



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Postgrado en Ciencias Físicas
Maestría en Ciencias (Física Médica)**

Interacción de ondas de choque con cálculos
renales artificiales inoculados con una cepa de
Salmonella Typhimurium

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

LIC. EN FÍS. MARÍA DEL SOL QUINTERO CASTELÁN

ASESOR: DR. ACHIM M. LOSKE MEHLING

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Fernando A. Barrios Álvarez
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Dr. Jorge Gutiérrez Aceves



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A María de Jesús, ... sólo atino decir: Mamá, tengo una deuda interna impagable contigo.

A mis hermanos, Carmen y Rafael, imposible suponerme sin ustedes.

A Marco Antonio y a Paula, por todo el apoyo que me han brindado.

A la memoria de Miguel Ángel Quintero López.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Achim M. Loske, por su tutela y constante estímulo.

A la Dra. María del Carmen Wachter y al M. en C. Ulises Mora, por su generosa e importante aportación en el área de microbiología.

Al Dr. Fernando A. Barrios, por sus prácticas y acertadas recomendaciones.

Al Dr. Jorge Gutiérrez Aceves, por la inquietud que dio origen a este tema.

A la Dra. María Ester Brandan y al Dr. Rafael A. Méndez, por el tiempo invertido en leer este trabajo y por sus comentarios que contribuyeron a enriquecerlo.

Al M. en C. Francisco Fernández, por su invaluable apoyo y paciencia al guiarme en los aspectos de instrumentación. Y por su generosa amistad.

Al Dr. Eduardo Castaño, por compartir su experiencia al contribuir con el diseño experimental.

Al Ing. Arturo Méndez y al Tec. René Preza, por auxiliarme en diversos aspectos técnicos.

A todos los miembros del PCF-UNAM y CFATA que de una u otra forma me han ayudado.

A la Máxima Casa de Estudios, por abrirme sus puertas.

Al CONACYT Y DGEP-UNAM por su indispensable apoyo económico.

Una especial mención al Dr. Miguel de Icaza, por su inestimable amistad, por sus sabios consejos de mentor. Por todo lo compartido. Por ser un ejemplo a seguir...

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN 7

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN 8

CAPÍTULO 1 LITOTRIPSIA EXTRACORPORAL.....10

1.1	INTRODUCCIÓN	10
1.2	ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	10
1.3	ONDAS DE CHOQUE	11
1.4	LITOTRIPTORES EXTRACORPORALES	11
1.5	GENERACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE EN AGUA POR ROMPIMIENTO ELÉCTRICO	13
1.5.1	<i>Litotriptor electrohidráulico.....</i>	<i>16</i>
1.6	GENERACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE EN AGUA POR MÉTODO PIEZOELÉCTRICO	21
1.6.1	<i>Litotriptor piezoeléctrico.....</i>	<i>22</i>
1.7	FENOMENOLOGÍA DE LA INTERACCIÓN DE ONDAS DE CHOQUE EN AGUA CON LA MATERIA	23

CAPÍTULO 2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE UROLOGÍA31

2.1	INTRODUCCIÓN	31
2.2	SISTEMA URINARIO.....	31
2.3	LITIASIS URINARIA	33
2.4	INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO.....	35

CAPÍTULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....40

3.1	INTRODUCCIÓN	40
3.2	OBJETIVOS	40
3.2.1	<i>Objetivo general.....</i>	<i>40</i>
3.2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>40</i>
3.3	METODOLOGÍA Y MATERIALES	41
3.3.1	<i>Material biológico.....</i>	<i>41</i>
3.3.2	<i>Materiales para la fabricación de los cálculos renales artificiales</i>	<i>41</i>
3.3.3	<i>Generadores de ondas de choque.....</i>	<i>41</i>
3.3.4	<i>Objetivo específico 1. Elaboración de los cálculos renales artificiales</i>	<i>43</i>
3.3.5	<i>Objetivo específico 2. Protocolo de inoculación de los cálculos renales artificiales con una cepa de Salmonella Typhimurium</i>	<i>45</i>
3.3.6	<i>Objetivo específico 3. Efectos del MEXILIT II sobre cálculos inoculados.....</i>	<i>47</i>
3.3.7	<i>Objetivo específico 4. Efectos del MEXILIT II y el Piezolith 2300 sobre cálculos inoculados.....</i>	<i>50</i>

CAPÍTULO 4 RESULTADOS52

4.1	OBJETIVO ESPECÍFICO 1. ELABORACIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES ARTIFICIALES	52
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO 2. PROTOCOLO DE INOCULACIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES ARTIFICIALES CON UNA CEPA DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM.....	52
4.3	OBJETIVO ESPECÍFICO 3. EFECTOS DEL MEXILIT II SOBRE CÁLCULOS INOCULADOS	54
4.4	OBJETIVO ESPECÍFICO 4. EFECTOS DEL MEXILIT II Y EL PIEZOLITH 2300 SOBRE CÁLCULOS INOCULADOS.....	57

DISCUSIÓN 59

CONCLUSIONES 62

APÉNDICE A. GENERALIDADES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM63

APÉNDICE B. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.....65

APÉNDICE C. CÓDIGO FUENTE EN LENGUAJE R VERSIÓN 2.2.168

REFERENCIAS 75

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1-1 Variación de presión causada por una onda de choque.</i>	11
<i>Figura 1-2 Secuencia de la generación de una onda de choque en agua</i>	15
<i>Figura 1-3 Concentración de una onda de choque utilizando un reflector elipsoidal.</i>	17
<i>Figura 1-4 (a) Esquema del MEXILIT II: (1) reflector elipsoidal, donde F2 es el foco terapéutico, (2) bujía, (3) grúa de precisión, (4) ventana de vidrio –una en cada cara de la tina-, (5) nivel de agua, (6) tina de fibra de vidrio, (7) circuito eléctrico. (b) Sistema de localización de foco terapéutico del reflector.</i>	18
<i>Figura 1-5 (a) Reflectores usados en el MEXILIT II. (b) Generación y concentración de una onda de choque en el MEXILIT II.</i>	19
<i>Figura 1-6 Componentes del MEXILIT II. (a) Circuito eléctrico de descarga: (1) “spark gap driver”, (2) arreglo de capacitores, (3) interruptor de chispa; (b) consola de mando y generador de ondas de choque.</i>	20
<i>Figura 1-7 (a) Bujía para generar descarga eléctrica. (b) Pulso de luz generado por la descarga eléctrica de 25 kV entre los electrodos de la bujía (Foto: A. Sánchez).</i>	20
<i>Figura 1-8 Esquema simplificado de un generador de ondas de choque piezoeléctrico.</i>	21
<i>Figura 1-9 Diagrama de un generador de ondas de choque piezoeléctrico. (Cortesía: Ing. Arturo Méndez).</i> ..	22
<i>Figura 1-10 Fotografía que muestra parte del arreglo de cristales piezoeléctricos del generador Piezolith 2300 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania).</i>	23
<i>Figura 1-11 Comportamiento de una onda de choque en dos interfases: tejido-cálculo renal y cálculo renal-tejido.</i>	26
<i>Figura 1-12 Cavitación generada por el paso de una onda de choque.</i>	28
<i>Figura 1-13 Dibujo esquemático de la fragmentación litiásica. O Ch: Ondas de choque; SA: Superficie anterior del cálculo; ZM: Zona media del cálculo; SP: Superficie posterior del cálculo; 1. Oc: Acción de ondas compresivas; 2. Cav: Fenómeno de cavitación (microchorros); 3. Ot: Reflexión de ondas. Plano de fractura; 4. Desc: Descascarillado</i>	29
<i>Figura 2-1 Sistema urinario</i>	32
<i>Figura 2-2 Ubicación de cálculos renales en el sistema urológico</i>	34
<i>Figura 4-1 $\log_{10}(UFC/ml)$ en agar soya tripticaseína con extracto de levadura (ASTEL) de <i>S. Typhimurium</i> inmovilizada en cálculos artificiales. Los resultados están agrupados por dureza relativa: suave y duro; y por réplica A (un lote con 3 modelos suaves y un lote con 3 modelos duros) y B (un lote con 3 modelos suaves y un lote con 3 modelos duros).</i>	53
<i>Figura 4-2 Inactivación logarítmica de <i>S. Typhimurium</i> inmovilizada en cálculos renales artificiales. Se evaluó el efecto de la aplicación de 90 y 400 ondas de choque; la dureza relativa de los cálculos, y el efecto a la exposición de la luz producida por la descarga eléctrica: “Modelos duros expuestos a luz”, “Modelos duros no expuestos a luz”; “Modelos suaves expuestos a luz”, “Modelos suaves no expuestos a luz”.</i>	56
<i>Figura 4-3 Inactivación logarítmica de <i>S. Typhimurium</i> inmovilizada en cálculos renales artificiales. Se evaluó el efecto de la aplicación de 2730 ondas de choque con dos generadores de ondas distintos: electrohidráulico y piezoeléctrico.</i>	58

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2-1 Características de dos tipos de cálculos renales: infectado y no infectado</i>	35
<i>Tabla 3-1 Número de ondas de choque aplicadas a cada tipo de modelo</i>	44
<i>Tabla 3-2 Porcentajes del peso de los componentes para cada tipo de modelo</i>	44
<i>Tabla 3-3 Ordenamiento de las réplicas para determinar viabilidad reproducible</i>	47
<i>Tabla 3-4 Ordenamiento de los experimentos de la primera fase experimental</i>	48
<i>Tabla 3-5 Pulsos de presión</i>	49
<i>Tabla 3-6 Ordenamiento de los experimentos de la segunda fase experimental</i>	50
<i>Tabla 4-1 Coeficientes de fragmentación del modelo suave y duro</i>	52
<i>Tabla 4-2 ANOVA de la cuenta viable (objetivo específico 2)</i>	54
<i>Tabla 4-3 ANOVA de la inactivación logarítmica (objetivo específico 3)</i>	57
<i>Tabla 4-4 ANOVA de la inactivación logarítmica (objetivo específico 4)</i>	58

Introducción

La necesidad de crear o mejorar las técnicas para el tratamiento de enfermedades ha generado un vínculo entre la física y la medicina. En este contexto se encuentra la aplicación de las ondas de choque para el tratamiento de cálculos renales. Esta técnica, no invasiva, es conocida como litotripsia extracorporeal o litotricia extracorpórea por ondas de choque.

En este trabajo se estudió el efecto de las ondas de choque generadas por dos tipos de litotriptores sobre microorganismos suspendidos en cálculos renales artificiales. El objetivo general del trabajo es investigar si un tratamiento de litotripsia extracorporeal puede inactivar, de manera significativa, microorganismos suspendidos en cálculos renales artificiales, y así verificar el potencial de las ondas de choque como método bactericida de interés clínico.

En los dos primeros capítulos se describe la generación de ondas de choque por rompimiento eléctrico en agua y por sistemas piezoeléctricos, así como su interacción con un objeto sumergido en agua o en alguna sustancia o material con propiedades acústicas similares (por ejemplo tejido biológico). Cabe mencionar que debido a la complejidad del fenómeno, no se cuenta aún con un modelo teórico capaz de describir con detalle dicha interacción. Asimismo, se presentan las principales características de los litotriptores utilizados en el desarrollo experimental de la tesis. Posteriormente, se ilustran aspectos básicos relacionados con urología que van desde la morfología y fisiología del riñón hasta la litiasis renal infecciosa. En el capítulo tres, se trata el desarrollo experimental de la tesis. Los resultados se presentan en el capítulo cuatro. Finalmente, se mencionan la discusión y las conclusiones generales.

