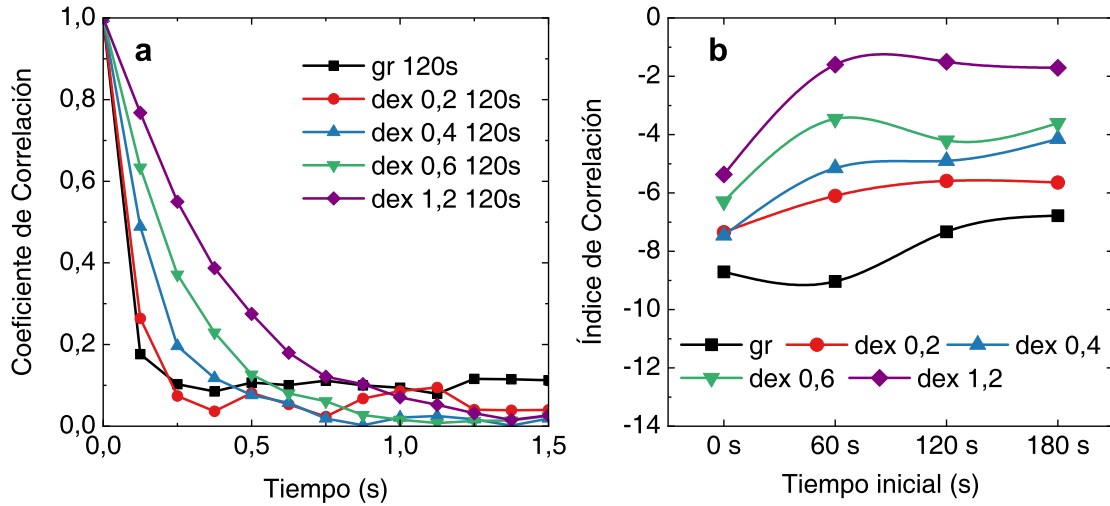


Figura 5.22: CC (a) y CI (b) para muestras de GR en PBS y con dextrán 0,2, 0,4 y 0,6 y 1,2 g/dL.

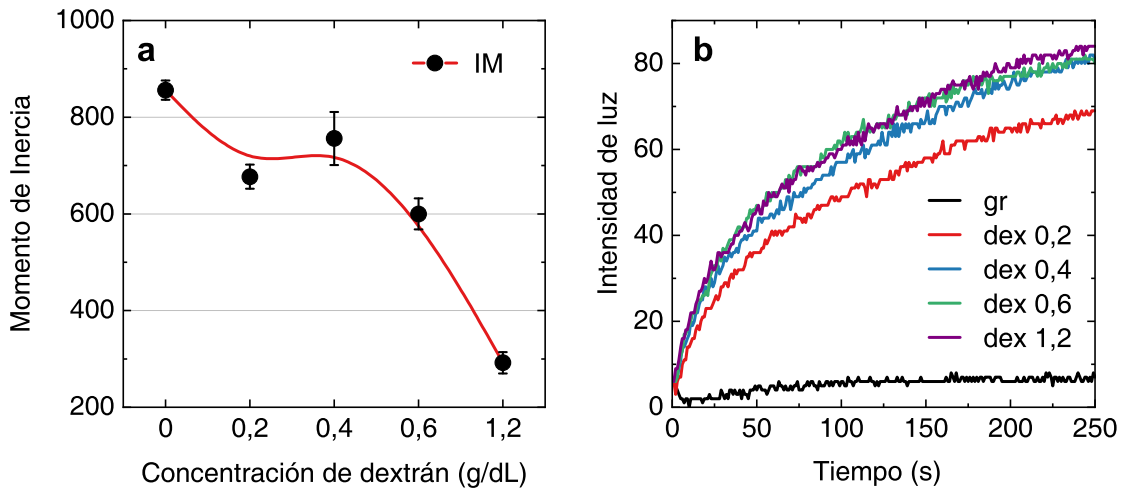
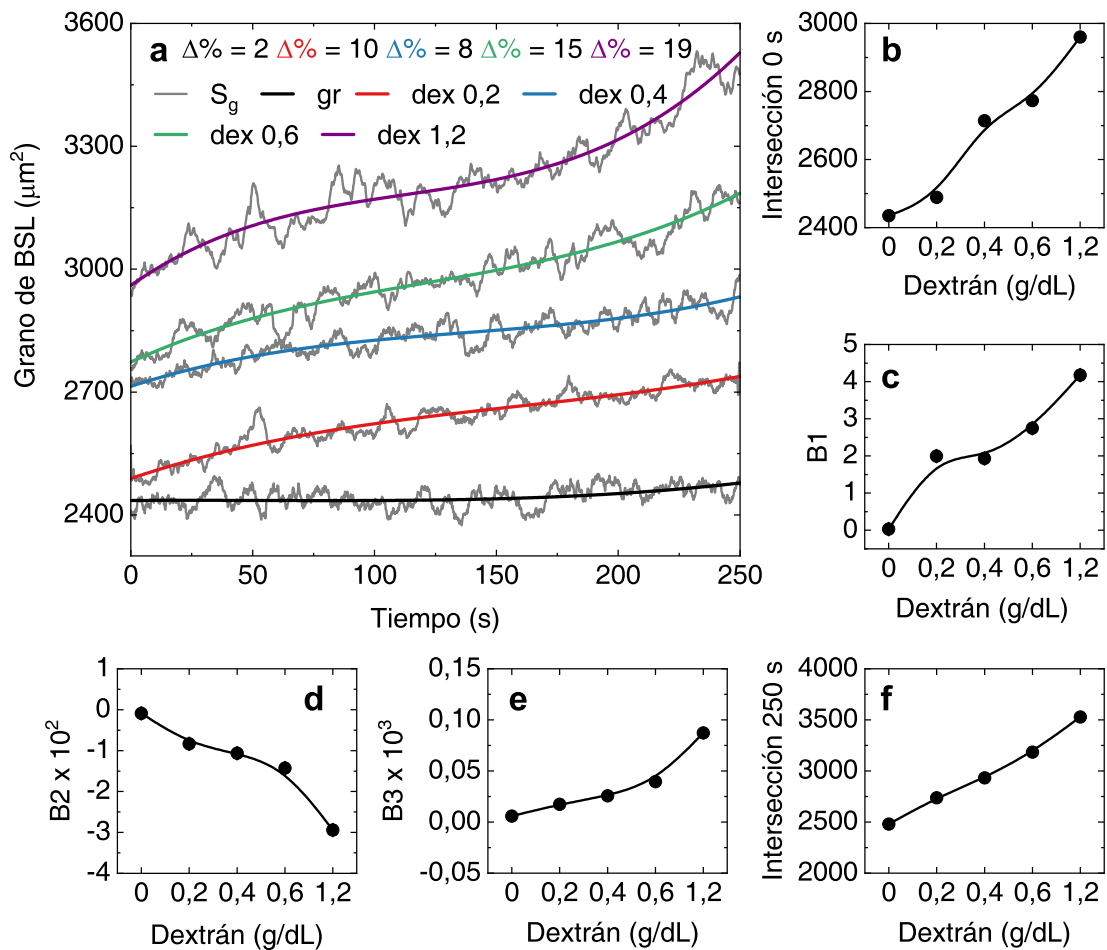


Figura 5.23: IM (a) y silectogramas (b) para muestras de GR en PBS y con dextrán 0,2, 0,4, 0,6 y 1,2 g/dL.

Los cálculos para el tamaño de grano de BSL, evidenciaron comportamientos más diferenciados que para las muestras con plasma en el medio de suspensión. La Figura 5.24 (a) muestra el crecimiento del grano para cada caso y su variación porcentual entre el inicio y el final de la medición ( $\Delta\%$ ). Se observa una marcada tendencia de

incremento en la variación de  $S_g$ , a medida que la agregación eritrocitaria aumenta por la presencia de dextrán. Los datos experimentales se ajustaron mediante un relación cúbica dando tres coeficientes ( $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$ ), además de las intersecciones de los polinomios con los ejes correspondientes a 0 s y 250 s. Los gráficos de la Figura 5.24 (b), (c), (d) y (e) muestran como estos coeficientes evolucionan de acuerdo a la muestra analizada. Los coeficientes presentan comportamientos monótonos. Se observaron saltos en el tamaño inicial del grano de BSL, siendo la intersección a 0 s creciente con la concentración de dextrán.



**Figura 5.24:** Evolución temporal del tamaño de grano de BSL para muestras con plasma y dextrán y ajuste por un polinomio de grado 3:  $Intersec0 + B_1x + B_2x^2 + B_3x^3$  (a), variación con la concentración de dextrán de los coeficientes de ajuste polinomial, Intersec0 (b),  $B_1$  (c),  $B_2$  (d),  $B_3$  (e) y el valor del tamaño de grano al final de la medición (f).

#### 5.4.4 Discusión

Los experimentos diseñados para el estudio de la agregación eritrocitaria se realizaron bajo una configuración de BSL objetivo con filtrado DWT y lente expansora para maximizar y homogeneizar el área de iluminación. El análisis de las observaciones realizadas durante los experimentos de BSL, permitirían proponer la diferenciación del concepto de *área de iluminación*, *i.e.* la superficie que ocupa el haz incidente en la muestra, y el *área iluminada*, siendo esta última la superficie efectiva sobre la que la luz incide y es desviada o absorbida dando lugar al patrón de BSL. Es importante recordar que desde el fundamento del speckle objetivo, el tamaño de grano de BSL es inversamente proporcional al área iluminada, si las demás variables del experimento permanecen constantes. En este caso, la muestra de GR es el único factor de introducción de variables, puesto que la expansión del haz es fija a lo largo de toda la medición. Entonces, las variaciones del tamaño de grano deben asociarse con variaciones del *área iluminada*, que son atribuidas a cambios en la morfología de los elementos dispersores. Así, sería posible formular un censo indirecto de la formación de estructuras particulares, como ser los *rouleaux* o los *clusters*, además de describir la dinámica temporal de dicho proceso, puesto que la resolución temporal de esta técnica puede ser superior a las fracciones del segundo.

Las muestras con plasma mostraron menor susceptibilidad a los efectos del dextrán. Sin embargo, se observaron comportamientos diferenciados a medida que se fomenta la agregación eritrocitaria. Los CI mostraron evoluciones similares a las muestras estudiadas mediante BSL subjetivo, acercándose al valor -2 a medida que la muestra disminuye su actividad por el paso del tiempo y la saturación en la formación de estructuras. Por otro lado, el CI para las muestras de GR con PBS y dextrán asumió un rango de valores más amplio. Es importante notar que la agregación eritrocitaria se estudia también en un espectro mayor, puesto que se cuenta con los casos de células

aisladas y la formación de aglomerados.

EL IM resultó casi inalterado por la concentración de dextrán para GR con plasma, lo cual reforzaría la hipótesis de su dependencia respecto al hematocrito, como ocurre para FSC-BSL subjetivo. Sin embargo, con el efecto exclusivo del dextrán se observa una marcada disminución de la actividad en la muestra para la concentración 1,2 g/dL, relacionado con una rápida formación de estructuras, menor presencia de células aisladas y la aparición temprana de la sedimentación.

Se registraron variaciones del tamaño de grano de BSL en ambos casos. El índice  $S_g$  presenta evoluciones en el tiempo más diferenciadas para las muestras de GR en PBS y dextrán. La tendencia creciente del  $S_g$  es similar entre las muestras con plasma, y los coeficientes de ajuste polinomial obedecen la misma tendencia que en el caso de PBS con dextrán. La agregación eritrocitaria controlada *in vitro* desde GR aislados y hasta la formación de aglomerados, da como resultado curvas de  $S_g$  con comportamientos crecientes más rápidos a medida que aumenta la concentración de dextrán. Esto se observa en la evolución de los coeficientes del ajuste polinomial y la variación porcentual del tamaño de grano. El salto en el valor inicial de  $S_g$  se reproduce en este caso, pero con valores distribuidos de manera más uniforme. Estas diferencias iniciales se atribuyen a la presencia de estructuras que no han sido disgregadas, y es esperable que sean más abundantes a medida que aumente el dextrán en el medio de suspensión. Para concentraciones de dextrán superiores a 1 g/dL, ocurre la formación de estructuras que requieren tensiones de corte altas para separarse, o que resulta imposible hacerlo por su condición de “cluster”.

El monitoreo del tamaño de grano de BSL contiene información tanto de la dinámica como de la morfología del elemento dispersor. Sería posible describir estados particulares de la agregación eritrocitaria mediante el parámetro  $S_g$  y objetivamente diferenciar condiciones patológicas en la sangre. De esta forma, estandarizando el dispositivo de medición, regulando variables como la distancia de la muestra al plano imagen y com-

pactando el arreglo experimental, sería posible el desarrollo de un dispositivo portátil para el estudio de la agregación eritrocitaria basado en BSL.