El presente trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, con financiamiento de la DGAPA (proyecto IN 101202), bajo la asesoría del Dr. Achim M. Loske Mehling, del M. en C. Ulises Mora Álvarez y la Dra. Carmen Wachter Rodarte, de la Facultad de Química de la UNAM y el Dr. Eduardo Castaño Tostado, de la Facultad de Química de la UAQ.

Antecedentes y justificación

La mayoría de los fluidos biológicos que constituyen el medio líquido del cuerpo humano son sistemas metaestables, que acabarían generando cristales si permanecieran en un tiempo infinito confinados en sus respectivas cavidades sin movimiento o con poco movimiento. La formación de cristales no es un proceso fácil, de manera que si el fluido se renueva en un tiempo suficientemente breve los cristales no se desarrollarán. Para evitar la precipitación cuando ésta no es deseada, la naturaleza ha desarrollado diferentes estrategias, siendo una de las más interesantes aquella que implica la presencia de sustancias naturales que impiden o retrasan el desarrollo de los cristales (inhibidores de la cristalización). La litiasis urinaria es un proceso patológico que se da como consecuencia de la combinación de diversos factores que aceleran la formación de cristales en la orina antes de que ésta abandone el sistema urinario. Cualquier circunstancia que aumente la saturación, disminuya los inhibidores de la cristalización o facilite los procesos de nucleación cristalina, puede favorecer el desarrollo de cálculos renales [1]. Más aún, las infecciones del tracto urinario promueven la formación de cálculos renales infectados, representando aproximadamente el 15% de todos los casos de litiasis urinaria, lo cual hace que sean un grupo importante y representativo [2]. El término “cálculo renal infectado” se conoce también con los nombres de: cálculo de estruvita, cálculo de ureasa o cálculo de triple-fosfato [3].

La presencia de obstrucción por cálculos en asociación con una infección urinaria requiere su inmediato alivio por cualquier intervención urológica. El tratamiento antimicrobiano en pacientes con infección de vías urinarias no siempre ofrece una supresión completa por aislarse microorganismos diferentes dentro del cálculo renal [4]. El objetivo de la intervención debe ser la erradicación de la infección y la desaparición del cálculo con la preservación de la unidad renal. Hoy en día los tratamientos preferidos son la cirugía percutánea y la litotripsia extracorporal por ondas de choque (LEOCH), también denominada litotricia extracorpórea. Estas técnicas pueden acompañarse de diferentes tratamientos para prevenir la infección recurrente y la formación subsecuente del cálculo. De hecho, en la actualidad, la LEOCH es útil para resolver ó complementar el tratamiento

del 80% de los cálculos renales y ureterales, convirtiéndose en el principal recurso terapéutico en el campo de la litiasis urológica [5].

Se ha reportado que la distribución de bacterias dentro de los cálculos de estruvita es relativamente uniforme y que las bacterias dentro de los intersticios del cálculo son considerablemente resistentes. Estudios mostraron que entre el 70% y el 90% de la remoción de cálculos de estruvita por cirugía abierta genera bacteriuria (bacterias en la orina) persistente post-intervención [3].

Los cálculos de estruvita y apatita son susceptibles a la pulverización mediante LEOCH. No obstante, se ha generado controversia en cuanto a las implicaciones bacteriológicas que puede tener dicha técnica. En estudios realizados en casos clínicos, Michaels, *et al.* [6] observaron disminución en la incidencia de bacteriuria después de la aplicación de tratamientos con LEOCH. Reportaron que la combinación de LEOCH y antimicrobianos reducía la recurrencia de infecciones urinarias asociadas con cálculos infectados. Pode, *et al.* [7] reportaron que la disminución en la incidencia de infecciones urinarias post-LEOCH se presentaba mayormente cuando los cálculos renales infectados tenían un diámetro menor que 2 cm. Lo anterior sugirió que en cálculos con un diámetro mayor que 2 cm, resultaba más probable que algunos fragmentos después de la aplicación de tratamientos con LEOCH no se eliminaran, lo cual conllevaba a la reincidencia de infecciones urinarias [8,9,10]. Bajo ese esquema, algunos autores [11,12] han sugerido que el uso de antibióticos profilácticos es necesario en la presencia de cálculos mayores que 2 cm de diámetro y/o cuando existe algún tipo de cuadro infeccioso urinario, antes de un tratamiento con LEOCH. Por otra parte, se ha descartado el riesgo de bacteremia (bacterias en la sangre) asociada a los tratamientos con LEOCH [13,14].

Tomando como base la inactivación microbiológica parcial en solución salina mediante ondas de choque [15,16,17,18], en esta tesis se investiga si un tratamiento de litotripsia extracorporeal – en principio - puede inactivar microorganismos contenidos en un cálculo renal. Esto es, se busca determinar la viabilidad de los microorganismos suspendidos en cálculos renales, asociada a los efectos de las ondas de choques.

Capítulo 1 Litotripsia extracorporal

1.1 Introducción

La litotripsia extracorporal por ondas de choque consiste en la generación y concentración de ondas de choque propagándose en agua para su aplicación en la fragmentación de cálculos renales. En este capítulo se detalla la generación de ondas de choque por rompimiento eléctrico en agua y mediante un arreglo de cristales piezoeléctricos, así como las características principales de los litotriptores utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis: el generador de ondas de choque experimental MEXILIT II y el litotriptor piezoeléctrico *Piezolith 2300*. Además se describe la interacción de una onda de choque con un objeto sumergido en agua o en alguna sustancia o material con propiedades acústicas similares (por ejemplo tejido biológico). Como ya se mencionó, no se cuenta aún con un modelo teórico capaz de describir con detalle dicha interacción.

1.2 Antecedentes históricos

La introducción de la fragmentación por ondas de choque en el campo de la litiasis urinaria es una de las mayores aportaciones terapéuticas en la historia de la urología. Cuando E. Schmiedt y los investigadores de Dornier iniciaron en 1963 sus experimentaciones sobre generación y transmisión de las ondas de choque, desconocían hasta qué punto se iban a modificar los patrones terapéuticos establecidos en la década de los 80. En los años 70 comenzó una intensa investigación experimental sobre la utilidad y los efectos colaterales de las ondas de choque. Se valoraron los efectos sobre distintos órganos y tejidos *in vitro* y en modelos animales. En 1980, Chaussy *et al.* trataron con éxito al primer paciente mediante LEOCH. En 1982 se presentó la primera serie amplia, con buenos resultados clínicos. Con el desarrollo del litotriptor Dornier HM-3 (Human Model) se inició en 1983 la creación de unidades de LEOCH y se empezó a extender como un procedimiento común dentro del tratamiento de la litiasis. Este proceso culminó con la aprobación por la “Food and Drug Administration” de los Estados Unidos (FDA) (1984) para la utilización del equipo Dornier HM-3. Las nuevas aportaciones técnicas en esta última década (litotriptores

de tercera generación, nuevas variedades de generación de ondas de choque, etc.) han consolidado el uso de la litotripsia extracorporal. En la actualidad la LEOCH es el principal recurso terapéutico en el campo de la litiasis urológica [5].

1.3 Ondas de choque

El término onda de choque es la propagación de un frente de choque, caracterizado por un cambio súbito del estado termodinámico del medio. Para aplicaciones médicas, la discontinuidad de presión puede ser de hasta 200 MPa [19,20]. Una onda de choque, del tipo usado en medicina, consiste en un pulso único de presión positiva P^+ , seguido por una reducción exponencial de la presión hasta el nivel de equilibrio P_0 , tras lo cual finaliza con una fase de presión negativa (P^-) de algunos microsegundos. Después del paso de la onda, la presión P_0 prevalece hasta que se emite la siguiente onda (Figura 1-1).

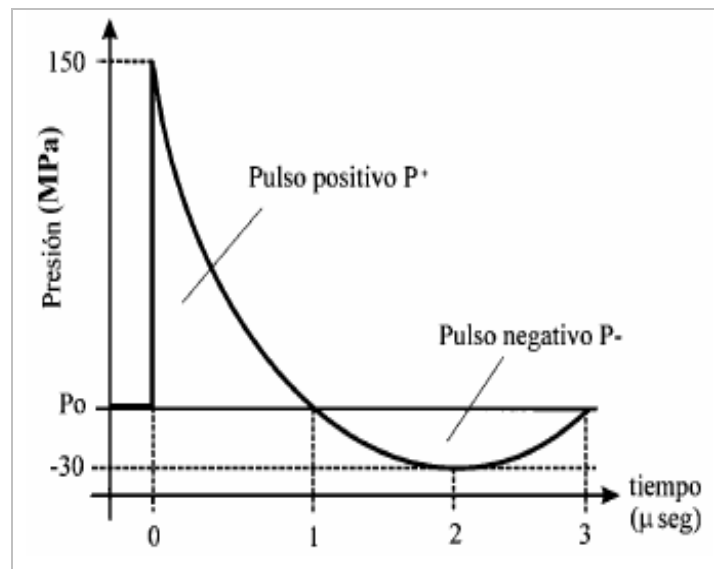


Figura 1-1 Variación de presión causada por una onda de choque.

1.4 Litotriptores extracorporales

Un litotriptor extracorporal es un dispositivo que permite la fragmentación de cálculos en las vías urinarias y biliares, mediante la generación y concentración de ondas de choque en agua. Todo litotriptor consta de cuatro elementos básicos, que pueden presentar diferentes características:

- 1) Fuente energética (descarga eléctrica, microexplosiones, láser, electromagnética o piezoeléctrica).
- 2) Concentrador de las ondas (reflector elipsoide, lente acústica, o fuente esférica).
- 3) Medio de transmisión con impedencia acústica similar a la del tejido biológico (recipiente o cojín con agua).
- 4) Sistema de localización litiásica (radiográfico o de ecografía).

La fuente energética es el elemento que define esencialmente las características del litotriptor. Existen dos variedades: a) *puntuales* (electrohidráulico, láser y producción de ondas mediante microexplosiones); y b) *ampliadas o extendidas* (electromagnético o piezoeléctrico).

La utilidad de las ondas de choque está en su concentración adecuada, lo cual se hace de acuerdo al método de generación. En los casos de fuentes puntuales, se utilizan reflectores elipsoidales, ya que la geometría de éstos permite captar gran parte de la onda de choque (más del 50%) y concentrarla en una región relativamente pequeña, logrando ahí presiones de hasta aproximadamente 150 MPa. Esta región, que se conoce como *foco terapéutico* o *foco dinámico* es el volumen dentro del cual, en cada punto, se tiene una presión igual o mayor que 50% del valor máximo. Una zona focal grande tiene la ventaja que se requiere menor exactitud en el ajuste de la onda de choque sobre el cálculo renal. Por otro lado, tiene la desventaja que una mayor parte del tejido queda expuesta a la energía de las ondas de choque. Cuando la zona focal es pequeña, el riesgo de daño al tejido vecino es menor, pero en este caso se requiere de una localización precisa del cálculo a destruir.

Otro factor importante es la frecuencia de repetición, la cual en los litotriptores electrohidráulicos es limitada a máximo 3 Hz. Si bien los litotriptores piezoeléctricos pueden funcionar con frecuencias de repetición mayores, la presión generada por los mismos cae a medida que la frecuencia aumenta. Arriba de 3 Hz el valor medio de la presión disminuye alrededor del 50% con respecto al valor de un solo disparo. El daño renal asociado a las ondas de choque es menor a medida que la frecuencia de repetición de

pulsos sea menor para el mismo número de pulsos entregados.

1.5 Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico

Al aplicar alto voltaje (del orden de 15 a 30 kV) a dos electrodos inmersos en agua, se crea un gas altamente ionizado, a una presión y una temperatura (2×10^4 °C) elevadas. Este plasma emite un continuo en el intervalo espectral electromagnético que va de 340 a 690 nm (UV y luz visible). La densidad de las partículas dentro de este canal de plasma formado entre los electrodos es tan elevada (del orden de un décimo de la densidad de un sólido) que la radiación emitida es característica más bien de un sólido que de un gas. Las fuerzas coulombianas entre las partículas son tan fuertes que el uso de la ley para los gases ideales no es válida como ecuación de estado. Las partículas que pueden encontrarse en el plasma son: moléculas de agua, de oxígeno, de hidrógeno y de ozono, átomos de oxígeno en todos los estados de excitación e ionización, átomos de hidrógeno en todos los estados de excitación, átomos de los electrodos en todos sus niveles de excitación e ionización, grupos OH e iones de hidrógeno negativos. La pared de este canal de plasma formado entre los electrodos no es una interfase gas-líquido. Más bien se trata de una región de transición con cierto espesor en la cual las características físicas varían en forma continua desde agua líquida fría hasta plasma altamente ionizado. La velocidad de las paredes del canal de plasma puede alcanzar algunos cientos de metros por segundo [19]. Los procesos previos a la formación del canal se caracterizan por un rápido aumento del voltaje entre los electrodos. Debido a la resistencia que inicialmente prevalece entre los electrodos, en un principio únicamente fluye una corriente muy pequeña, que forma un canal de plasma muy estrecho (fracciones de milímetros), constituido por gas eléctricamente neutro, altamente ionizado que contiene iones, electrones y partículas neutras. Posteriormente, la resistencia eléctrica baja por la ionización causada por el paso de electrones de alta velocidad que forman iones como resultado de colisiones electrón-átomo dentro del canal de plasma. Al bajar la resistencia eléctrica entre los electrodos, comienza a fluir una corriente muy grande y el canal de plasma se expande a velocidades supersónicas. En este instante se da una caída súbita del voltaje. El tiempo en el cual se origina el

rompimiento eléctrico es la suma de tres intervalos distintos. El primero es el tiempo necesario para el surgimiento de una formación de plasma. Este intervalo, durante el cual aún persiste la diferencia de potencial entre los electrodos, es variable y depende de las inhomogeneidades microscópicas de la superficie de los electrodos. El segundo intervalo es el tiempo que requiere la primera formación de plasma para atravesar la distancia entre electrodos. Finalmente, está el tiempo necesario para que se forme el canal conductor de plasma entre los electrodos. Este es el más corto de los tres. La suma de estos tres tiempos es del orden de los microsegundos y depende de la forma de los electrodos, de su separación, del voltaje inicial aplicado entre ellos y del fluido en el que se encuentran. A pesar de que prácticamente toda la energía eléctrica es cedida a la descarga en unos cuantos microsegundos, la emisión luminosa visible persiste por algunas decenas de microsegundos. Lo anterior permite suponer que la mayor parte de la energía entregada a los electrodos es almacenada dentro del plasma, disipándose con relativa lentitud al expandirse y enfriarse el canal formado. Además, la emisión de luz (electroluminiscencia) es una prueba de que algunos electrones alcanzan energías de 2 a 3 eV, lo cual es suficiente para la ionización.

Una vez que se ha formado el canal de plasma entre los electrodos, existen tres mecanismos a través de los cuales se disipa gradualmente la energía: el trabajo mecánico realizado por el plasma en la generación de una onda de choque, la disipación de energía por radiación y la conducción térmica, ya que cierta cantidad de calor fluye hacia el agua que rodea al plasma; sin embargo, las pérdidas debidas a este fenómeno son muy pequeñas y pueden despreciarse.

En la figura 1-2 se aprecia una secuencia de la generación de una onda de choque en agua. (a) Se genera el rompimiento eléctrico debido a la gran diferencia de potencial existente entre los electrodos. (b) Posteriormente se forma un canal cilíndrico de plasma cuya velocidad de expansión es mayor que la velocidad del sonido en el agua. (c) Seguidamente se aprecian las ondas de choque viajando a una velocidad mayor que la del sonido y la burbuja de plasma que aún se encuentra en expansión, pero ahora a una velocidad menor que la de la onda. (d) Finalmente, la burbuja se colapsa y la onda de choque se propaga esféricamente por el agua. Una vez formado el canal, éste aumentará

su tamaño hasta el instante en que la presión del agua lo haga colapsar, esto es, la presión del gas decrece hasta que la capa de agua comprimida se separa de la “burbuja”. La discontinuidad de presión generada (onda de choque) se propaga a través del medio.

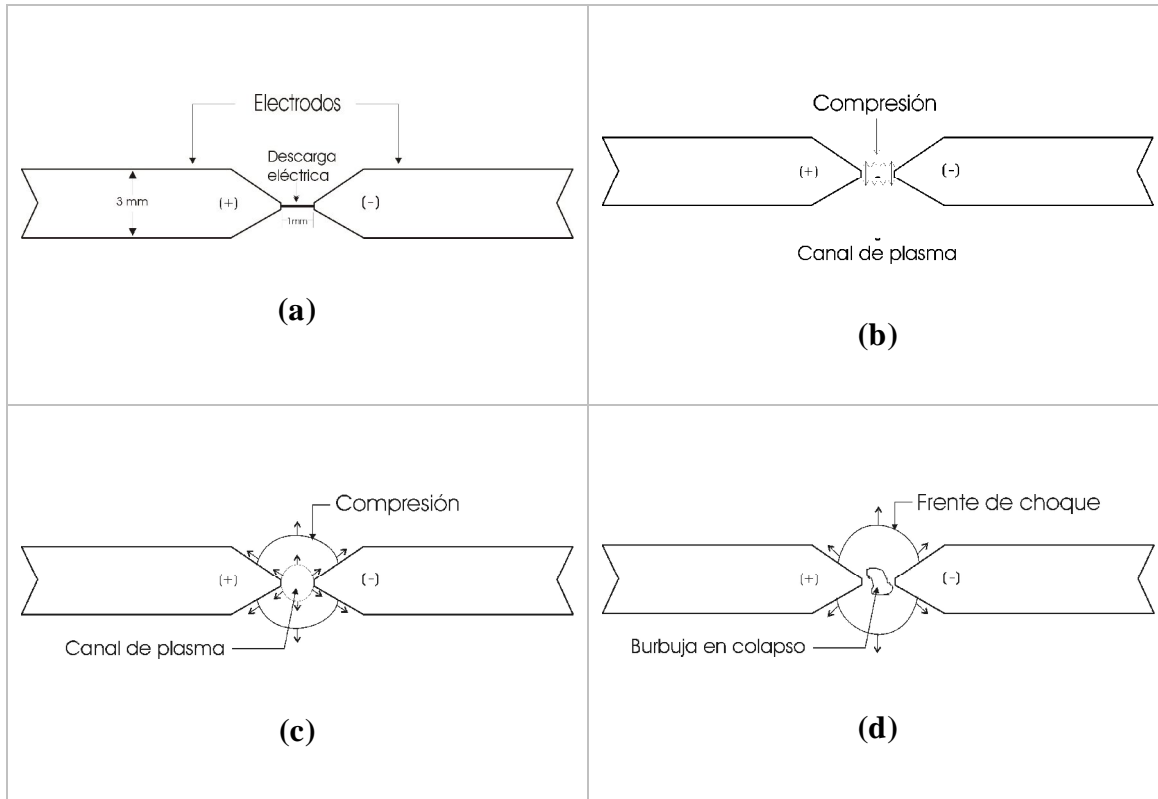


Figura 1-2 Secuencia de la generación de una onda de choque en agua

El colapso del plasma produce ondas secundarias que se registran después de la primera con una amplitud mucho menor. Este colapso es pulsante, sin embargo, la burbuja oscila solamente unas cuantas veces hasta que toda la energía se pierde. El período de oscilación depende de la energía liberada.

El tiempo de vida de la burbuja antes del colapso se compone de cuatro etapas que son: la formación y expansión, la etapa de equilibrio, la etapa de máximo desarrollo y finalmente la fase de contracción y colapso. La burbuja de cavitación se genera en fracciones de milisegundos después del rompimiento eléctrico inicial. Posteriormente, aumenta su volumen con una velocidad que decrece continuamente (ya que la presión interna de la burbuja disminuye con el incremento de volumen) hasta un instante (segunda etapa) en el cual permanece con volumen constante. Seguidamente sufre una

sobre-expansión y una consecuente caída de presión en su interior. La presión hidrostática del fluido circundante es ahora mayor que la presión interna del plasma. Este es el instante de máximo desarrollo, después del cual la burbuja reduce rápidamente su volumen, oscilando unas pocas veces hasta el colapso. Un instante antes del colapso final la burbuja pierde su forma esférica

Como se mencionó anteriormente, el colapso de la burbuja produce desplazamientos radiales de agua debido a su expansión y contracción. Estos desplazamientos son considerables a pesar de que las velocidades involucradas no se comparan con las de la etapa inicial. El cuadrado de la amplitud de la presión generada por la burbuja aumenta linealmente con la energía eléctrica cedida a los electrodos [19], esto es:

$$p^2 \propto \frac{1}{2} CU^2, \quad (1)$$

donde C es la capacitancia de los capacitores y U el voltaje aplicado a los electrodos.

En agua no desgasificada se llega a un punto de saturación, a partir del cual prácticamente ya no hay incrementos en la presión. Esto se debe a fenómenos de cavitación. Los sucesos durante la descarga eléctrica son análogos a los de un circuito oscilatorio RLC con la diferencia de que en este caso la resistencia (entre electrodos) es variable. En cuanto a la frecuencia de la onda de presión generada, debe recordarse que las ondas de choque no tienen un carácter oscilatorio, esto es, no tienen una frecuencia fija. En el caso aquí descrito el espectro de frecuencias va desde aproximadamente 200 kHz hasta 50 MHz.

1.5.1 Litotriptor electrohidráulico

En la LEOCH frecuentemente se usan ondas de choque generadas por descargas eléctricas en agua, ya que se caracterizan por la alta velocidad de expansión del plasma producido por la descarga y la relativa sencillez del generador. No obstante, presentan desventajas tales como: la variación de la energía al gastarse los electrodos, el cambio de electrodos que es necesario después de miles de descargas y las variaciones de presión de una descarga a otra.

Los litotriptores electrohidráulicos generan ondas de choque por medio de descargas eléctricas de alto voltaje en agua, entre dos electrodos situados en el primer foco (F1) de un reflector elipsoidal. La expansión del plasma producido en F1, forma una onda de choque que es concentrada en el segundo foco (F2) del reflector (Figura 1-3). Si el paciente se coloca sobre la camilla de manera que su cálculo coincida con F2, las ondas de choque pasan a través de su cuerpo con una atenuación mínima, se concentran sobre el cálculo renal y lo fracturan.