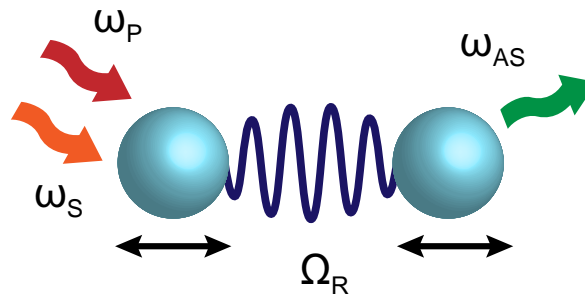
# 6. CARS: espectroscopía Raman anti-Stokes coherente

## 6.1 Introducción

Como la microscopía CARS es una herramienta reciente, se tiene poca experiencia en el estudio de sistemas celulares complejos y así como también de GR. Los lípidos tienen la capacidad de ensamblarse en una doble capa de moléculas constituyendo parte de la membrana celular como se ha explicado anteriormente. El enfoque de estos experimentos fue aplicado al estudio de la dinámica de la membrana de los GR y sus posibles cambios al interactuar con moléculas de dextrán y durante la formación de agregados eritrocitarios. Además de la especificidad espectral, la microscopía CARS presenta otro punto fuerte en las imágenes, vinculado a la propiedad de coherencia de su haz. Esta coherencia permite diferenciar las señales CARS generadas por las diversas orientaciones de los enlaces químicos presentes en la muestra. La señal CARS es máxima si el enlace químico está orientado en la dirección de polarización de los haces pump y Stokes.

Se exploraron los modos vibracionales para todo el espectro disponible buscando identificar estados resonantes particulares de estructuras, mediante la combinación de las frecuencias pump y Stokes, dando como resultado la emisión de fotones anti-Stokes como se esquematiza en la Figura 6.1.

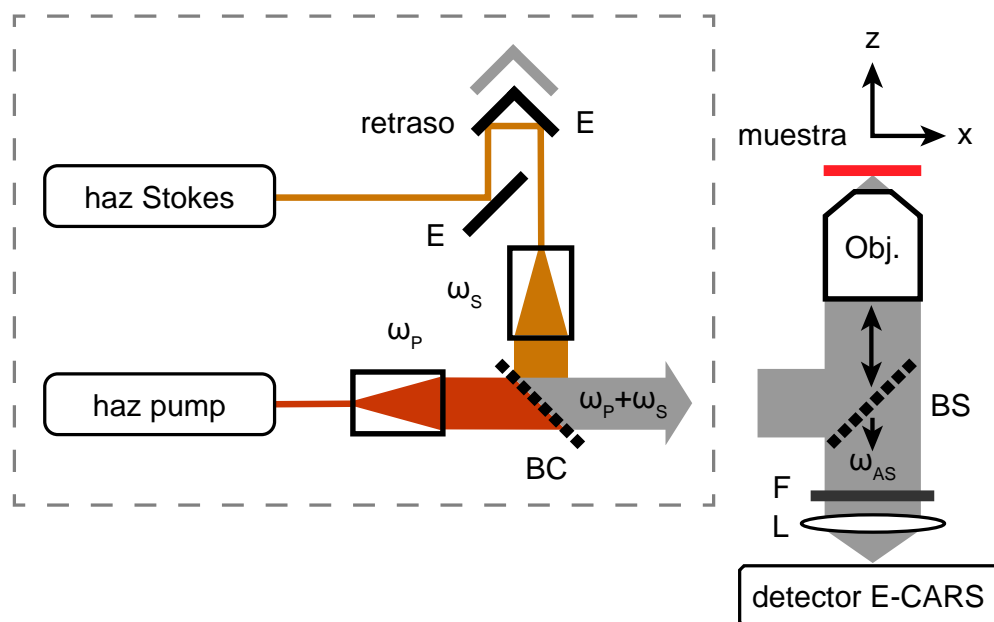
Se prepararon muestras de GR de donantes sanos en suspensiones de plasma autólogo, PBS con albúmina y concentraciones de dextrán 500 a 0,6 y 0,8 g/dL según el Apéndice A. Todas las muestras tuvieron una concentración adecuada para la obtención de imágenes de microscopía (2% de GR en el volumen de la solución). Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de GR en cámaras Lab-Tek para su observación dentro de las 24 hs de la extracción.



**Figura 6.1:** Esquema de una molécula iluminada por dos haces incidentes, pump ( $\omega_P$ ) y Stokes ( $\omega_S$ ).  $\Omega_R = \omega_P - \omega_S$  y  $\omega_{AS}$  es la emisión anti-Stokes.

## 6.2 Sistema experimental

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 CARS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), que consistía en un microscopio invertido equipado con una fuente de luz pulsada ultracorta (picoEmerald, APE, Berlín, Alemania) que producía los dos haces sincrónicos necesarios para CARS (Figura 6.2). El haz de Stokes a 1064 nm fue emitido por un láser de ortovanadato de itrio dopado con neodimio ( $\text{Nd:YVO}_4$ ), mientras que un oscilador óptico paramétrico (OPO) generó un haz de pump/probe sintonizable a 780–943 nm. El ancho del pulso fue de 5–7 ps con una frecuencia de repetición de 80 MHz correspondiente al ancho de la línea Raman de 2 a 3  $\text{cm}^{-1}$ . Los pulsos de las dos fuentes se solaparon temporal y espacialmente en el plano focal del microscopio como se muestra en la Figura 6.2.



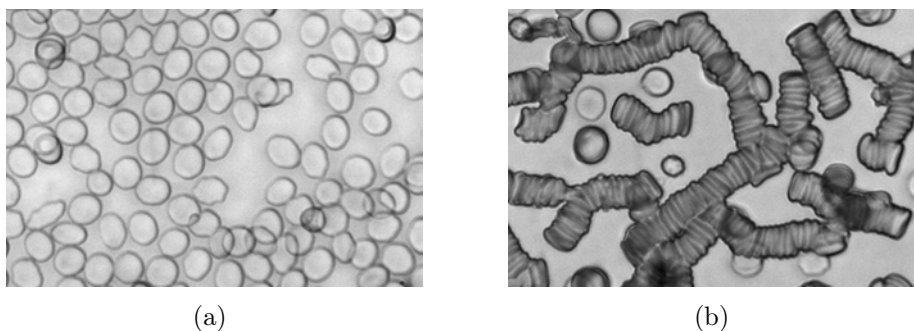
**Figura 6.2:** Esquema de la configuración de Epi-CARS con haces incidentes de co-propagación, pump ( $\omega_P$ ) y Stokes ( $\omega_S$ ).  $\omega_{AS}$  es la emisión anti-Stokes; E, espejo; Obj., lente objetivo; F, filtro; BS, beam splitter; BC, beam combiner; L, lente.

Se suministraron a los GR hasta 100 mW de potencia promedio entre los haces pump y Stokes, con una intensidad láser idéntica para cada medición. La longitud de onda generada por el láser a 817 nm se usó para la modalidad CARS, simultáneamente con el haz de Stokes a 1064 nm para excitar el modo vibracional resonante simétrico de los enlaces de hidrocarburos  $\text{CH}_2$  en los lípidos de la membrana a  $2845 \text{ cm}^{-1}$  y el de los enlaces  $\text{CH}_3$  en aminoácidos de las proteínas. Del mismo modo, se observó el rango de número de onda  $1200 \text{ cm}^{-1}$  con longitudes de onda de pump de 880-940 nm. La señal de CARS se detectó por epi iluminación utilizando un detector de tubo fotomultiplicador no discontinuado (Hybrid-PMT).

## 6.3 Resultados

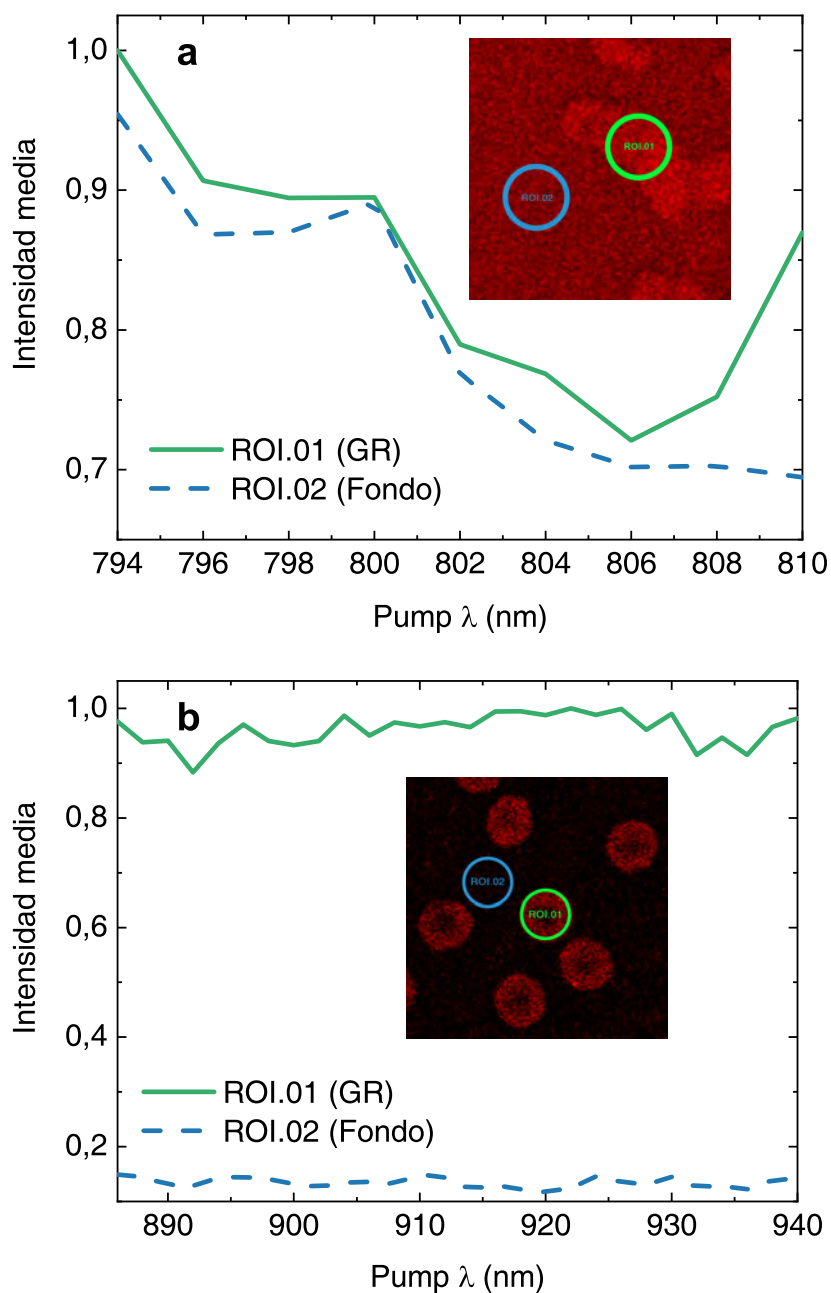
### 6.3.1 Barrido de longitudes de onda pump

La acción del dextrán produjo agregados de eritrocitos con diferentes morfologías. Las estructuras más largas y complejas se observan cuando el dextrán interactúa con la membrana celular como se muestra en la Figura 6.3 (b). Además, dispersando la muestra en la cámara de prueba es posible visualizar los GR aislados en el medio de suspensión con dextrán, para estudiar su respuesta individual.