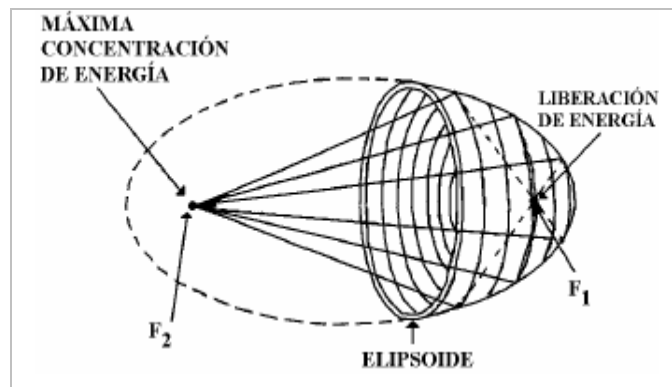


Figura 1-3 Concentración de una onda de choque utilizando un reflector elipsoidal.

El daño que sufren las concreciones en un litotriptor de electrodos es proporcional a nU^2 , donde n es el número de choques y U es el voltaje aplicado. Esto resulta lógico, ya que la energía almacenada en los capacitores es igual a $\frac{1}{2}CU^2$. Clínicamente muchas veces se opta por aumentar el número de descargas para disminuir lesiones al tejido circundante.

El generador de ondas de choque MEXILIT II es un equipo experimental diseñado en el Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM) con la finalidad de contar con un dispositivo capaz de simular el campo de presión de cualquier litotriptor electrohidráulico [21].

El MEXILIT II consiste básicamente en una tina de fibra de pruebas sobre una base de acero, con una pequeña grúa móvil de precisión montada sobre ella. Debajo de la tina se encuentra el circuito de descarga con los condensadores y un interruptor de chispa enfriado por aire. La tina de pruebas es un recipiente de fibra de vidrio con dimensiones internas de $120 \times 80 \times 60 \text{ cm}$, con cuatro ventanas de vidrio (Figura 1-4 a).

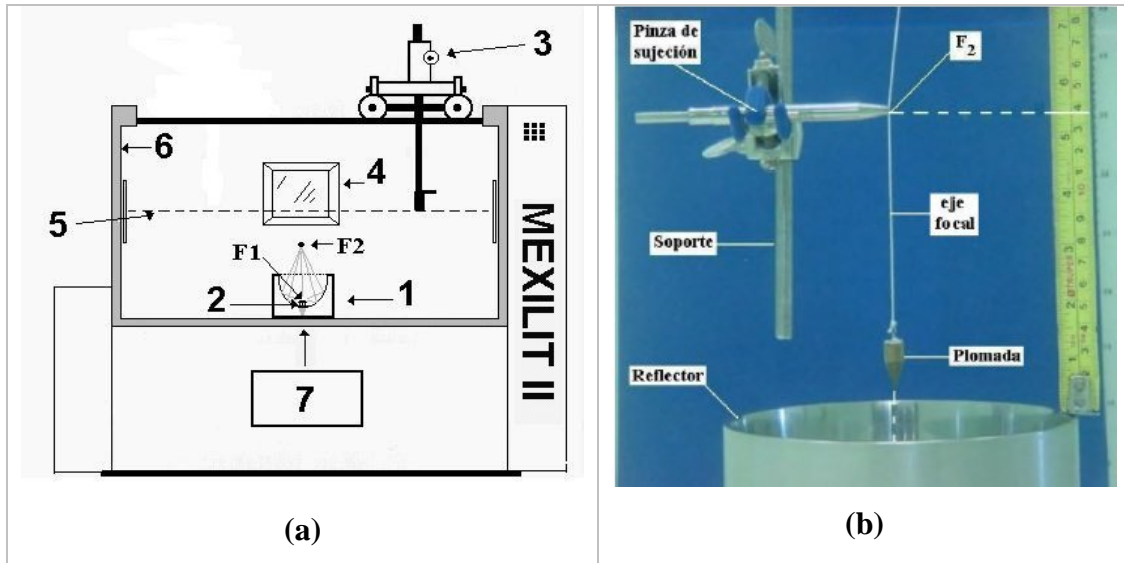


Figura 1-4 (a) Esquema del MEXILIT II: (1) reflector elipsoidal, donde F2 es el foco terapéutico, (2) bujía, (3) grúa de precisión, (4) ventana de vidrio –una en cada cara de la tina-, (5) nivel de agua, (6) tina de fibra de vidrio, (7) circuito eléctrico. (b) Sistema de localización de foco terapéutico del reflector.

La pequeña grúa móvil de precisión tiene el fin de sujetar adecuadamente los objetos que se desean exponer a las ondas, llevándolos a casi cualquier posición dentro de la tina. La grúa consiste en dos carros con ruedas de nylon que se desplazan horizontalmente sobre rieles redondos de acero inoxidable. Uno de los carros corre a lo largo de la tina. Este carro a su vez tiene en su parte posterior y anterior dos rieles paralelos, sobre los cuales se desplaza el segundo carro, permitiendo así el movimiento en el otro eje horizontal. El tercer grado de libertad se obtiene haciendo girar un piñón con cremallera que mueve una barra en dirección vertical, permitiendo posicionar al objeto dentro del foco terapéutico del reflector usado. En el extremo de esta barra se fija una pinza portaobjetos de tres brazos. Los tres grados de libertad de este arreglo permiten sujetar prácticamente cualquier objeto menor como, por ejemplo, un cálculo renal artificial (Figura 1-4 b).

Una de las ventajas que ofrece el MEXILIT II es el uso de un gran número de reflectores intercambiables con geometrías diversas (Figura 1-5 a), así como variar el voltaje y la frecuencia de los pulsos generados en un intervalo grande. El cambio de reflectores y de electrodos es un proceso independiente, rápido y relativamente sencillo.

En la figura 1-5 b se aprecia la generación y concentración de una onda de choque, así

como el pulso de luz generado por la descarga eléctrica.

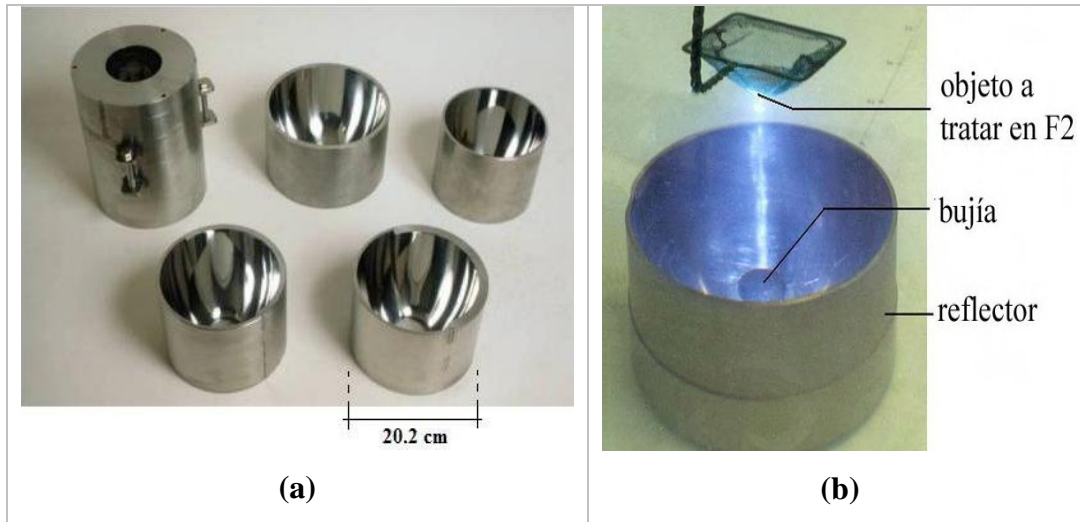


Figura 1-5 (a) Reflectores usados en el MEXILIT II. (b) Generación y concentración de una onda de choque en el MEXILIT II.

La parte fundamental del MEXILIT II es el circuito eléctrico de descarga, formado por un arreglo de 8 capacitores intercambiables de 10 nF cada uno, conectados en paralelo (Figura 1-6 a). Cada uno puede soportar como máximo un voltaje de 30 kV. La energía eléctrica almacenada es del orden 10 a $10^2 J$. Los principales elementos del sistema eléctrico son una fuente de alto voltaje, un oscilador y transmisor óptico, un convertidor optoelectrónico con fuente de alto voltaje, un disparador y uno o varios condensadores.

El circuito consta de dos partes: una de ellas destinada a cargar los condensadores y, por otro lado, el sistema que controla la frecuencia y el instante en que se generan las descargas. La fuente de alto voltaje carga el condensador o los condensadores a través de una serie de resistencias de alto voltaje. Cuando se han cargado los condensadores al voltaje deseado, se acciona el oscilador, el cual emite un pulso óptico que se transmite por una fibra óptica hasta llegar al convertidor optoelectrónico. Aquí la señal óptica se transforma en un impulso de alto voltaje que llega al interruptor de chispa o “spark gap” y lo acciona, provocando que los condensadores se descarguen a través de los electrodos de la bujía dentro de la tina (Figura 1-4 a). El voltaje, la frecuencia de disparo y el número de descargas son controladas desde una consola de mando (Figura 1-6 b).

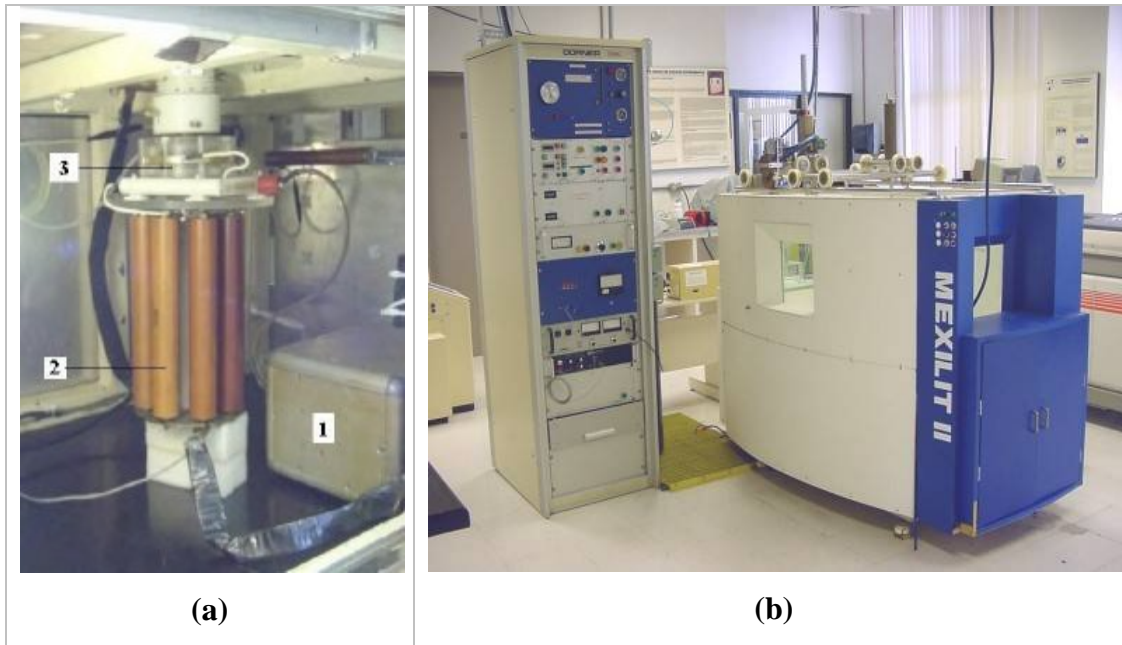


Figura 1-6 Componentes del MEXILIT II. (a) Circuito eléctrico de descarga: (1) “spark gap driver”, (2) arreglo de capacitores, (3) interruptor de chispa; (b) consola de mando y generador de ondas de choque.

La bujía (Figura 1-7 a) se introduce a presión en el reflector y en el fondo de la tina simultáneamente. Una vez descargado el arreglo de condensadores, la fuente de alto voltaje lo carga nuevamente al valor previamente establecido, para que el siguiente impulso óptico, proveniente del oscilador, repita el proceso descrito. En la figura 1-7 b se aprecia el pulso de luz generado por una descarga eléctrica de 25 kV entre los electrodos de tungsteno, separados 1 mm.

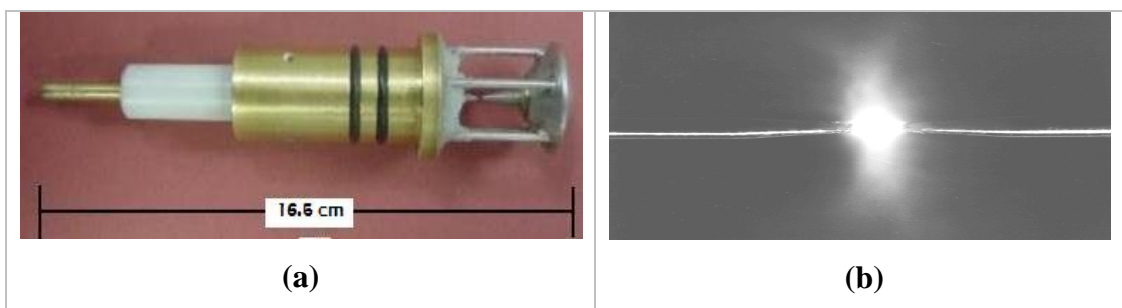


Figura 1-7 (a) Bujía para generar descarga eléctrica. (b) Pulso de luz generado por la descarga eléctrica de 25 kV entre los electrodos de la bujía (Foto: A. Sánchez).

1.6 Generación de ondas de choque en agua por método piezoeléctrico

Los generadores piezoeléctricos están formados por un circuito de carga y disparo análogo al del método electrohidráulico, pero en este caso la descarga en lugar de ocurrir entre dos electrodos inmersos en agua, actúa sobre un plato esférico que contiene un arreglo de aproximadamente 3000 cristales piezoeléctricos. Al expandirse súbitamente, el arreglo de cristales puede comprimir fuerte y rápidamente al medio que lo circunda y generar una onda de compresión, que al ser concentrada puede degenerar en una onda de choque. Todos los cristales están conectados en paralelo y cubiertos por una capa de material aislante e impermeable al agua (Figura 1-8).

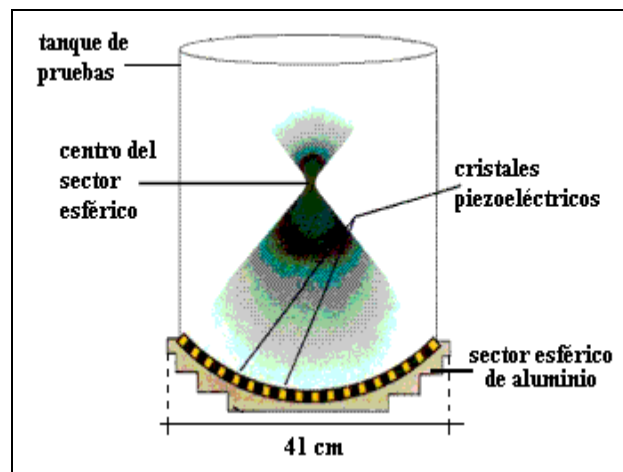


Figura 1-8 Esquema simplificado de un generador de ondas de choque piezoeléctrico.

Al generar la descarga, se aplica abruptamente una diferencia de potencial eléctrico a los cristales, que los deforma momentáneamente transmitiéndose energía mecánica al agua del contenedor. Debido a que los cristales están distribuidos sobre la superficie de un sector esférico (fondo del tanque), la energía liberada por cada uno de los cristales se concentra en el centro (o foco) de dicho sector, logrando así presiones puntuales elevadas (entre aproximadamente 30 y 100 MPa).

El circuito de descarga para la excitación de los cristales piezoeléctricos se ilustra en la figura 1-9. La fuente de alto voltaje carga al capacitor C_1 a través de la resistencia R_1 , a un voltaje de entre 5 y 10 kV; el cual posteriormente se descarga al ionizar el “spark gap”

debido al pulso que recibe del controlador de disparo (“spark gap driver”). La resistencia R_2 limita la corriente que recibe el arreglo de cristales durante la descarga [22].

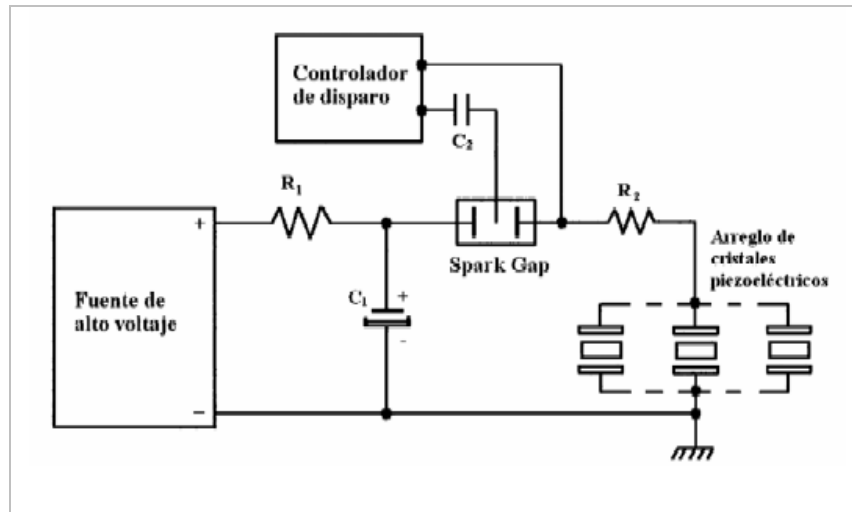


Figura 1-9 Diagrama de un generador de ondas de choque piezoeléctrico. (Cortesía: Ing. Arturo Méndez)

1.6.1 Litotriptor piezoeléctrico

El litotriptor piezoeléctrico comercial *Piezolith 2300* (Richard Wolf, Knittlingen, Alemania) se compone de una camilla de tratamiento, montada directamente sobre el gabinete con ruedas que contiene al generador (arreglo de cristales piezoeléctricos montados sobre un cascarón esférico (Fig. 1-10)) y al equipo de ecografía, y una consola de mando con su monitor. La localización del cálculo y el monitoreo del tratamiento en tiempo real se efectúan con dos sondas ecográficas, una caudal y otra craneal, montadas isocéntricamente y a la misma distancia del centro del generador dentro del generador. Ambas sondas pueden moverse hacia el foco terapéutico o retroceder a su posición de estacionamiento. El conjunto de generador y sondas ecográficas puede girar en torno al foco terapéutico. Ambas ecosondas pueden girar 90° sobre su propio eje, generando con ello dos imágenes en planos ortogonales.

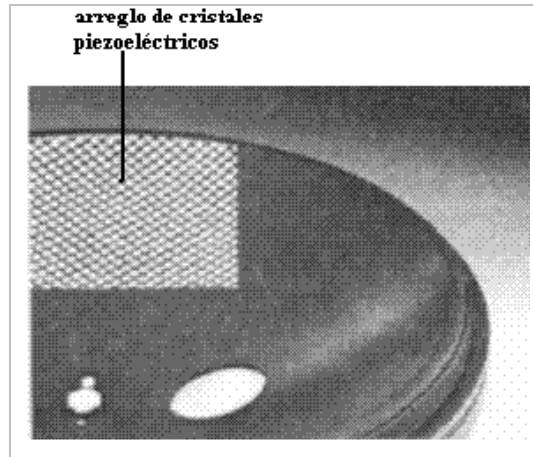


Figura 1-10 Fotografía que muestra parte del arreglo de cristales piezoeléctricos del generador Piezolith 2300 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania).

El *Piezolith 2300* se opera desde una consola de mando. Un monitoreo del tratamiento en tiempo real permite verificar que la aplicación de las ondas de choque se efectúe únicamente cuando el cálculo se encuentre en el foco terapéutico del generador [21].

1.7 Fenomenología de la interacción de ondas de choque en agua con la materia

Para la fragmentación de un cálculo, en teoría no es indispensable generar una onda de choque. El único requisito es tener suficiente energía mecánica. La onda de choque concentrada es la única posibilidad para alcanzar las presiones requeridas. En la litotripsia extracorporel las ondas de choque se generan en agua, principalmente por tres razones: 1) las propiedades acústicas de los tejidos y órganos del cuerpo humano son muy parecidas a la del agua. Lo anterior implica que la onda de choque generada en agua podrá penetrar en el tejido blando del paciente sumergido en agua (o en contacto con ésta a través de una membrana) sufriendo un mínimo de reflexiones. No obstante, se ha sugerido una reducción del 15% al 40% de la amplitud del pulso de presión durante su trayecto hasta el riñón [23]; 2) la compresibilidad de un líquido es mucho menor que la del aire, y 3) el agua es un líquido económico, fácil de manejar y obtener.

Cuando la onda se propaga a través de un medio, parte de su energía es absorbida debido a la fricción, causando una reducción en la presión e intensidad de la onda. La reducción de

la presión puede ser calculada por $P = P_0 \exp(-\alpha x)$, donde x indica la profundidad en centímetros, P_0 es la presión inicial, y α es el coeficiente de absorción. Considerando que el coeficiente de absorción de un medio biológico viene dado por $\alpha = bf^m$ (b y m son constantes, f es la frecuencia) [24], las ondas de alta frecuencia serán absorbidas mayormente que las ondas de baja frecuencia. En vista de las características físicas de estas ondas, la absorción sónica en tejidos biológicos es muy baja. La mayoría de los tejidos biológicos, tienen un valor de $1 < m < 2$. La intensidad $I = I_0 \exp(-2\alpha x)$, disminuye rápidamente al tiempo que la frecuencia aumenta; I_0 es la intensidad incidente. I es la intensidad de la onda a una profundidad x . Dado que las ondas de choque tienen frecuencias menores comparadas con las de ultrasonido, las primeras tienen un mayor poder de penetración. A pesar de que las frecuencias bajas poseen una mayor capacidad de penetración, no son deseables por sus efectos traumáticos. Para estas frecuencias, la amplitud de oscilación de las partículas es varios órdenes de magnitud mayor para una misma intensidad, ocasionando dolor. Los efectos traumáticos de una onda de choque están relacionados con su espectro de frecuencias, mientras que los efectos terapéuticos (en este caso desintegración de concreciones) están relacionados con su espacio temporal. En base a la experiencia, se considera que frecuencias mayores que los 200 kHz son terapéuticas, las frecuencias menores que 20 kHz producen daño considerable al tejido y las frecuencias entre 20 y 200 kHz no tienen utilidad para este tipo de aplicaciones [21].