**Figura 6.3:** GR suspendidos en PBS con albúmina (a) y con dextrán a 0,8 g/dL (b).

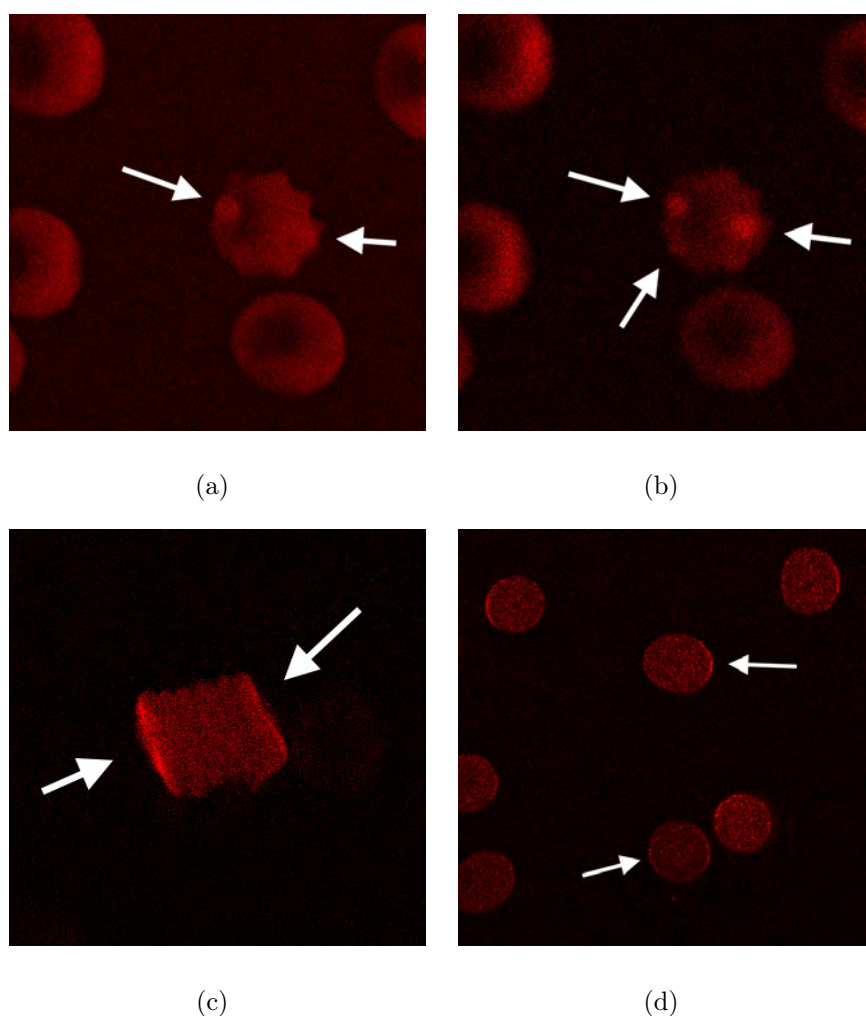
Se calculó el perfil de intensidad a lo largo de las mediciones para establecer las condiciones de referencia. La Figura 6.4 (a) representa la intensidad media en la región de células y en el fondo para un barrido de longitud de onda pump entre 794 y 810 nm, para una muestra de GR en plasma. Se pueden observar situaciones de bajo contraste debido a que los componentes del plasma producen una alta señal de fondo. Esta es una de las principales razones por las que se utilizó un medio de suspensión basado en PBS con albúmina, sustrayendo así proteínas plasmáticas y otras moléculas que pueden interferir con la señal proveniente de los GR. El perfil de intensidad también se estudió para eritrocitos aislados, eritrocitos tratados con dextrán y agregados de GR mostrando mejores situaciones de contraste, en particular para el rango de  $1200\text{ cm}^{-1}$  como se ve en la Figura 6.4 (b).



**Figura 6.4:** Perfil de intensidad de GR suspendidos en plasma para una longitudes de onda pump de 794 a 810 nm (a) y suspendidos en PBS con albúmina para longitudes de onda pump de 886 a 940 nm (b).

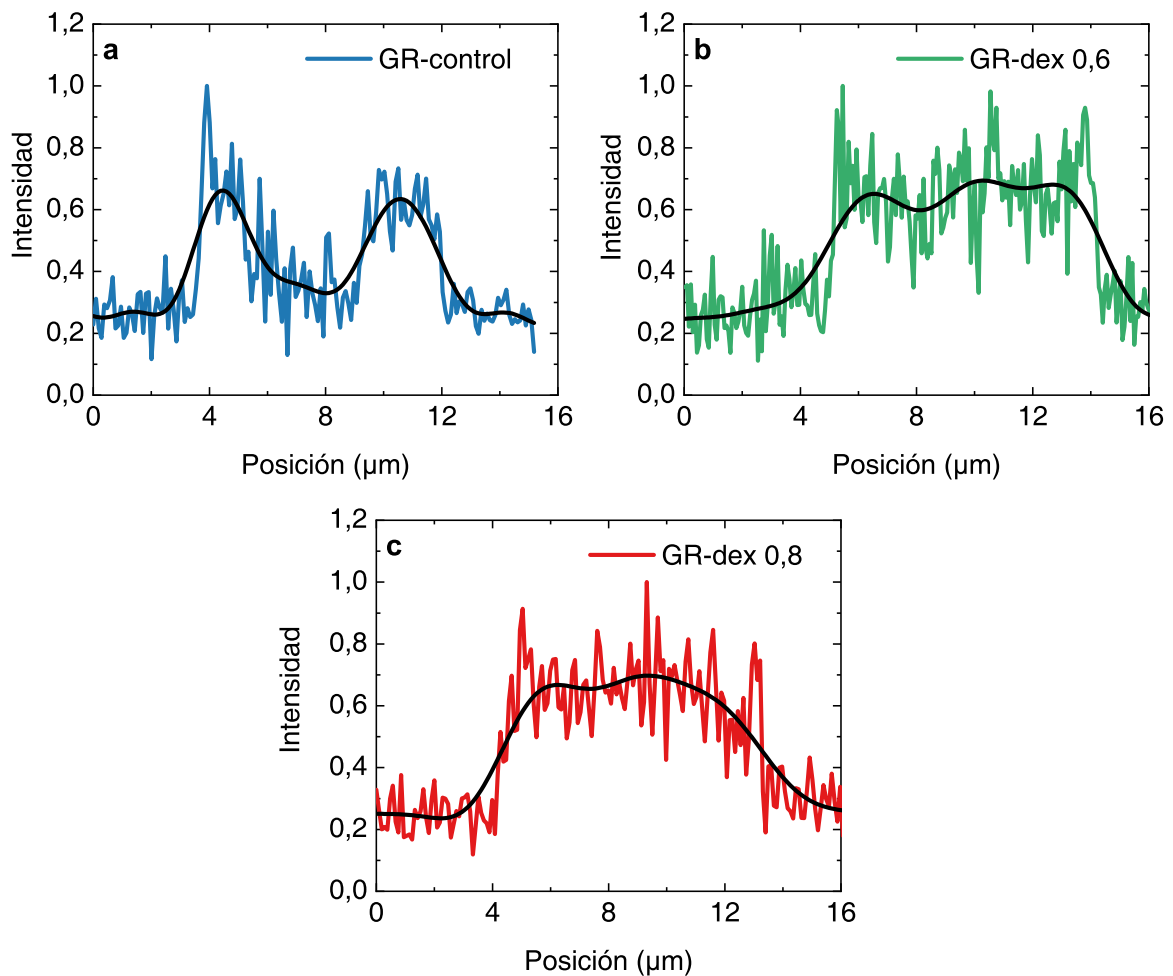
La Figura 6.5 muestra imágenes de GR para los modos vibracionales de  $2845\text{ cm}^{-1}$  y  $1460\text{ cm}^{-1}$ . Se observan distintos detalles para la misma célula, (Figura 6.5 (a) y (b)). En la Figura 6.5 (c) se observa un *rouleaux* de pocos GR formado en solución

de dextrán 0,6 g/dL, que presenta mayor intensidad de señal en las caras externas donde los puntos de vínculo en la membrana no están completamente ocupados, según la formulación de la teoría de *bridging*. Esto ocurre para modos vibracionales alrededor del número de onda  $2845\text{ cm}^{-1}$ . Los GR aislados en suspensión con dextrán, presentan contornos con intensidad diferenciada en el modo asociado a  $1660\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde al enlace C=O del compuesto de los ácidos carboxílicos.



**Figura 6.5:** GR iluminados con una longitud de onda pump de 817 nm (a) y una longitud de onda pump de 921 nm (b); *Rouleaux* en solución de dextrán a 0,6 g/dL para una longitud de onda de pump de 817 nm (c); GR aislados en suspensión de dextrán para 904 nm de pump (d).

Para analizar la morfología celular en diferentes medios de suspensión, se calculó el perfil de intensidad a lo largo de una línea, lo cual puede interpretarse como una sección transversal de la célula. En la Figura 6.6 se ve que la forma bicóncava típica de los GR está alterada por el dextrán. Esto podría atribuirse a una reorganización de las estructuras de la membrana y por lo tanto, a variaciones de las energías de deformación del citoesqueleto del eritrocito.



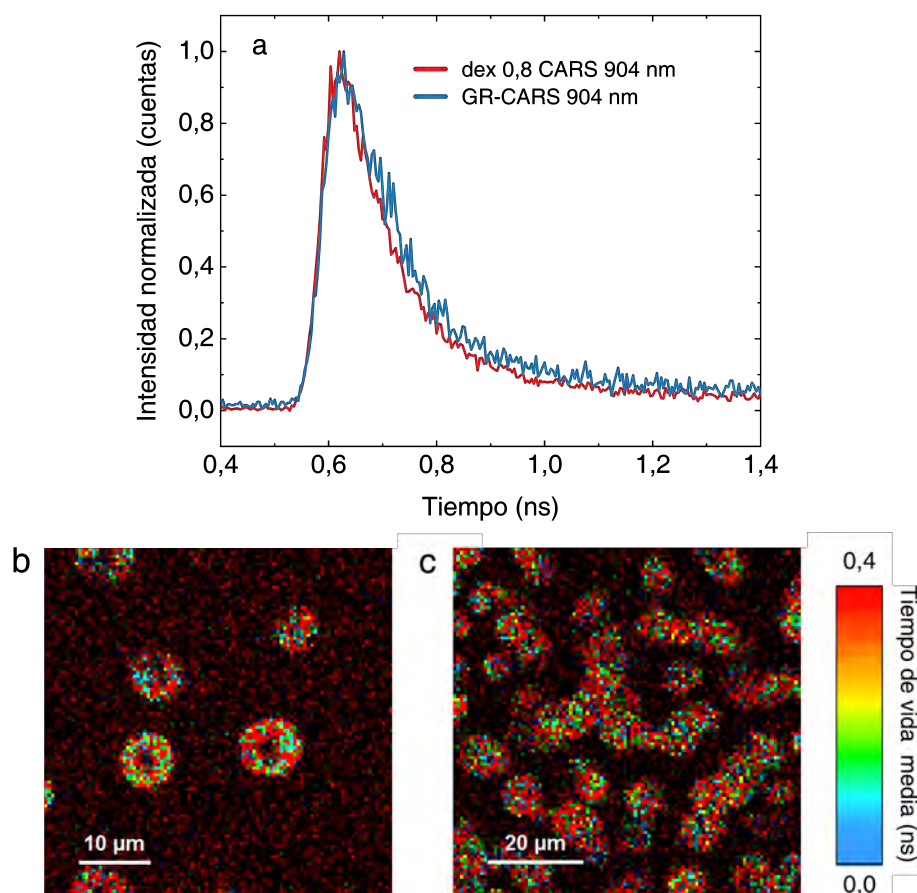
**Figura 6.6:** Perfil de intensidad en una línea a una longitud de onda pump de 817 nm para un eritrocito suspendido en PBS (a), dextrán 0,6 g/dL (b) y dextrán 0,8 g/dL (c).

### 6.3.2 Análisis FLIM de la señal CARS

Con el objetivo de identificar el tipo de emisión colectada durante los experimentos, se aplicó el análisis de *fluorescence lifetime imaging* (FLIM). El análisis FLIM es de común aplicación en la microscopía de fluorescencia. La vida media de la fluorescencia se define como el tiempo que el emisor permanece en el estado excitado antes de regresar al estado fundamental. El objetivo de este análisis es registrar efectivamente la presencia del fenómeno de emisión coherente.

Se utilizó una estación FLIM con una placa de adquisición PicoQuant TCSPC capaz de medir el tiempo de vida media de los fotones emitidos en las señales para su posterior análisis. Típicamente, un perfil de dispersión Raman anti-Stokes coherente corresponde a tiempos de emisión de alrededor de 0,4 ns. El recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) mide el tiempo entre la excitación de la muestra y la llegada del fotón emitido al detector, en referencia con el pulso láser. Con la excitación periódica, es posible extender la recopilación de datos a través de múltiples ciclos de excitación y emisión. Así se reconstruye el perfil de emisión a partir de una gran cantidad de eventos únicos de fotones recolectados durante muchos ciclos.

El perfil de emisión de GR control y con dextrán 0,8 g/dL se ilustra en la Figura 6.7 (a). Se puede notar un pico fuerte de 0,2-0,3 ns de ancho y decaimiento de fluorescencia combinado en el proceso. Las Figuras 6.7 (b) y (c) muestran la distribución espacial de los eventos de distinta duración para los GR aislados en PBS y suspendidos en PBS con dextrán 0,8 g/dL formando *rouleaux*. Se observan las distribuciones de píxeles amarillos, verdes y azulados que corresponden, según la escala de color, a tiempos de vida medios inferiores a 0,4 ns, indicando la presencia de la señal anti-Stokes coherente.



**Figura 6.7:** Distribuciones FLIM para GR aislados y formando *rouleaux* debidos a dextrán en concentración 0,8 g/dL. La longitud de onda pump fue 904 nm correspondiente al número de onda Raman  $1660\text{ cm}^{-1}$  (a). Distribución espacial de los tiempos de emisión para GR aislados (b) y *rouleaux* (c).

## 6.4 Discusión

En este capítulo se estudiaron mediante CARS posibles cambios en la estructura de la membrana de los GR, en particular los relacionados con la adhesión de las células y los efectos del dextrán. La utilización de plasma como medio de suspensión produce imágenes de pobre contraste particularmente en la gama de  $2000\text{ cm}^{-1}$ . La señal CARS para pump de 817 nm también recibe contribuciones de la hemoglobina que está presente en el interior de los GR, con lo que la información en este rango cuenta con

una adición de una señal de fondo dentro del área de interés de la célula. Teniendo en cuenta que el barrido generador de la imagen es el tradicional de un microscopio confocal, se observó que la larga exposición puede dañar los GR, particularmente debido a la excitación del átomo de hierro central de la hemoproteína. Esto puede ocurrir por la inducción de un estado de resonancia prolongado o por la incidencia térmica. Este es un factor a tener en cuenta, si bien no existe foto-blanqueo, la energía térmica generada por el barrido prolongado del láser es nociva para el espécimen. Durante los experimentos con potencias menores a 100 mW no se observó daño biológico y se encontró total degradación de la muestra para potencias superiores 1000 mW.