Cuando una onda de sonido golpea la interfase entre dos medio de impedancia Z_a y Z_b , parte de la onda es reflejada y parte transmitida. Los coeficientes de transmisión y reflexión en la interfase entre los dos medios son

$$P_r/P_i = (Z_b - Z_a)/(Z_a + Z_b), \quad (2.a)$$

$$P_t/P_i = 2Z_b/(Z_a + Z_b). \quad (2.b)$$

respectivamente, donde P_i , P_r y P_t son la amplitud de la presión de las ondas incidente, reflejada y transmitida. Por condiciones de frontera, las intensidades cumplen

$$I_r/I_i = (Z_b - Z_a)^2 / (Z_a + Z_b)^2, \quad (3.a)$$

$$I_t/I_i = 4Z_a Z_b / (Z_a + Z_b)^2. \quad (3.b)$$

respectivamente. La intensidad I es definida como la energía atravesando una unidad de área por unidad de tiempo,

$$I = \frac{1}{2} \rho v A^2 (2\pi f)^2 = \frac{1}{2} Z (A\omega)^2 = \frac{P_0^2}{2Z}, \quad (4)$$

donde f, ω, A y P_0 representan la frecuencia, la frecuencia angular, la amplitud del desplazamiento máximo de los átomos o moléculas, y el máximo cambio en la presión. La impedancia acústica Z es definida como el producto de la densidad ρ con la velocidad de la onda v , ó, en términos del modulo de elasticidad de Bulk B , $Z = (B\rho)^{1/2}$.

Lo anterior explica por qué, cuando una onda se propaga de un medio de impedancia acústica baja a un medio de impedancia acústica mayor como, por ejemplo, de tejido blando ($Z \approx 1.6 \times 10^6 \text{ kg/m}^2/\text{s}$) a hueso ($Z \approx 5.9 \times 10^6 \text{ kg/m}^2/\text{s}$), la amplitud de la presión de la onda transmitida es mayor que la de la onda incidente (Ecs. 2.a, 2.b); sin embargo, la energía transmitida es mucho menor que la de la onda incidente (Ecs. 3.a, 3.b). La parte que penetra continúa propagándose como una onda de compresión debido a que la impedancia acústica del cálculo es mayor que la del tejido. Por otra parte, cuando la onda viaja del cálculo renal (Z entre 2×10^6 y $5 \times 10^6 \text{ kg/m}^2/\text{s}$) a tejido blando u orina ($Z \approx 1.4 \times 10^6 \text{ kg/m}^2/\text{s}$), la amplitud de la presión de la onda transmitida es menor que la de la onda incidente. La parte reflejada sufre un cambio de signo, esto es, ocurre una reflexión de ondas que se superpone con la onda incidente (Figura 1-11) [24, 25].

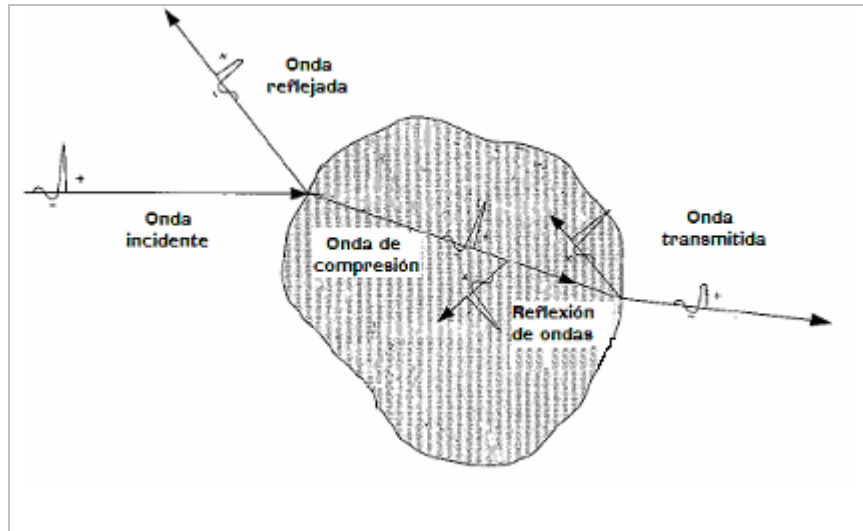


Figura 1-11 Comportamiento de una onda de choque en dos interfaces: tejido-cálculo renal y cálculo renal-tejido.

Actualmente se piensa que existen principalmente tres efectos involucrados en la fragmentación extracorporeal de los cálculos renales: el efecto Hopkinson, la cavitación acústica y la compresión [21,24].

El efecto Hopkinson es la fractura y el descascarillado de material que ocurre cerca de una superficie libre, relativamente alejada del lugar de entrada de la onda de choque. Esta fractura es causada por ondas de dilatación originadas por reflexiones de la onda incidente en la interfase objeto-agua o tejido. La diferente consistencia entre el objeto y el tejido o el agua crea una onda transmitida de presión positiva que se aleja y otra reflejada, de presión negativa, viajando en sentido opuesto a través del objeto. Esto produce un cambio de presión relativamente grande en una región muy pequeña y la consecuente fractura del material.

Para lograr mejores resultados, la duración de la onda de choque debe ser menor que el tiempo de recorrido a través del objeto, evitando así superposiciones de la onda incidente con la onda reflejada en la cara posterior, ya que esto podría disminuir o anular los esfuerzos por tracción. Esto es, la duración del pulso debe satisfacer la relación [19]

$$\tau < \frac{d}{v}, \quad (5)$$

donde d es el “diámetro” de la piedra y v la velocidad de la onda en su interior. La velocidad de propagación de una onda de choque en un cálculo renal es de aproximadamente 3300 m/s, lo cual da un tiempo de aproximadamente 2.4 ms para atravesar un cálculo de 8 mm de diámetro.

El efecto Hopkinson depende directamente de la presión máxima de la onda de choque, de la duración del pulso y del tipo de superficies sobre las que actúa. La máxima tensión por tracción que puede transmitirse por agua u orina, es de aproximadamente 1 atm por debajo de la presión de equilibrio. Para presiones más bajas aparecen efectos de pseudocavitación, como se verá más adelante. Una tensión de una atmósfera por lo general no es suficiente para fracturar un cálculo renal, lo cual significa que no es posible transmitir por agua una onda de dilatación suficientemente intensa para fragmentar un cálculo. A pesar de esto, se ha logrado la destrucción de concreciones dentro del cuerpo humano, gracias al efecto Hopkinson y al hecho de que una onda de compresión muy intensa sí puede ser transmitida por el líquido, transformándose por reflexión en una dilatación intensa dentro del cálculo. Esta onda de dilatación destruye la sección posterior del cálculo varios milisegundos después del paso de la onda de choque original. Así se logra fracturar cálculos usando aproximadamente un décimo de la amplitud de presión que se necesitaría para lograr el mismo efecto con una compresión pura.

El efecto Hopkinson no es el único mecanismo relacionado con la destrucción del cálculo. Una evidencia es el hecho de que la parte anterior de la concreción siempre es destruida antes que cualquier otra. La onda de compresión incidente crea esfuerzos considerables sobre la cara expuesta, similarmente al golpe de un martillo. En realidad los materiales no son perfectamente elásticos. La fricción interna causa atenuación a las ondas que viajan por el objeto. Las discontinuidades y las porosidades también atenúan a la onda de dilatación.

La compresión directa también puede causar daños importantes a un cálculo renal durante una litotripsia extracorporal. La onda de choque que viaja a través del cálculo lo hace con una velocidad mayor que aquella que continúa su trayectoria través del tejido o la orina fuera de él. Debido a esto, la onda interna se adelanta a la onda externa, generándose diferencias de presión considerables que comprimen al cálculo, contribuyendo a su fractura. Este efecto se conoce como compresión circunferencial. La cara del cálculo a través de la

cual penetra la onda de choque siempre es destruida antes que cualquier otra.

Finalmente se menciona la cavitación. Existen dos tipos: la pseudocavitación es la formación de burbujas a partir de los gases disueltos en el líquido. La cavitación real se refiere al desgarramiento de los enlaces moleculares del fluido. Con el paso de una onda de choque, las burbujas se comprimen súbitamente por la acción del pulso positivo P^+ . Posteriormente, la presión disminuye drásticamente hasta alcanzar un punto de presión negativo P^- y las burbujas aumentan su volumen miles de veces (Figura 1-12). El tiempo en el que una burbuja alcanza su volumen máximo es aproximadamente de 50 μs . Posteriormente permanece estable entre 200 y 600 μs hasta que colapsa violentamente, produciendo ondas de choque secundarias y pequeños chorros de líquido que alcanzan velocidades entre 150 y 400 m/s [26].

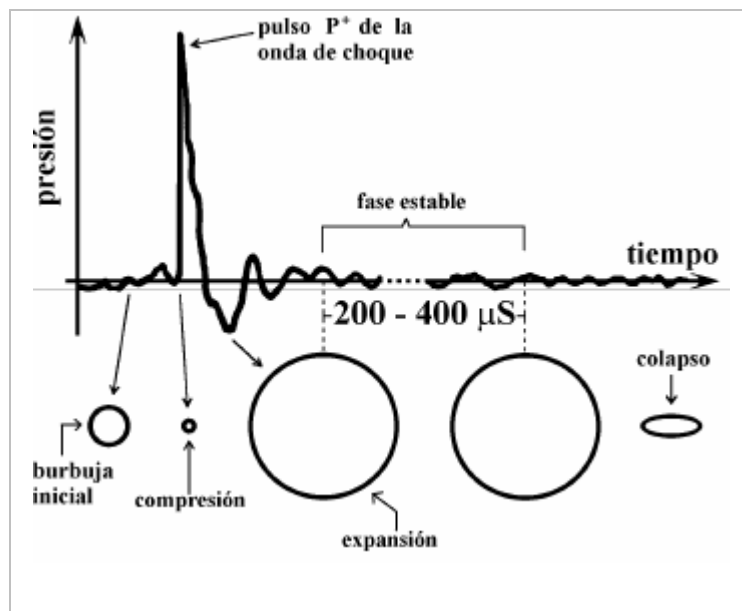


Figura 1-12 Cavitación generada por el paso de una onda de choque.

La cavitación se produce como resultado de la incapacidad de los líquidos de soportar presiones negativas muy grandes y cuando sucede, resulta una gran concentración de energía acústica en un volumen muy pequeño. El umbral para la generación de cavitación depende de dos parámetros: la duración y la magnitud del pulso de rarefacción o presión “negativa”. Un pulso corto genera burbujas pequeñas que se colapsan más rápido que las burbujas grandes generadas por pulsos largos. Al colapsarse, estas burbujas, pueden llegar a

medir algunas micras. A pesar de que la energía de cavitación para una cavidad es pequeña, debe considerarse que está concentrada en un volumen sumamente pequeño, originando una densidad de energía muy elevada, con un gran poder para crear daño. El colapso de las burbujas es tan violento que la burbuja se destruye. Durante este colapso, un chorro o jet de líquido penetra en el interior de la burbuja, formando momentáneamente un toroide de vapor que a su vez se colapsa. Este microchorro energético se forma debido a la inestabilidad de la burbuja en colapso. Generalmente la cavitación no destruye objetos directamente. Más bien causa pequeñas fisuras y huecos en la superficie de éstos debido a que se crean esfuerzos muy grandes. El daño al cálculo es originado tanto por la onda de choque creada por el colapso de la burbuja como por los chorros microscópicos de líquido que se forman debido al colapso asimétrico de estas cavidades. El daño consiste en una deformación inicial debida al impacto, seguida de un astillamiento y desgarramiento producidos por el flujo de líquido a través de la superficie. En la figura 1-13 se ilustra el mecanismo de fragmentación litiásica. La presión que generan estos microchorros es proporcional a la densidad del líquido, a la velocidad de la onda de compresión en el líquido y a la velocidad del microchorro.