Se observaron puntos de diferente intensidad de señal para distintas longitudes de onda pump. De manera cualitativa, los experimentos indican que el dextrán interactúa con la membrana del eritrocito en concordancia con la proposición del modelo de *bridging*. Además, la morfología de las células se ve alterada probablemente por una reorientación de las estructuras de proteínas de membrana debido a la adhesión del dextrán. El análisis de imágenes en los registros de FLIM permitió obtener una referencia espacial de la ocurrencia de los eventos asociados a una señal CARS corroborando la existencia del fenómeno.

### **III**

## **Conclusiones generales y perspectivas futuras**

## 7. Conclusiones

La agregación eritrocitaria es el factor más importante que afecta la viscosidad sanguínea a bajas velocidades de flujo, y refleja un delicado balance entre las fuerzas de adhesión celular (debidas a la adsorción de macromoléculas y a la creación de puentes entre los eritrocitos) y el efecto de las fuerzas de desagregación (esfuerzos de corte mecánico, repulsión electrostática entre las células, etc.). Esta interacción célula-célula es considerada de vital importancia en la microcirculación, particularmente en el estudio y diagnóstico en patologías vasculares.

En esta tesis se investigó el proceso de interacción entre eritrocitos humanos, sus principales componentes biológicos y sus variables físicas, para evaluar y caracterizar el proceso de agregación mediante técnicas ópticas. Se utilizaron muestras de sangre normal y alteradas *in vitro* a partir de dos enfoques: la modificación del medio en el cual se desarrolla la agregación de GR y la alteración de las características de la membrana de los GR.

Mediante un análisis del fenómeno de agregación de GR y de sus variables (hematocrito, carga eléctrica superficial eritrocitaria, contenido de proteínas plasmáticas, etc.), se desarrolló un dispositivo basado en la transmisión de luz que brinda información para la evaluación de alteraciones de la agregación eritrocitaria. El concepto de un chip descartable implica la reducción de costos de mantenimiento, y posibilita un procedimiento de trabajo sistemático y estandarizado. Se definieron índices sensibles a factores que se manifiestan en patologías vasculares, afecciones inducidas por pará-

sitos y durante el uso de agentes anestésicos. Los estudios experimentales permitieron la concreción de un prototipo de agregómetro de chip portátil de bajo costo con una aplicación directa en el ámbito clínico.

El desarrollo de una técnica basada en biospeckle láser permitió la extensión del análisis a aspectos de la agregación eritrocitaria no detectados por la técnica de transmisión de luz. Se utilizó dextrán 500 como un promotor estandarizado de agregación de GR y de gran aplicación en los trabajos relacionados con el tema. Fue posible obtener dos tipos de imágenes de BSL de una configuración experimental de tipo subjetiva y mediante otro arreglo, señales de BSL objetivo. Es posible proponer que la información de la actividad del medio de suspensión está contenida en el ancho de banda de alta frecuencia de los datos obtenidos por FSC-BSL, mediante la aplicación de filtros DWT y el posterior análisis de los descriptores dinámicos CC e IM. En particular el IM se propone como un indicador del hematocrito para la configuración subjetiva. Por otro lado, el FSC-BSL objetivo contiene información adicional sobre el cambio de morfología de los elementos dispersores por medio del parámetro  $S_g$ . Los resultados indican que la técnica de BSL tiene potencial aplicación para el desarrollo de dispositivos de análisis hemorreológicos específicos, siendo también posible su extensión al análisis de motilidad celular y coagulación. Se espera que estos estudios contribuyan al desarrollo de técnicas no invasivas basadas en BSL para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de patologías con alteraciones microcirculatorias.

La aplicación de la técnica de CARS en Física Biomédica es muy prometedora y aún no existe gran variedad de desarrollos en el campo de la dinámica eritrocitaria. La microscopía CARS es una técnica reciente, basada en un efecto físico no lineal de la luz que permite especificidad química frente a las microscopías ópticas convencionales, sin la degradación del espécimen. Fue posible estudiar el efecto del dextrán en los GR y de manera cualitativa observar características propuestas por el modelo de *bridging* para la agregación eritrocitaria. El proceso de agregación de glóbulos rojos no está

aún completamente aclarado y la aplicación de nuevas tecnologías basadas en luz y sin marcaje como CARS, propone enfoques novedosos. Analizar la respuesta de los glóbulos rojos a diferentes entornos y caracterizar el fenómeno de adhesión permitirá contribuir al desarrollo de herramientas para el diagnóstico y tratamiento de patologías vasculares, donde la microcirculación juega un papel fundamental.

Los objetivos planteados en el marco de esta tesis fueron cumplidos, habiendo implementado el desarrollo de técnicas ópticas al estudio de la interacción de componentes de la sangre mediante la definición de parámetros característicos. Además, al estudiar este fenómeno mediante las técnicas novedosas BSL y CARS se incursiona en la premisa del desarrollo de herramientas no invasivas basadas en fuentes de luz. Estas descripciones posibilitarían la asociación de los mencionados parámetros a patologías vasculares, (principalmente que implican obstrucciones en la microcirculación), que presentan similares características respecto a las condiciones generadas *in vitro* en este trabajo.

# **IV**

## **Apéndices**

## **A. Materiales Biológicos**

Los experimentos presentados a lo largo de la tesis, comparten varios aspectos de la preparación de muestras que se detallan a continuación. En todos los ensayos experimentales se utilizaron muestras de sangre humana cumplimentando con las respectivas normas de Bioseguridad del IFIR (CONICET-UNR). Las experiencias fueron realizadas para analizar las características de la dinámica eritrocitaria, y para ello, los glóbulos rojos fueron separados por centrifugación y posteriormente alterados por distintos métodos. Además, se realizaron ensayos con alteraciones del medio de suspensión para analizar el efecto de las mismas en la dinámica de la interacción eritrocitaria.

### **A.1 Muestras de sangre**

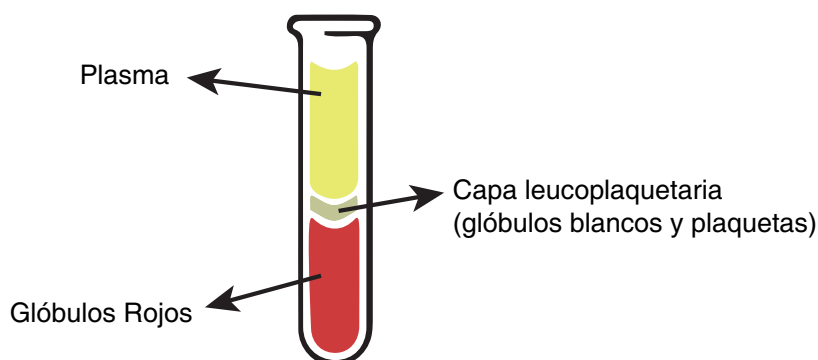
Las muestras biológicas fueron extraídas y procesadas en el Área Química Analítica Clínica de la FCByF (UNR), dirigida por la Dra. Mabel D'Arrigo, integrante del Grupo de Física Biomédica del IFIR. Las muestras se extrajeron, procesaron y almacenaron de acuerdo con las normas de Bioética y Seguridad establecidas en la FCByF (UNR) y siguiendo las recomendaciones internacionales para estudios hemorreológicos [Baskurt et al., 2009a].

Se utilizaron muestras de sangre periférica de donadores voluntarios sanos que firmaron un consentimiento escrito informado para participar en este trabajo (Apéndice B). La sangre fue extraída por punción venosa y anticoagulada con ácido etilendiaminote-

traacético (EDTA). Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su utilización dentro de las 24 horas de extraídas.

## A.2 Muestras de glóbulos rojos

Los GR se obtuvieron a partir de sangre entera por centrifugación a 2500 rpm (Paralwall Model PWL 12T) durante 5 minutos a 25°C. La sangre *in vitro* se separa en tres partes después de la sedimentación debido a diferencias de densidad: plasma, capa leucoplaquetaria (contiene plaquetas y glóbulos blancos) y glóbulos rojos como se muestra en la Figura A.1. La fase de plasma se separó mediante pipeta automática de volumen variable (Boeco; 1000  $\mu$ L) y fue reservado a 4°C para su posterior utilización. Se descartó la capa leucoplaquetaria y el paquete globular fue lavado 3 veces con solución fisiológica (SF)<sup>1</sup>. Los GR lavados fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.



**Figura A.1:** La sedimentación de sangre *in vitro* conduce a una separación entre plasma, contenido leucoplaquetario y glóbulos rojos.

## A.3 Preparación general de muestras

Como se mencionó anteriormente, el hematocrito es el porcentaje del volumen total de sangre que está compuesta por glóbulos rojos. Para las distintas etapas de trabajo se

<sup>1</sup>La solución fisiológica es una disolución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos (pH 7,4 - 300 mOsm/L). Está compuesta de agua y electrolitos (NaCl 0,9%).

prepararon suspensiones de GR a diferentes hematocritos. Generalmente se estandariza el uso de un hematocrito del 40 % para replicar las condiciones fisiológicas.

#### **A.4 Tratamiento con tripsina**

Para el tratamiento enzimático de cada muestra de sangre de dadores sanos y la preparación del correspondiente control se procedió de la siguiente manera:

1. Someter 3 tubos al tratamiento con soluciones de tripsina de a las siguientes concentraciones: 1; 2 y 2,5 mg/mL (se utiliza este rango de concentraciones debido a que no producen la rotura de las células y se logra el efecto deseado sobre la superficie del eritrocito).
2. Incubar volúmenes iguales de solución de tripsina y coulot de GR durante 20 minutos a 37°C.
3. Reservar el 4<sup>o</sup> tubo como control sin tratar: volúmenes iguales de SF y coulot de GR.
4. Luego de la incubación, lavar los GR 3 veces con SF.
5. Resuspender los GR en plasma autólogo al 40 % de hematocrito.

#### **A.5 Alteración del contenido de proteínas plasmáticas**

Para la dilución del plasma y preparación de cada muestra de sangre:

1. Preparar solución de albúmina humana (Sigma, A9511-10G Lot# 107K7560V) con SF a concentración del 2 % o superior.
2. Preparar tubos con concentraciones de plasma/solución de albúmina al 0 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %.

3. Resuspender los GR en las soluciones de plasma al 40 % de hematocrito.

## A.6 Agentes anestésicos

1. Preparar tubos con 2 mL de solución fisiológica (SF) con 2 mL SE (control) o con el agregado del anestésico junto con la SF (tratado).
2. Incubar en estufa a 37°C durante 30 minutos, con agitación constante.
3. Para *Remifentanilo* agregar la droga sin diluir a los 15 minutos de incubación.
4. Lavar las muestras ya incubadas 3 veces con SF centrifugando 5 minutos a 2500 rpm para detener la acción del anestésico.

## A.7 Incubación con parásitos

Este estudio fue realizado en colaboración con el proyecto de la Dra. Patricia Ponce de León y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (Res. N° 1072/2014)

Larvas recién nacidas de *Trichinella spiralis* (LRN) se obtuvieron de ratones CBi infectados con *T. spiralis*, que fueron proporcionados por el centro de investigación animal del Instituto de Genética Experimental (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario). CBi es una cepa de ratón endogámica generado para ser utilizado como una población base de amplia base genética y como la línea de control de un experimento de selección artificial de conformación corporal. Entre 6 y 13 días después de la infección, se obtuvieron hembras grávidas mediante cirugía del intestino delgado de ratones. Las hembras se incubaron en 100 µL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino y antibióticos durante 18 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Las LRN se separaron posteriormente de las hembras

adultas y se recogieron en solución salina. Los concentrados de larvas se prepararon a las 24 horas, dando como resultado  $(3000 \pm 500)$  larvas/ml.

El tratamiento consistió en incubar 100  $\mu$ L de GR con un volumen igual de concentrado de LRN. Los eritrocitos de control se incubaron de la misma manera solo con solución salina. Los GR tratados y de control se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se tomaron alícuotas de cada muestra en el instante inicial, 60 y 120 minutos. Luego, los glóbulos rojos de cada alícuota se lavaron en SF y se volvieron a suspender en plasma autólogo.

## **A.8 Tratamiento con dextrán**

Se preparó un medio de suspensión (MS) para reemplazar el plasma autólogo mezclando PBS, EDTA (0,056 %) y albúmina (BSA Sigma) a 0,5 %. En particular, la albúmina es necesaria para prevenir el efecto del vidrio sobre los glóbulos rojos y para mantener la integridad de las células. Para inducir la formación de agregados de eritrocitos, se utilizó dextrán 500 (500 kDa de peso molecular). Se preparó una solución principal de dextrán al 10 % en PBS y se mezcló con el MS para constituir soluciones de dextrán a 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,2 g/dL. Posteriormente, se prepararon suspensiones de glóbulos rojos en estos medios de dextrán junto con un control sin dextrán. Además, se realizó una preparación con plasma autólogo.