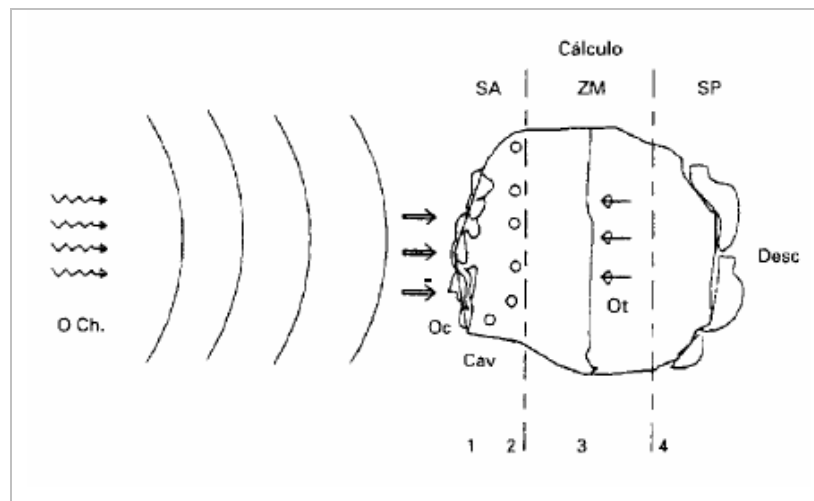


Figura 1-13 Dibujo esquemático de la fragmentación litiásica. O Ch: Ondas de choque; SA: Superficie anterior del cálculo; ZM: Zona media del cálculo; SP: Superficie posterior del cálculo; 1. Oc: Acción de ondas compresivas; 2. Cav: Fenómeno de cavitación (microchorros); 3. Ot: Reflexión de ondas. Plano de fractura; 4. Desc: Descascarillado

La cavitación puede formarse dentro del tejido biológico (*in vivo* e *in vitro*), causando

lesiones irreversibles. Es necesario que durante un tratamiento de litotripsia extracorporal se reduzca al mínimo el daño producido al tejido que rodea al cálculo renal, por lo que se requiere que las ondas de choque tengan las siguientes características:

- a) contener un mínimo de componentes de tracción,
- b) la intensidad de la onda debe aproximarse a la resistencia del objeto a ser comprimido,
- c) la intensidad de la onda debe ser inferior al nivel de tolerancia del tejido,
- d) la componente negativa de la onda debe ser lo menor posible.

Capítulo 2 Principios básicos de urología

2.1 Introducción

En este capítulo se describe, de forma básica, el sistema urinario. También se da información general en relación al proceso de formación de los cálculos renales, no infectados e infectados, así como referente a las infecciones del tracto urinario.

2.2 Sistema urinario

El tracto urinario, o sistema urinario, está formado por los riñones, los uréteres, la vejiga y la uretra. Su función es remover impurezas de la sangre y eliminarlas, junto con el exceso de fluidos del cuerpo, en forma de orina.

Los riñones son un par de órganos de color pardo-rojizo, de unos 10 cm de longitud, situados en la parte posterior de la región lumbar del abdomen, a ambos lados de la columna vertebral. Tienen forma de fríjol, con los bordes cóncavos enfrentados, por los cuales entran las arterias renales y salen las venas renales y los uréteres. Cada riñón está formado por un gran número de tubos microscópicos (*nefronas*), unidos entre sí mediante tejido conjuntivo. Las nefronas son las unidades estructurales y funcionales del riñón. La morfología del riñón es el resultado de la disposición de las nefronas y la fisiología renal es el resultado del funcionamiento de las mismas.

Los uréteres son dos largos conductos, que salen de las pelvis renales y desembocan en la vejiga urinaria. Los músculos de las paredes de los uréteres se contraen y relajan continuamente para forzar la orina hacia abajo, lejos de los riñones. Si la orina se acumula, o estanca, puede desarrollarse una infección en el riñón. Aproximadamente cada 10 a 15 segundos, los uréteres vacían cantidades pequeñas de orina hacia la vejiga. La vejiga urinaria es un órgano musculoso y hueco, situado en la parte inferior del abdomen, descansando en el pubis. Está sostenida por ligamentos unidos a otros órganos y a los huesos de la pelvis. Las paredes de la vejiga se relajan y dilatan para acumular la orina, y se contraen y aplanan para vaciarla a través de la uretra. La uretra

es un canal que se comunica con el exterior y, en su punto de unión con la vejiga, posee un doble esfínter que controla la expulsión de la orina. (Figura 2-1)

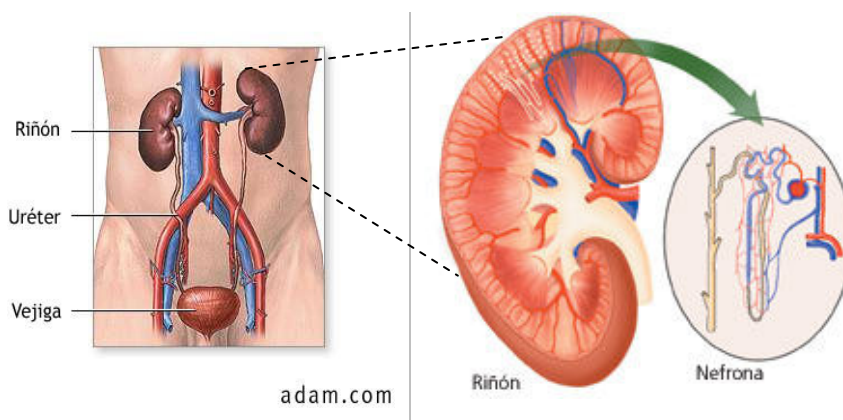


Figura 2-1 Sistema urinario

Como consecuencia del catabolismo celular los animales producen sustancias de desecho (CO_2 , NH_3 , urea, ácido úrico, etc.) que deben ser excretadas, pues no sólo son inútiles para el organismo, sino que pueden llegar a resultar perjudiciales. En los vertebrados, el riñón tiene la misión de eliminar la mayoría de dichas sustancias, pero también es un órgano de especial importancia en el mantenimiento de la homeostasis, ya que es el encargado de regular el volumen total y la composición de los líquidos. Ambas funciones las realiza mediante la elaboración de la orina. La filtración ocurre en las nefronas. Cada riñón tiene alrededor de un millón de nefronas. En la nefrona, el glomérulo -que es un pequeño ovillo de capilares sanguíneos- se entrelaza con un pequeño tubo colector de orina llamado túbulo. Se produce un complicado intercambio de sustancias químicas a medida que los desechos y el agua salen de la sangre y entran al sistema urinario. Al principio, los túbulos reciben una mezcla de desechos y sustancias químicas que el cuerpo todavía puede usar. Los riñones miden las sustancias químicas, tales como el sodio, el fósforo y el potasio, y las envían de regreso a la sangre que las devuelve al cuerpo. De esa manera, los riñones regulan la concentración de esas sustancias en el cuerpo. Las concentraciones excesivas pueden ser perjudiciales dando lugar, por ejemplo, a la formación de cálculos renales [27].

2.3 Litiasis urinaria

La litiasis urinaria es una enfermedad causada por la presencia de concreciones en el sistema urinario. La nefrolitiasis se refiere sólo a cálculos o concreciones en los riñones y en la pelvis renal (cálculos renales); la urolitiasis, a cálculos en la pelvis o en cualquier parte de la vía urinaria (vejiga, uréter, uretra).

Un cálculo urinario es una concreción que consiste en una colección de pequeños cristales de oxalatos, fosfatos, carbonatos o uratos y menos frecuentemente de cistina. El cálculo puede permanecer en el riñón o moverse y descender por el tracto urinario. Debido a que pueden pasar años para la formación de un cálculo renal, los cristales pueden irse aglomerando de tal suerte que van formando intersticios entre sí. En la litiasis intervienen muchos factores, tales como la infección y la estasis de las vías excretoras. Estos factores pueden clasificarse en dos grandes grupos: I) factores inherentes a la composición de la orina (elevada concentración de determinadas sustancias tales como: calcio, oxalato, fosfato, ácido úrico; pH urinario alterado; un volumen urinario pequeño y un déficit de inhibidores de la cristalización -citratos, magnesio, pirofosfatos-); y II) factores relacionados con la morfoanatomía renal (cavidades renales con baja eficacia urodinámica manteniendo así retenida la orina durante tiempos prolongados (estasis), y alteraciones del epitelio que tapiza la papila renal). Los cálculos renales, independientemente de su composición química, se pueden clasificar en dos grandes grupos, los cálculos formados sobre la pared renal (especialmente la papila), a los que se hace referencia como cálculos papilares, y los cálculos desarrollados en una cavidad renal, denominados cálculos de cavidad (Figura 2-2). Todos los cálculos papilares presentan un punto de unión a la pared renal claramente distinguible, contrariamente a lo que ocurre con los cálculos de cavidad [28,29].

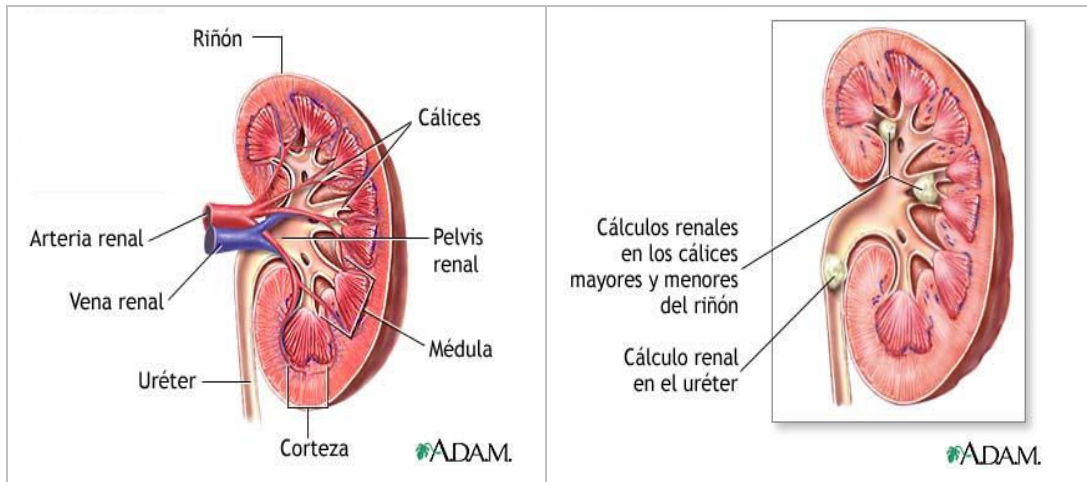


Figura 2-2 Ubicación de cálculos renales en el sistema urológico

En general, el término “cálculo infectado” se refiere a concreciones compuestas de fosfato amónico magnésico y apatita de carbonato. Este término se conoce también con los nombres de: cálculos de estruvita, cálculos de ureasa y cálculos de triple-fosfato [3].