## **B. Nota modelo de consentimiento informado del donante**

### **Boletín Informativo**

Se lo invita a participar del proyecto de tesis *“Estudio y evaluación de técnicas ópticas para la caracterización y modelización de interacciones entre componentes sanguíneos.”* ejecutado por el Lic. Martín Toderi bajo la dirección de la Dra. Bibiana Riquelme que se lleva a cabo en la Facultad de Cs. Exactas, Ingeniería y Agrimensura de la Universidad Nacional de Rosario y el Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR). Si usted acepta participar en este estudio, su muestra de sangre será empleada en los estudios para realizar las experiencias pertinentes. El uso de dicha muestra no implica ningún riesgo ni efecto adverso para usted. En caso de sobrar algo de su muestra de sangre donada, le garantizamos que no se realizará ningún otro estudio que el informado más arriba. Además, todos los datos obtenidos del estudio serán confidencialmente guardados y su nombre no será revelado ante persona alguna ajena a la investigación.

Director del proyecto

Lugar y fecha

## Consentimiento Informado

Por la presente, afirmo haber sido debidamente informado sobre los objetivos del proyecto “*Estudio y evaluación de técnicas ópticas para la caracterización y modelización de interacciones entre componentes sanguíneos.*”, ejecutado por el Lic. Martín Toderi bajo la dirección de la Dra. Bibiana Riquelme que se lleva a cabo en la Facultad de Cs.Exactas, Ingeniería y Agrimensura (UNR) y el Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR).

He podido realizar preguntas sobre dicho proyecto, las cuales fueron respondidas con claridad.

Por lo tanto, autorizo a que mi muestra de sangre sea utilizada exclusivamente para dichos objetivos.

Firma y aclaración del donante:

DNI:

Firma y aclaración del testigo:

DNI:

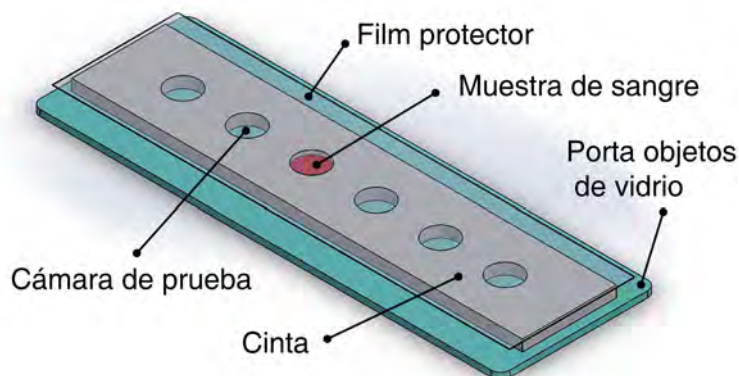
## C. Detalles experimentales

### C.1 Chip óptico

Inicialmente, la base del chip era un portaobjeto común de vidrio de  $75 \times 25 \text{ mm}^2$  y 1 mm de espesor. Por sobre el vidrio se colocó un trozo de cinta doble faz de material plástico y con espesor de 1,8 mm. En esta cinta se calaron las cámaras de contención de las muestras. Estos receptáculos eran de forma cilíndrica con un diámetro de 5 mm y por consiguiente un volumen total de  $(35,3 \pm 0,1) \mu\text{L}$ . Se realizaron numerosos ensayos respecto a la manera de inyectar la sangre en las cavidades, y al volumen de llenado de la cámara. Es así que, diversos canales de entrada de sangre y salida de aire se probaron, variando las dimensiones de los mismos.

Se concluyó que la forma óptima consistía en colocar la muestra desagregada mediante micropipetas (esto a su vez actúa como mecanismo de desagregación) por la parte superior. Inmediatamente por encima de la cinta se colocó un film transparente que tenía por función el resguardo de la muestra (evitar posible contaminación, deshidratación de los glóbulos, etc.). La Figura C.1 muestra el esquema del primer chip optimizado.

El efecto vidrio es un fenómeno por el cual los eritrocitos se alteran al adherirse a la superficie del vidrio [Eriksson, 1990; Wong, 2005]. Este efecto se observa cuando los GR están en un medio sin las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. En la práctica, el efecto de crenación puede mitigarse suspendiendo los eritrocitos en solución



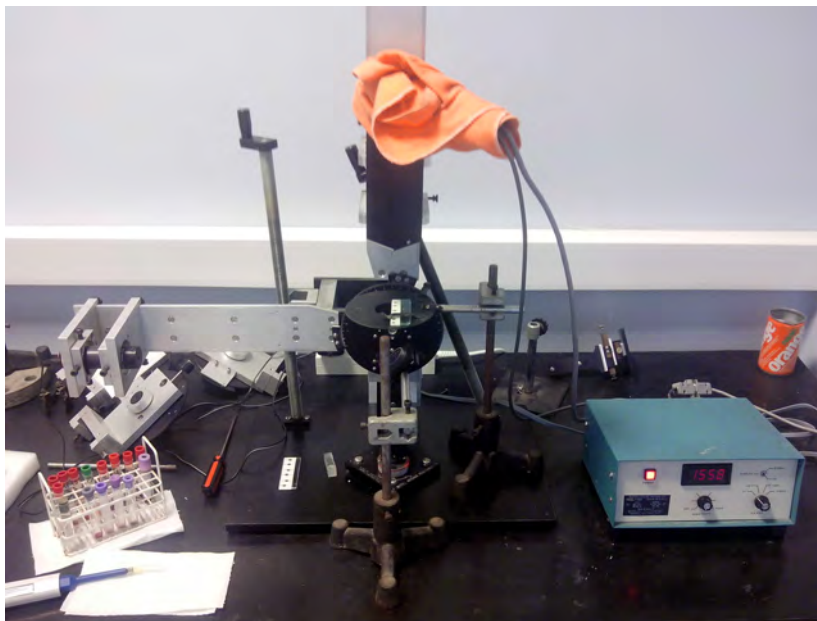
**Figura C.1:** Esquema de un chip óptico sin canales de entrada ni salida, la muestra desagregada se inyecta mediante micropipetas por la parte superior, inmediatamente se coloca el film protector encima y se comienza la medición.

fisiológica (SF) o buffer fosfato salino (pH de 7,4; osmolaridad de 280-295 mOsm/kg) con albúmina en concentraciones similares a las encontradas en plasma [Londero et al., 2016].

En un dispositivo biotecnológico, y más aún de aplicación en el ámbito clínico, el fácil descarte de los elementos contaminados es una característica fundamental. A lo largo de los ensayos, se rediseñó el chip porta muestra para ser constituido por una base de acrílico en lugar de vidrio y la cámara de prueba fue impresa en material ácido poliláctico (PLA) con una impresora 3D, teniendo un diámetro de 5 mm y una altura de 0,5 mm. Luego, ambas partes se fusionaron con cloruro de metileno (Figura 4.2). De esta manera, se evitaron posibles fugas y se obtuvo un elemento de fácil uso, bajo costo, que no supone impedimentos para su fabricación masiva y, principalmente, descartable. Luego de los experimentos que se muestran en la sección C.3, el volumen de muestra de trabajo se fijó en 15  $\mu$ L.

## C.2 Sistema experimental para transmisión de luz

La unidad de control del elipsómetro cuenta con un visor LED que muestra la intensidad de luz medida en tiempo real, selector de escala (1x, 10x, 100x y 1000x), ajuste de sensibilidad y selector de voltaje de trabajo, como se ve en la Figura C.2. La información del display es transmitida a través de un puerto serie a una computadora, y luego es registrada por un software de adquisición específico, que confecciona una tabla de intensidad de luz versus tiempo transcurrido.



**Figura C.2:** Fotografía del sistema experimental utilizado.

Para dar inicio al proceso de medición se comenzó por encender el sistema del elipsómetro y la unidad de control, a fin de que el láser alcance su punto de estabilidad, (aproximadamente diez minutos). Se contó con un estabilizador de corriente para reducir posibles ruidos en la intensidad de luz. Posteriormente se alinearon los brazos del láser y del fotomultiplicador, para que mediante un espejo a  $45^\circ$  respecto de la horizontal, se obtenga el máximo de intensidad posible (sin atravesar ningún obstáculo). Esto es, que cubriera la mayor área posible del sensor del fotomultiplicador con la luz

láser. Como paso siguiente se colocó el chip en el soporte, entre el fotomultiplicador y el espejo, haciendo coincidir el paso del haz con una de las cámaras de prueba.

Al momento de efectuar las mediciones, el modo a proceder es el mismo independientemente del tipo de muestra que se utilice. Primero se comenzó por agitar el fluido suavemente sin producir choques violentos de los glóbulos contra las paredes del tubo, ni realizar inversiones de la muestra a fin de salvaguardar de la mejor manera la integridad de los GR. Esta agitación tuvo como objetivo desagregar en primera instancia los GR que se encontraban en estasis, la acción se mantuvo por aproximadamente un minuto. Luego, mediante una pipeta automática de volumen variable Boeco ( $50 \mu\text{L}$ ) con precisión  $0,5 \mu\text{L}$ , se separó el volumen necesario para la prueba. Más adelante, en la sección C.3 se muestran estudios realizados respecto al volumen óptimo de muestra a utilizar, que resultó de  $15 \mu\text{L}$ . Se activó el registro de datos en la computadora e inmediatamente se inyectó la muestra en el chip. Este proceso actuó como mecanismo de desagregación también debido al pequeño diámetro de la punta de la pipeta. A los pocos segundos, se colocó el film protector ajustando el selector de escala en su máximo ( $\times 1000$ ) y se aisló de cualquier fuente de luz externa la habitación en la cual se encontraba el sistema láser.

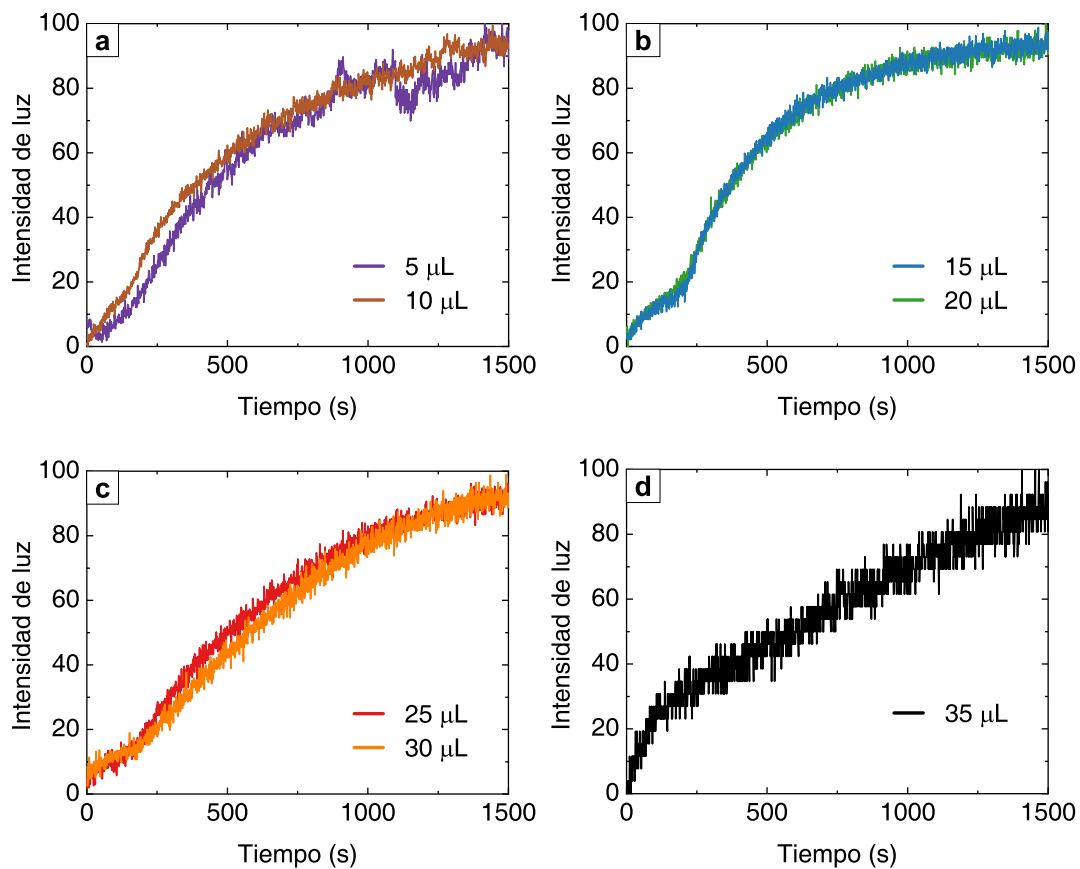
Al inyectar la sangre, la transmisión de luz fue drásticamente reducida, lo que hizo necesario aumentar la apreciación del aparato para notar las variaciones en intensidad buscadas. Entre que se activa la medición y finalmente se aísla el sistema existió un lapso de alrededor de 5 segundos que es descartado en las tablas confeccionadas. Se dejó evolucionar la muestra por 25 minutos y se obtuvo una tabla de dos columnas, registrando intensidad de luz y tiempo transcurrido. Posteriormente esta tabla de datos se sometió a un procesamiento con programas escritos en lenguaje C, que remueven los datos innecesarios y la normalizan de acuerdo a sus valores máximos y mínimos, para ser utilizada en los cálculos pertinentes.

### C.3 Optimización del volumen de muestra en el chip óptico

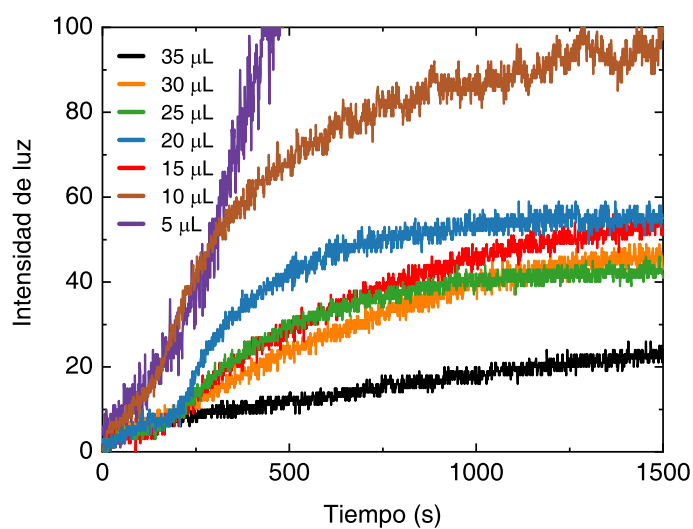
Con una muestra de sangre normal, se preparó un tubo con hematocrito al 40 % según el protocolo que se muestra en el Apéndice A. Se realizaron mediciones por duplicado con volúmenes de muestra de 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  y 35  $\mu\text{L}$  de muestra por duplicado. Así se obtuvieron dos silectogramas para cada volumen ensayado, los cuales luego se promediaron. Se utilizó un chip de seis cámaras, sin canales, en el que la inyección de la muestra se realizó por la parte superior de la cámara que fue cubierta posteriormente con el film protector.

Se observó que a bajos volúmenes, es decir, 5  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  a pesar de la utilización del film protector, los efectos de deshidratación de la muestra eran más notorios e interferían con la lectura. Por ejemplo, el último tramo de la medición para el volumen de 5  $\mu\text{L}$  se veía alterado como se observa en la Figura C.3 (a). Para el caso de 15  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$ , se observaron curvas homogéneas y que, comparadas con la bibliografía, resultaron satisfactorias [Murad et al., 1999]. A volúmenes pequeños puede notarse como la curva se va deformando y la oscilación en los valores de intensidad es cada vez mayor. En volúmenes mayores, se reduce la pendiente inicial y se pierde la curva en los primeros minutos (Figura C.3 (d)).

En la Figura C.4, se muestra una comparación de las curvas sin normalización a modo de visualizar la variación de la transmisión de luz respecto al volumen. Es evidente el aumento en la transmisión de luz a medida que disminuye el volumen de sangre, siendo más fuertemente influenciada por los volúmenes bajos de muestra. De esta manera, se adoptó un volumen de 15  $\mu\text{L}$  para todos los experimentos siguientes puesto que las curvas entre 20  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  resultaron ser las más homogéneas durante los ensayos.



**Figura C.3:** Silectogramas para volúmenes de 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  y 35  $\mu\text{L}$  de muestra. Las intensidades fueron normalizadas entre 0 y 100.



**Figura C.4:** Silectogramas de ensayos con distintos volúmenes de muestra.



# Bibliografía

- Agrawal, S. K. y Sahu, O. P. Two-channel quadrature mirror filter bank: An overview. *ISRN Signal Processing*, 2013:815619, 2013. doi:10.1155/2013/815619.
- Albea, B., Castellini, H., Marenzana, A., y Riquelme, B. New instrument for easy determination of rheological parameters of erythrocytes. *Biochimica Clinica*, 37:S437, 2013.
- Alberts, B., Bray, D., y Lewis, J. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4th Edition, New York, 2002.
- Alet, A. I., Basso, S., Delannoy, M., Alet, N. A., D'Arrigo, M., Castellini, H. V., y Riquelme, B. D. Innovative parameters obtained for digital analysis of microscopic images to evaluate in vitro hemorheological action of anesthetics. En *Biophotonics South America*, tomo 9531, págs. 187 – 192. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2015. doi:10.1117/12.2180791.
- Altube, L., Marenzana, A., Calviño, G., Foresto, P. G., Valverde, J. R., y Riquelme, B. D. Equipo automatizado para el estudio de la disociación de aglutinados celulares. *Anales AFA.: Asociación Física Argentina*, 17:318–320, 2005.
- American-Diabetes-Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(Supplement 1):S81–S90, 2014. doi:10.2337/dc14-S081.
- Ansari, M. Z. y Nirala, A. K. Biospeckle assessment of torn plant leaf tissue and automated computation of leaf vein density (lvd). *The European Physical Journal Applied Physics*, 70(2):21201–1–9, 2015. doi:10.1051/epjap/2015150013.
- Antonova, N., Riha, P., y Ivanov, I. Time dependent variation of human blood conductivity as a method for an estimation of rbc aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 39:69–78, 2008. doi:10.3233/CH-2008-1114.
- Arizaga, R., Trivi, M., y Rabal, H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. *Optics & Laser Technology*, 31(2):163 – 169, 1999. doi:10.1016/S0030-3992(99)00033-X.
- Armstrong, J., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., y Fisher, T. C. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 87:4259–4270, 2004.

- Asakura, S. y Oosawa, F. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33(126):183–192, 1958. doi:10.1002/pol.1958.1203312618.
- Bagchi, P., Johnson, P. C., y Popel, A. S. Computational Fluid Dynamic Simulation of Aggregation of Deformable Cells in a Shear Flow. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(7):1070–1080, 2005. doi:10.1115/1.2112907.
- Baskurt, O. K. y Meiselman, H. J. Red blod cell aggregability. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 43:353–354, 2009.
- Baskurt, O. K., Boynard, M., Cokelet, G. C., Connes, P., Cooke, B. M., Forconi, S., Liao, F., Hardeman, M. R., Jung, F., Meiselman, H. J., Nash, G., Nemeth, N., Neu, B., Sandhagen, B., Shin, S., Thurston, G., y Wautier, J. L. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 42:75–97, 2009a. doi:10.3233/CH-2009-1202. 2.
- Baskurt, O. K., Boynard, M., Cokelet, G. C., Connes, P., Cooke, B. M., Forconi, S., Liao, F., Hardeman, M. R., Jung, F., Meiselman, H. J., Nash, G., Nemeth, N., Neu, B., Sandhagen, B., Shin, S., Thurston, G., y Wautier, J. L. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 42(2):75–97, 2009b. doi:10.3233/CH-2009-1202.
- Baskurt, O. K. y Meiselman, H. J. Activated polymorphonuclear leukocytes affect red blood cell aggregability. *Journal of Leukocyte Biology*, 63(1):89–93, 1998. doi:10.1002/jlb.63.1.89.
- Baskurt, O. K., Meiselman, H., y Kayar, E. Measurement of red blood cell aggregation in a “plate–plate” shearing system by analysis of light transmission. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 19(4):307–314, 1998.
- Baskurt, O. K., Uyklu, M., Hardeman, M. R., y Meiselman, H. J. Photometric measurements of red blood cell aggregation: light transmission versus light reflectance. *Journal of biomedical optics*, 14(5):054044–054044, 2009c. doi:10.1117/1.3251050.
- Baskurt, O. K., Uyklu, M., Ozdem, S., y Meiselman, H. J. Measurement of red blood cell aggregation in disposable capillary tubes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 47(4):295–305, 2011. doi:10.3233/CH-2011-1411.
- Baskurt, O. K., Uyklu, M., Ulker, P., Cengiz, M., Nemeth, N., Alexy, T., Shin, S., Hardeman, M. R., y Meiselman, H. J. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 43:283–298, 2009d. doi:10.3233/CH-2009-1240.
- Bauersachs, R. M., Wenby, R. B., y Meiselman, H. J. Determination of specific red blood-cell aggregation indexes via an automated-system. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 9:1–25, 1989.

- Beilin, B., Mayburd, E., Yardeni, I.-Z., Hendel, D., Robinson, D., y Bessler, H. Blood rheology in pca and pcea after total knee arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, 21(2):179–184, 2006. doi:10.1016/j.arth.2005.04.038.
- Benevides, J. M., Weiss, M. A., y Thomas, G. J. Design of the helix-turn-helix motif: nonlocal effects of quaternary structure in dna recognition investigated by laser raman spectroscopy. *Biochemistry*, 30(18):4381–4388, 1991. doi:10.1021/bi00232a003.
- Berjot, M., Marx, J., y Alix, A. J. P. Determination of the secondary structure of proteins from the raman amide i band: The reference intensity profiles method. *Journal of Raman Spectroscopy*, 18(4):289–300, 1987. doi:10.1002/jrs.1250180411.
- Berk, D. A. y Hochmuth, R. M. Lateral mobility of integral proteins in red blood cell tethers. *Biophysical Journal*, 61(1):9–18, 1992.
- Blom, J. *Monitoring of Respiration and Circulation*. CRC Press, 2003.
- Bollinger, A., Lüthy, E., y Jenny, E. Total blood viscosity at various shear rates and its influencing through low molecular dextran. *Klinische Wochenschrift*, 45(18):939–943, 1967. doi:10.1007/BF01726936.
- Boynard, M., Lelievre, J., y Guillet, R. Aggregation of red blood cells studied by ultrasound backscattering. *Biorheology*, 24(5):451–461, 1987.
- Braga, R., Horgan, G., Enes, A., Miron, D., Rabelo, G., y Barreto Filho, J. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. *Computers and Electronics in Agriculture*, 58(2):123–132, 2007. doi:10.1016/j.compag.2007.03.009.
- Braga, R. A., Dupuy, L., Pasqual, M., y Cardoso, R. R. Live biospeckle laser imaging of root tissues. *European Biophysics Journal*, 38(5):679–686, 2009. doi:10.1007/s00249-009-0426-0.
- Braga, R. A., González-Peña, R. J., Viana, D. C., y Rivera, F. P. Dynamic laser speckle analyzed considering inhomogeneities in the biological sample. *Journal of Biomedical Optics*, 22(4):1 – 10, 2017. doi:10.1117/1.JBO.22.4.045010.
- Brinkman, R., Zijlstra, W. G., y Jansonius, N. J. Quantitative evaluation of the rate of rouleaux formation of erythrocytes by measuring light reflection ("syllectometry"). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C. Biological and medical sciences*, 66:236–248, 1966.
- Brooks, D. E. Mechanism of red cell aggregation. En *Blood Cells, Rheology, and Aging*, págs. 158–162. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1988.
- Bull, B. S. y Brailsford, D. The zeta sedimentation ratio. *Blood*, 40(4):550–557, 1972.
- Buszniesz, P., Mascaro Grosso, H., Delannoy, M., Di Sapio, O., y Riquelme, B. Caracterización fisicoquímica, óptica y reológica de soluciones extractivas de *phyllanthus sellowianus* y *bauhinia forficata*. *Anales AFA*, 28(2):66–69, 2017a.

- Buszniesz, P., Lerda, N., Toderi, M., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. Hemorheological action of trigonelline on in vitro glycated red blood cells. *Series on Biomechanics*, 31(3):30–35, 2017b.
- Buxbaum, K., Evans, E., y Brooks, D. E. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. *Biochemistry*, 21(13):3235–3239, 1982. doi:10.1021/bi00256a032.
- Caglayan, O., Buyukkocak, U., Kara, F. K., y Sert, O. The decrease in erythrocyte sedimentation rate related to general anesthesia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 35:459–462, 2006.
- Cardoso, R. R., Costa, A. G., Nobre, C. M. B., y Braga, R. A. Frequency signature of water activity by biospeckle laser. *Optics Communications*, 284(8):2131 – 2136, 2011. doi:10.1016/j.optcom.2011.01.003.
- Cardoso, R. y Braga, R. Enhancement of the robustness on dynamic speckle laser numerical analysis. *Optics and Lasers in Engineering*, 63:19–24, 2014. doi:10.1016/j.optlaseng.2014.06.004.
- Carrera, L. I., Etchepare, R., D'Arrigo, M., Vaira, S. M., Valverde, J., D'Ottavio, A. E., y Foresto, P. Hemorheologic changes in type 2 diabetic patients with microangiopathic skin lesions. a linear discriminant categorizing analysis. *Journal of Diabetes and its Complications*, 22(2):132 – 136, 2008. doi:doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.06.001.
- Carvalho, F. A., Connell, S., Miltenberger-Miltenyi, G., Pereira, S. V., Tavares, A., Ariëns, R. A. S., y Santos, N. C. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. *ACS Nano*, 4(8):4609–4620, 2010. doi:10.1021/nn1009648.
- Chen, S., Barshtein, G., Gavish, B., Mahler, Y., y Yedgar, S. Monitoring of red blood cell aggregability in a flow-chamber by computerized image analysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 14(4):497–508, 1994.
- Chien, S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annual Review of Physiology*, 49(1):177–192, 1987. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.001141.
- Chien, S. y Jan, K. M. Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvascular Research*, 5:155–166, 1973.
- Chien, S. y Sung, L. A. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 7:71–91, 1987.
- Choo-Smith, L.-P., Edwards, H. G. M., Endtz, H. P., Kros, J. M., Heule, F., Barr, H., Robinson Jr., J. S., Bruining, H. A., y Puppels, G. J. Medical applications of raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers*, 67(1):1–9, 2002. doi:10.1002/bip.10064.

- Cokelet, G. R. y Goldsmith, H. L. Decreased hydrodynamic resistance in the two phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. *Circulation Research*, 68:1–17, 1991.
- Connes, P., Uyklu, M., Tripette, J., Boucher, J., Beltran, E., y Chalabi, T. Sampling time after tourniquet removal affects erythrocyte deformability and aggregation measurements. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 41(1):9–15, 2009.
- Danieli, V., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. D. Analysis of the deformability of adhered cells by mean of digital image processing. tomo 91, pág. 108. Wiley, 2006.
- Danieli, V., Fontana, A., Alessi, A., Foresto, P. Valverde, J., Grandfils, C., y Riquelme, B. D. Tratamiento de eritrocitos humanos con copolímeros sintéticos: optimización del tiempo de incubación. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 43(1):43–48, 2009.
- del Balzo, G. Implicancia reológica de la carga superficial eritrocitaria en el mecanismo de interacción intracelular. *Tesina de Lic. en Biotecnología, FCByF - UNR*, 2010.
- del Balzo, G., Delannoy, M., Fontana, A., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. D. Estudio del efecto de la tripsina sobre la carga superficial eritrocitaria mediante la técnica de retrodifusión láser. *Anales AFA.: Asociación Física Argentina*, 22(1):88–91, 2010.
- Delannoy, M., Fontana, A., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. Influence of hypertension and diabetes mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series on Biomechanics*, 29(1):5–10, 2015.
- Delannoy, M. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura - Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, 2014.
- Delannoy, M., del Balzo, G., Filippini, F., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. Arterial hypertension modeled by in vitro treatment of red blood cells with trypsin. *Series on Biomechanics*, 27:87–92, 2012.
- Delfino, S. Estructura y función de la membrana eritrocitaria. *Rev. Arg. Transf.*, 19(1):5–23, 1991.
- Djaker, N., Lenne, P.-F., Marguet, D., Colonna, A., Hadjur, C., y Rigneault, H. Coherent anti-stokes raman scattering microscopy (cars): Instrumentation and applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 571(1):177 – 181, 2007. doi:10.1016/j.nima.2006.10.057.
- Doddi, S. K. y Bagchi, P. Three-dimensional computational modeling of multiple deformable cells flowing in microvessels. *Physical Review E*, 79:046318, 2009. doi: 10.1103/PhysRevE.79.046318.
- Donner, M., Siadat, M., y Stoltz, J. F. Erythrocyte aggregation: Approach by light scattering determination. *Biorheology*, 25:367–376, 1988. doi:10.3233/BIR-1988-251-246.

- Dormandy, J. A. Influence of blood viscosity on blood flow and the effect of low molecular weight dextran. *British medical journal*, 4(5789):716–719, 1971. doi:10.1136/bmj.4.5789.716.
- Dumas, D., Gaborit, N., Grossin, L., Riquelme, B., Gigant-Huselstein, C., de Isla, N., Gillet, P., Netter, P., y Stoltz, J. F. Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: New modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering. *Biorheology*, 41:459–467, 2004.
- D'Arrigo, M., Riquelme, B., Valverde, J., y Foresto, P. Análisis de la energía de adhesión intercambiada en la unión cd44-hialuronato. *e-Universitas UNR Journal*, 1(2):305–12, 2009.
- D'Arrigo, M. *Incidencia en la relación estructura-función del sistema de grupo sanguíneo MN y del Receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria*. Tesis Doctoral, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR, Rosario, Argentina, 2000.
- Elías, C. V. Estudio comparativo sobre diferentes protocolos de trabajo para caracterizar la morfología eritrocitaria mediante microscopía electrónica de barrido. *Tesina Lic. en Biotecnología, FCB y F - UNR*, 2012.
- Eriksson, L. On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces — the 'glass effect'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1036(3):193 – 201, 1990. doi:10.1016/0304-4165(90)90034-T.
- Evans, E. A. y Skalak, R. *Mechanics and thermodynamics of biomembranes*. CRC Press, Boca Raton, USA, 1980.
- Fantoni, R., Giacometti, A., y Santos, A. Bridging and depletion mechanisms in colloid-colloid effective interactions: A reentrant phase diagram. *The Journal of Chemical Physics*, 142(22):224905, 2015. doi:10.1063/1.4922263.
- Federico, A., Kaufmann, G. H., Galizzi, G. E., Rabal, H., Trivi, M., y Arizaga, R. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes. *Optics Communications*, 260(2):493–499, 2006. doi:10.1016/j.optcom.2005.11.047.
- Feng, S. S. *Red Blood Cells Tank-Treading in a Simple Shear Flow*. Tesis Doctoral, Columbia University, New York, U.S.A, 1988.
- Flormann, D., Schirra, K., Podgorski, T., y Wagner, C. On the rheology of red blood cell suspensions with different amounts of dextran: separating the effect of aggregation and increase in viscosity of the suspending phase. *Rheologica Acta*, 55(6):477–483, 2016. doi:10.1007/s00397-015-0882-7.
- Fontana, A., Lerda, N., Delannoy, M., Alessi, A., y Riquelme, B. D. Técnica de cuantificación de la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(1):1–6, 2012.

- Foresto, P., D'Arrigo, M., Filipini, F., Gallo, R., Barberena, L., y Racca, L. Evaluación de alteraciones hemorreológicas en pacientes hipertensos. *Medicina (Buenos Aires)*, 65:121–125, 2005.
- Fåhræus, R. The suspension stability of the blood. *Physiological Reviews*, 9:241–274, 1929.
- Fåhræus, R. y Lindqvist, T. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*, 96:562–568, 1931.
- Fujii, H., Asakura, T., Nohira, K., Shintomi, Y., y Ohura, T. Blood flow observed by time-varying laser speckle. *Opt. Lett.*, 10(3):104–106, 1985. doi:10.1364/OL.10.000104.
- Glasstone, S. *Tratado de química física*. Aguilar, 1964.
- Goodman, J. W. *Laser Speckle and Related Phenomena*, cap. 2: Statistical Properties of Laser Speckle Patterns, págs. 9–75. Springer-Verlag, 1975.
- Gramhame, D. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Reviews*, 41(3):441–501, 1947.
- Hardeman, M., Dobbe, J., y Ince, C. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 25(1):1–11, 2001.
- Hiemenz, P. y Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry, Third Edition, Revised and Expanded*. Taylor & Francis, 1997.
- Horvat, S. y Jakas, A. Peptide and amino acid glycation: new insights into the maillard reaction. *Journal of Peptide Science*, 10(2):119–137, 2004.
- Ioan, C. E., Aberle, T., y Burchard, W. Light scattering and viscosity behavior of dextran in semidilute solution. *Macromolecules*, 34(2):326–336, 2001. doi:10.1021/ma992060z.
- Israelachvili, J. N. 21 - interactions of biological membranes and structures. En Israelachvili, J. N., ed., *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, págs. 577 – 616. Academic Press, San Diego, 2011. doi:10.1016/B978-0-12-375182-9.10021-1.
- Jan, K. M. y Chien, S. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *The Journal of general physiology*, 61(5):638–654, 1973. doi:10.1085/jgp.61.5.638.
- Jones, A. y Vincent, B. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles 2. modifications to theory and further studies. *Colloids and Surfaces*, 42(1):113 – 138, 1989. doi:10.1016/0166-6622(89)80081-2.
- Jones, R. y Wykes, K. *Holographic and Speckle Interferometry*. Cambridge Studies in Modern Optics. Cambridge University Press, second ed<sup>ón</sup>, 1989.

- Kaliviotis, E., Sherwood, J. M., y Balabani, S. Local viscosity distribution in bifurcating microfluidic blood flows. *Physics of Fluids*, 30(3):030706, 2018. doi:10.1063/1.5011373.
- Kaliviotis, E. y Yianneskis, M. Blood viscosity modelling: influence of aggregate network dynamics under transient conditions. *Biorheology*, 48(2):127–47, 2011.
- Kaliviotis, E., Dusting, J., Sherwood, J. M., y Balabani, S. Quantifying local characteristics of velocity, aggregation and hematocrit of human erythrocytes in a microchannel flow. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 63:123–148, 2016. doi:10.3233/CH-151980.
- Klose, H. J., Volger, E., Brechtelsbauer, H., Heinich, L., y Schmid-Schönbein, H. Micro-rheology and light transmission of blood. *Pflügers Archiv*, 333(2):126–139, 1972. doi:10.1007/BF00586912.
- Kneipp, K., Kneipp, H., Kartha, V. B., Manoharan, R., Deinum, G., Itzkan, I., Dasari, R. R., y Feld, M. S. Detection and identification of a single dna base molecule using surface-enhanced raman scattering (sers). *Physical Review E*, 57:R6281–R6284, 1998. doi:10.1103/PhysRevE.57.R6281.
- Koralewski, M., Reinholz, F., Karoń, J., y Waraczewski, K. Optical and magneto-optical properties of clinical dextrans. *Acta Physica Polonica Series a*, 112:1117, 2007. doi:10.12693/APhysPolA.112.1119.
- Kreis, T. *Holographic Interferometry: Principles and Methods*. Akademie Verlag Series in Optical Metrology. Akademie Verlag, Berlin, 1996.
- La Celle, P. L. Pathologic erythrocytes in the capillary microcirculation. *Blood Cells*, 1:269–284, 1975.
- Lacombe, C. y Lelièvre, J. Interpretation of rheograms for assessing RBC aggregation and deformability. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 7:46–61, 1987.
- Lee, B. K., Durairaj, A., Mehra, A., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., y Alexy, T. Microcirculatory dysfunction in cardiac syndrome x: Role of abnormal blood rheology. *Microcirculation*, 15(5):451–459, 2008. doi:10.1080/10739680701797090.
- Lee, K., Kinnunen, M., Khokhlova, M. D., Lyubin, E. V., Priezhev, A. V., Meglinski, I., y Fedyanin, A. A. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions. *Journal of Biomedical Optics*, 21(3):1–10, 2016. doi:10.1117/1.JBO.21.3.035001.
- Lim, H., Nam, J., Xue, S., y Shin, S. Measurement of blood coagulation with considering rbc aggregation through a microchip-based light transmission aggregometer. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 47:211–218, 2011. doi:10.3233/CH-2010-1382.

- Ling, J., Weitman, S. D., Miller, M. A., Moore, R. V., y Bovik, A. C. Direct raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug. *Applied Optics*, 41(28):6006–6017, 2002. doi:10.1364/AO.41.006006.
- Londero, C., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. Optimización del medio de suspensión para la observación de glóbulos rojos humanos frescos con microscopios ópticos. *Acta Microscopica*, 25(3):151–156, 2016.
- Lotem, H., Lynch, R. T., y Bloembergen, N. Interference between raman resonances in four-wave difference mixing. *Physical Review A*, 14:1748–1755, 1976. doi:10.1103/PhysRevA.14.1748.
- López Murúa, G., Racca, L., y Ponce de León, P. Estudio de la cinética de captación de ácido siálico por larvas musculares de trichinella spiralis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(2):267–72, 2015.
- Mancilla Canales, M., Londero, C., Riquelme, B., y Korol, A. Identificación de eritrocitos por análisis digital de imágenes microscópicas: optimización mediante transformada wavelet. *Acta Microscopica*, 27(2):69–75, 2018.
- McMahon, T. J. Red blood cell deformability, vasoactive mediators, and adhesion. *Frontiers in Physiology*, 10:1417, 2019. doi:10.3389/fphys.2019.01417.
- McMillan, D. E. Hemorheological studies in the diabetes control & complications trial. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 13:147–154, 1993. doi:10.3233/CH-1993-13201.
- Menichini, P. A., Larese, M. G., y Riquelme, B. D. Automatic analysis of microscopic images of red blood cell aggregates. En *Biophotonics South America*, tomo 9531, págs. 340 – 348. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2015. doi:10.1117/12.2181110.
- Merrill, E. W., Gilliland, E. R., Lee, T. S., y Salzman, E. W. Blood rheology: Effect of fibrinogen deduced by addition. *Circulation Research*, 18(4):437–446, 1966. doi:10.1161/01.RES.18.4.437.
- Moelwyn-Hughes, E. *Physical chemistry*. Pergamon Press, 1961.
- Mohandas, N., Chasis, J. A., y Shohet, S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Seminars in Hematology*, 20(3):225–42, 1983.
- Mohandas, N. y Evans, E. Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23:787–818, 1994.
- Mohandas, N. y Shohet, S. *Current topics in hematology*. Alan R. Liss, New York, 1978.

- Mohandas, N. y Gallagher, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10):3939–3948, 2008. doi:10.1182/blood-2008-07-161166.
- Murad, K. L., Mahany, K. L., Brugnara, C., Kuypers, F. A., Eaton, J. W., y Scott, M. D. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(ethylene glycol). *Blood*, 93(6):2121–2127, 1999.
- Nadort, A., Woolthuis, R. G., van Leeuwen, T. G., y Faber, D. J. Quantitative laser speckle flowmetry of the in vivo microcirculation using sidestream dark field microscopy. *Biomedical optics express*, 4(11):2347–2361, 2013. doi:10.1364/BOE.4.002347.
- N'Dri, N. A., Shyy, W., y Tran-Son-Tay, R. Computational modeling of cell adhesion and movement using a continuum-kinetics approach. *Biophysical Journal*, 85(4):2273–2286, 2003. doi:10.1016/S0006-3495(03)74652-9.
- Neu, B., Meiselman, H. J., y Sowemimo-Coker, S. O. Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes. *Biophysical Journal*, 85:75–84, 2003.
- Neu, B. y Meiselman, H. J. *The Role of Macromolecules in Stabilization and Destabilization of Biofluids*, págs. 393–414. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008. doi:10.1007/978-3-540-75409-1\_16.
- Neu, B. y Meiselman, H. J. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical Journal*, 83(5):2482 – 2490, 2002. doi:10.1016/S0006-3495(02)75259-4.
- Oulamara, A., Tribillon, G., y Duvernoy, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, 36(2):165–179, 1989. doi:10.1016/S0030-3992(99)00033-X.
- Overman, S. A. y Thomas Jr, G. J. Structural studies of viruses by raman spectroscopy. novel vibrational assignments for proteins from raman spectra of viruses. *Journal of Raman Spectroscopy*, 29(1):23–29, 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-4555(199801)29:1<23::AID-JRS213>3.0.CO;2-K.
- 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., y Français, O. 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, 2015. doi:10.1002/ajh.23941.
- Piederrière, Y., Boulvert, F., Cariou, J., Jeune, B. L., Guern, Y., y Brun, G. L. Backscattered speckle size as a function of polarization: influence of particle-size and -concentration. *Opt. Express*, 13(13):5030–5039, 2005. doi:10.1364/OPEX.13.005030.
- Pinho, D., Campo-Deaño, L., Lima, R., y Pinho, F. T. In vitro particulate analogue fluids for experimental studies of rheological and hemorheological behavior of glucose-rich rbc suspensions. *Biomicrofluidics*, 11(5):054105, 2017. doi:10.1063/1.4998190.

- Plá, L. V., Stoltz, J. F., Valverde, J. R., y Riquelme, B. D. Cold-agglutinin hemolytic diseases, a rheo-optical study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 38:83–91, 2008.
- Plá, L., Rasia, R. J., Valverde, J. R., Muller, S., y Stoltz, J. F. Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2):381 – 385, 2000. doi:doi.org/10.1006/bbrc.2000.3679.
- Pollack, W., Hager, H. J., Reckel, R., Toren, D. A., y Singher, H. O. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. *Transfusion*, 5(2):158–183, 1965.
- Pollack, W. y Reckel, R. P. A reappraisal of the forces involved in hemagglutination. *International Archives of Allergy and Immunology*, 54(1):29–42, 1977. doi:10.1159/000231805.
- Ponce de León, P., Toderi, M., Castellini, H., y Riquelme, B. In vitro alterations of erythrocyte aggregation by action of trichinella spiralis newborn larvae. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 65:195–204, 2017. doi:10.3233/CH-16158.
- Ponce de León, P., Toderi, M., Castellini, H., y Riquelme, B. Red blood cell alterations by in vitro action of trichinella spiralis newborn larvae. *Global Journal of Biotechnology and Biomaterial Science*, 6(1):007–012, 2020. doi:10.17352/gjbbs.000012.
- Ponce de León, P., del Balzo, G., y Riquelme, B. D. Biorheological action of ascaris lumbricoides larvae on human erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 65(2):237–242, 2013.
- Potma, E. O., Jones, D. J., Cheng, J.-X., Xie, X. S., y Ye, J. High-sensitivity coherent anti-stokes raman scattering microscopy with two tightly synchronized picosecond lasers. *Opt. Lett.*, 27(13):1168–1170, 2002. doi:10.1364/OL.27.001168.
- Puppels, G. J., Otto, C., Greve, J., Robert-Nicoud, M., Arndt-Jovin, D. J., y Jovin, T. M. Raman microspectroscopic study of low-ph-induced changes in dna structure of polytene chromosomes. *Biochemistry*, 33(11):3386–3395, 1994. doi:10.1021/bi00177a032.
- Rabal, H. y Braga, R. *Dynamic Laser Speckle and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. doi:10.1201/9781420060164.
- Raman, C. y Krishnan, K. A new radiation. *Indian Journal of Physics*, 2:387–398, 1928.
- Rasia, R. J., de Isla, N., Altube, L., Muller, S., Valverde, J., y Stoltz, J. Characterization of monoclonal antibodies against human red blood group cells antigens by laser backscattering. *Biorheology*, 40:197–203, 2003.

- Rasia, R. J., Porta, P. E., y García Rosasco, M. Shear deformation measurement of suspended particles: Application to erythrocytes. *Review of Scientific Instruments*, 57(1):33–35, 1986. doi:10.1063/1.1139113.
- Rasia, R. J., Valverde-Rasia, J., y Rosasco, M. G. Manual quantitative method for the study of red cell agglutination using light diffraction by suspended particles. *Vox Sanguinis*, 58(2):112–117, 1990. doi:10.1111/j.1423-0410.1990.tb02072.x.
- Richards, L. M., Kazmi, S. M. S., Davis, J. L., Olin, K. E., y Dunn, A. K. Low-cost laser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam. *Biomedical optics express*, 4(10):2269–2283, 2013. doi:10.1364/BOE.4.002269.
- Riquelme, B., Valverde, J., y Rasia, R. J. Complex viscoelasticity of normal and lectin treated erythrocytes using laser diffractometry. *Biorheology*, 35(4):325 – 334, 1998. doi:doi.org/10.1016/S0006-355X(99)80014-6.
- Riquelme, B., Castellini, H., y Albea, B. Linear and non-linear viscoelasticity of red blood cells using a new optical erythrocyte rheometer. En *Latin America Optics and Photonics Conference*, pág. Th4A.41. Optical Society of America, 2018. doi:10.1364/LAOP.2018.Th4A.41.
- Riquelme, B., Foresto, P., D'Arrigo, M., Valverde, J., y Rasia, R. J. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62(2):131 – 141, 2005. doi:doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.10.004.
- Riquelme, B. D., Dumas, D., Valverde, J., Rasia, R. J., y Stoltz, J. F. Analysis of the 3D structure of agglutinated erythrocyte using CellScan and confocal microscopy: characterization by FLIM-FRET. En *Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging*, tomo 5139, págs. 190 – 198. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2003. doi:10.1117/12.500123.
- Riquelme, B. D. y Londero, C. M. New optical approach to simultaneous determination of deformability and adhesion energy of human erythrocytes. En *Latin America Optics and Photonics Conference*, pág. Th4A.39. Optical Society of America, 2018. doi:10.1364/LAOP.2018.Th4A.39.
- Riquelme, B. D., Dumas, D., Fontana, A., Delannoy, M., Valverde, J. R., Sondag-Thull, D., y Grandfils, C. Hemocompatibility and biofunctionality of two poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-co-poly(ethyleneglycol) copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 99(3):445–454, 2011.
- Ruhenstroth-Bauer, G. *Biophysical mechanisms in vascular homeostasis and intravascular thrombosis*, cap. The electric charge of blood cells, pág. 42. Appleton-Century-Crofts, New York, 1965.
- Russel, W., Saville, D., y Schowalter, W. *Colloidal Dispersions*. Cambridge University Press, 1992.

- Sans-Sabrafen, J., Raebel, C. B., y Corrons, J. *Hematología Clínica*. Elsevier, Quinta Edición, 2007.
- Schrier, S., Zachoeski, A., y Devaux, P. Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. *Blood*, 79(3):782–786, 1992.
- Schut, T. C. B., Puppels, G. J., Kraan, Y. M., Greve, J., van der Maas, L. L., y Figdor, C. G. Intracellular carotenoid levels measured by raman microspectroscopy: Comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals. *International Journal of Cancer*, 74(1):20–25, 1997. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970220)74:1<20::AID-IJC4>3.0.CO;2-2.
- Sebastián, J. L., San Martín, S. M. n., Sancho, M., Miranda, J. M., y Álvarez, G. Erythrocyte rouleau formation under polarized electromagnetic fields. *Physical Review E*, 72:031913, 2005. doi:10.1103/PhysRevE.72.031913.
- Shen, Y. *The Principles of Nonlinear Optics*. Wiley classics library. Wiley, 2003.
- Shin, S., Jang, J., Park, M., Ka, Y., y Sah, J. Shear-dependent aggregation characteristics of red blood cells in a pressure driven microfluidic channel. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 34:353–362, 2006.
- Shin, S., Yang, Y., y Suh, J.-S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 41(3):197–207, 2009.
- Singer, S. J. y Nicholson, G. L. The fluid mosaic model of the structure off cell membranes. *Science*, 17(4023):720–731, 1972.
- Skalak, R., Tozeren, A., Zarda, R. P., y Chien, S. Strain energy function of red blood cell membranes. *Biophysical Journal*, 13(3):245–264, 1973.
- Skalak, R. y Zhu, C. Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheology*, 27:309–325, 1990.
- Stratton, F., Rawlinson, V. I., Gunson, H. H., y Phillip, P. K. The role of zeta potential in rh agglutination. *Vox Sanguinis*, 24(3):273–279, 1973.
- Swenson, J., Smalley, M. V., y Hatharasinghe, H. L. M. Mechanism and strength of polymer bridging flocculation. *Physical Review Letters*, 81:5840–5843, 1998. doi:10.1103/PhysRevLett.81.5840.
- van Oss, C. y Absolom, D. Zeta potentials, van der waals forces and hemagglutination. *Vox Sanguinis*, 44(3):183–190, 1983. doi:10.1111/j.1423-0410.1983.tb01883.x.
- Vetterli, M. y Herley, C. Wavelets and filter banks: theory and design. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 40(9):2207–2232, 1992.

- Vincent, B. The calculation of depletion layer thickness as a function of bulk polymer concentration. *Colloids and Surfaces*, 50:241 – 249, 1990. doi:10.1016/0166-6622(90)80267-8.
- Vincent, B., Edwards, J., Emmett, S., y Jones, A. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles (“soft spheres”). *Colloids and Surfaces*, 18(2):261 – 281, 1986. doi:10.1016/0166-6622(86)80317-1.
- Wagner, C., Steffen, P., y Svetina, S. Aggregation of red blood cells: From rouleaux to clot formation. *Comptes Rendus Physique*, 14(6):459 – 469, 2013. doi:10.1016/j.crhy.2013.04.004.
- White, S. M., George, S. C., y Choi, B. Automated computation of functional vascular density using laser speckle imaging in a rodent window chamber model. *Microvascular Research*, 82(1):92 – 95, 2011. doi:doi.org/10.1016/j.mvr.2011.03.006.
- Wiewióra, M., Sosada, K., Slowinska, L., Piecuch, J., Glück, M., Zurawinski, W., y Turczynski, B. Sex-dependent differences in rheological properties and the relation of blood viscosity to erythrocyte aggregation indices among morbidly obese patients. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(4):259–67, 2010.
- Wong, P. A hypothesis of the disc–sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations. *Journal of Theoretical Biology*, 233(1):127 – 135, 2005. doi:10.1016/j.jtbi.2004.09.013.
- Ye, T., Phan-Thien, N., Lim, C. T., Peng, L., y Shi, H. Hybrid smoothed dissipative particle dynamics and immersed boundary method for simulation of red blood cells in flows. *Physical Review E*, 95:063314, 2017. doi:10.1103/PhysRevE.95.063314.
- Yeom, E. y Lee, S. J. Microfluidic-based speckle analysis for sensitive measurement of erythrocyte aggregation: A comparison of four methods for detection of elevated erythrocyte aggregation in diabetic rat blood. *Biomicrofluidics*, 9(2):024110–024110, 2015. doi:10.1063/1.4917023.
- Zhu, C. A thermodynamic and biomechanical theory of cell adhesion part i: General formulism. *Journal of Theoretical Biology*, 150(1):27 – 50, 1991. doi:10.1016/S0022-5193(05)80473-4.
- Zumbusch, A., Holtom, G. R., y Xie, X. S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Physical Review Letters*, 82:4142–4145, 1999. doi:10.1103/PhysRevLett.82.4142.