La condición básica en la formación de estos cálculos es una infección del tracto urinario en la que se aísla ureasa. Existen distintos tipos de bacterias, que al desarrollarse en el sistema urinario, hidrolizan la urea presente en la orina, generando amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco se hidroliza posteriormente para liberar ión amonio en forma de hidróxido amónico. Simultáneamente, se produce la hidrólisis del dióxido de carbono que queda en equilibrio con el bicarbonato y con los aniones carbonato. La presencia de bicarbonato alcaliniza la orina por lo que se movilizan los fosfatos urinarios para intentar compensarla, formándose así fosfato amónico que capta el magnesio urinario libre y calcio, dando lugar al fosfato amónico magnésico y al fosfato cálcico respectivamente. La ureasa no es consumida en las reacciones anteriores por lo que una sola molécula puede catalizar la hidrólisis de múltiples moléculas de urea. Tales condiciones originan la formación de cristales de apatita y estruvita. Cuando estos cristales se depositan y sobresaturan entre ellos, se forman cálculos infectados (Tabla 2-1). Los cálculos que se producen debido a infecciones del tracto urinario son aproximadamente el 15% de todos los casos de litiasis urinaria, lo cual hace que sean un grupo representativo [2].

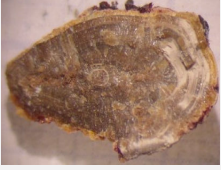

Cálculo de oxalato cálcico monohidratado (cálculo no infectado)		Cálculo de estruvita (cálculo infectado)		
<i>Componentes minoritarios:</i>	hidroxiapatita materia orgánica ácido úrico anhidro		hidroxiapatita materia orgánica	
<i>Punto de anclaje:</i>	NO		NO	
<i>Tipo de cálculo:</i>	de cavidad		infeccioso sedimentario	
Características				
<i>Localización:</i>	cavidad renal con baja eficacia urodinámica		cáliz renal	
<i>Condiciones de formación:</i>	<ul style="list-style-type: none"> déficit de inhibidores 		<ul style="list-style-type: none"> amonio urinario elevado (infección urinaria) pH > 6.5 	

Tabla 2-1 Características de dos tipos de cálculos renales: infectado y no infectado

Recientemente se ha postulado la teoría de las *nanobacterias* (bacterias visibles únicamente con microscopio electrónico de barrido) como causa potencial de los cálculos urinarios [30,31,1]. Los datos sugieren que las calcificaciones extraóseas, incluidos los cálculos urinarios, se originan a partir de un nido central de carbonato de apatita. Se ha demostrado que las nanobacterias excretan o producen carbonato de apatita *in vitro* e *in vivo*, posiblemente ligándolo para formar el nido. Aunque este concepto tiene un potencial inmenso, en la actualidad existen pocos datos que apoyen una etiología universal para la litiasis.

2.4 Infección del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son el resultado de la interacción de la virulencia bacteriana y de los factores biológicos y de conducta del huésped. Es una de las infecciones bacterianas más frecuentes en la población general, engloba a un amplio espectro de situaciones clínicas, que van desde la bacteriuria asintomática hasta los

abscesos perinefríticos con sepsis. Es importante hacer una diferenciación entre estos síndromes, por sus implicaciones terapéuticas y pronósticas. El término de bacteriuria se refiere a la presencia de bacterias en la orina, lo que no siempre implica ITU. Es frecuente la contaminación de la muestra con gérmenes de la uretra anterior o de la región perineal en el momento de la micción. Para diferenciar entre bacteriuria por contaminación y por infección, se utiliza el término de bacteriuria clínicamente significativa.

Desde el punto de vista microbiológico, las ITU se definen como la presencia de microorganismos patógenos en la orina, la uretra, la vejiga, la próstata o el riñón. El diagnóstico de certeza del ITU se establece a través del urocultivo. En la valoración del mismo tiene importancia la técnica empleada en la recolección de orina. Inicialmente se consideraba como diagnóstico de ITU una cifra superior o igual a 10^4 UFC/ml (ver apéndice B.3) de orina emitida espontáneamente. No obstante, en algunos casos de verdadera infección urinaria no se detecta bacteriuria importante. En concreto, en los pacientes sintomáticos, una cantidad más reducida de bacterias (10^2 - 10^4 UFC/ml) es indicativa de infección. Así, se hace referencia a [32,33]:

- Bacteriuria clínicamente significativa: cualquier cantidad de colonias bacterianas aisladas en una muestra de orina obtenida por punción suprapúbica. Mayor que 10^4 UFC/ml de una sola bacteria en una muestra de orina tomada del chorro medio miccional, en un paciente sintomático y con piuria (presencia de leucocitos o glóbulos blancos en la orina y generalmente indica una respuesta inflamatoria del urotelio a invasión bacteriana); mayor que 10^4 UFC/ml de una sola bacteria en dos muestras consecutivas de orina recogida mediante bolsa estéril; ó mayor que 10^4 UFC/ml de una sola bacteria en una muestra de orina recogida mediante sonda vesical (colocación de un catéter a través de la uretra hasta la vejiga).
- Bacteriuria asintomática o encubierta: cuando hay más de 10^5 UFC/ml en dos muestras de urocultivo y en ausencia de síntomas. Dentro de las distintas formas de bacteriuria asintomática se destacan: 1) Bacteriuria asintomática recurrente:

es la más frecuente y reaparece al finalizar el tratamiento, 2) Bacteriuria asintomática transitoria: responde a breves cursos de tratamiento, y 3) Bacteriuria asintomática asociada a alteración de las vías urinarias.

La bacteriuria asintomática no requiere tratamiento, excepto en niños, mujeres embarazadas, diabéticos y pacientes que van a ser sometidos a procedimientos urológicos. Tampoco se recomienda el tratamiento si los pacientes asintomáticos tienen sonda vesical. En presencia de litiasis, la bacteriuria es muy difícil de eliminar, por lo que sólo se recomienda el tratamiento frente a casos sintomáticos o cuando los cálculos son de estruvita, ya que sirven de refugio a las bacterias dificultando aún más su erradicación.

La ITU puede manifestarse por compromiso de la vejiga (cistitis), del parénquima renal (pielonefritis) o estar limitada a la presencia de bacterias en la orina sin evidencias clínicas de infección (bacteriuria asintomática). Hay tres mecanismos posibles a través de los cuales los microorganismos pueden invadir y diseminarse dentro de las vías urinarias: por vía ascendente, hematógena o linfática, siendo estas dos últimas muy inusuales. Otras vías poco frecuentes son la vía retrógrada (proveniente de algún foco renal o prostático) y la vía intestinal, en caso de fistulas entero-vesicales. La gran mayoría de las infecciones urinarias se deben al ascenso de bacterias de origen entérico, desde la uretra anterior o de la piel periuretral hasta la vejiga. El desarrollo de una ITU y su extensión al resto del árbol urinario pudiendo llegar hasta el riñón, va a depender de la cantidad de bacterias introducidas y el equilibrio entre las defensas del huésped y la virulencia de la cepa infectante. Por tanto, para que se desarrolle una ITU se necesita no sólo el ascenso de gérmenes que normalmente colonizan la zona perineal hacia la vejiga, sino que además la virulencia de los mismos logre vencer los mecanismos de defensa del huésped. Si los gérmenes uropatógenos logran ascender hasta los riñones, se encuentran que a ese nivel la corteza renal es mucho más resistente que la zona medular, por condiciones de osmolalidad, concentración de amonio y flujo sanguíneo. Se necesita una cantidad 10^3 veces mayor de bacterias para infectar la corteza que la médula renal.

Las ITU pueden presentarse por primera vez o ser recurrentes. Se define como infección urinaria recurrente a la presencia de dos o más episodios en los últimos seis meses, o tres o más en el último año. Las recurrencias pueden ser producidas por el mismo microorganismo que estaba presente antes del iniciar el tratamiento, debido a su persistencia en el tracto urinario (recaídas) o presentarse como reinfecciones, donde por lo general el microorganismo responsable es diferente de la bacteria infectante original. Las ITU no complicadas se producen por lo general en pacientes sin alteraciones estructural ni funcional de los riñones y las vías urinarias. En cambio, en aquellos pacientes con este tipo de alteraciones o deterioro de la inmunidad local o general se ve favorecido el desarrollo o persistencia de infecciones urinarias complicadas. La acción de dilución de la orina en la vejiga y luego su evacuación no son capaces por sí solas de eliminar la infección.

La presencia de obstrucción por cálculos en asociación con ITU requiere su inmediato alivio por cualquier intervención urológica. El tratamiento antimicrobiano en pacientes con ITU no siempre ofrece una supresión completa por aislarse microorganismos diferentes dentro del cálculo renal [2,4,33]. El objetivo de la intervención debe ser la erradicación de la infección, la desaparición del cálculo con la preservación de la unidad renal. Hoy en día los tratamientos preferidos son la cirugía percutánea y la litotripsia extracorpórea por ondas de choque (o una combinación de ambas), las cuales pueden ser acompañadas de diferentes opciones médicas para prevenir la infección recurrente y la formación subsecuente de un cálculo.

Las complicaciones más frecuentes tras un tratamiento de LEOCH son el cólico renal (33%) y la fiebre (25%). Otras complicaciones pueden ser: a) Petequias o equimosis cutáneas. Ocurren entre un 10% y 20% y expresan el hecho traumático local producido por las ondas de choque. b) Hematuria. Es el reflejo de un traumatismo renal menor. Suele desaparecer a las horas subsiguientes al procedimiento. c) Traumatismo renal. Puede variar desde contusiones leves del parénquima renal (algo más de la mitad de los pacientes) a hematomas perirrenales por sangrado masivo (< 0.5% de los pacientes); d) Obstrucción ureteral. La incidencia de estas complicaciones y el tiempo de eliminación

de los fragmentos están directamente relacionados con la masa litiásica inicial. En cálculos menores que 2.5 cm un 10% de pacientes necesitan maniobras secundarias (ureteroscopias o nefrostomías), mientras que si el cálculo es mayor que 2.5 cm este porcentaje aumenta a valores entre el 50% y 60% [34,35].

Como ya se mencionó en los antecedentes y en la justificación de este trabajo, se ha generado controversia en cuanto a las implicaciones bacteriológicas que pueden seguir al uso terapéutico de las ondas de choque. Por tanto, en los siguientes capítulos se busca determinar la viabilidad de los microorganismos suspendidos en cálculos renales, asociada a los efectos de las ondas de choques.

Capítulo 3 Desarrollo experimental

3.1 Introducción

En este capítulo se presenta el desarrollo experimental usado para investigar si, en principio, es posible que la litotripsia extracorporal inactiva, de manera significativa, microorganismos contenidos en los cálculos renales.

El desarrollo experimental de la tesis se realizó en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, *campus* Juriquilla, Querétaro.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Investigar si un tratamiento de litotripsia extracorporal puede inactivar, de manera significativa, *Salmonella* Typhimurium contenida en cálculos renales artificiales con dimensiones menores que 2 cm.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Establecer el protocolo para la elaboración de cálculos renales artificiales. Elegir dos tipos de dureza para los cálculos renales artificiales, modelo suave y modelo duro, con reproducibilidad de manufactura.
2. Establecer el protocolo para la inoculación con *Salmonella* Typhimurium de ambos modelos con reproducibilidad estadística de inoculación.
3. Estudiar el efecto que las ondas de choque generadas por el litotriptor electrohidráulico MEXILIT II, producen sobre cálculos renales artificiales inoculados con *Salmonella* Typhimurium.
4. Estudiar el efecto que un número de ondas de choque semejante al usado en los tratamientos clínicos de litotripsia extracorporal (2730 ondas de choque) generadas por el MEXILIT II y el litotriptor piezoeléctrico comercial Piezolith

2300, produce sobre los cálculos renales artificiales inoculados con *Salmonella* Typhimurium.

3.3 Metodología y materiales

3.3.1 Material biológico

El microorganismo con el cual se inocularon los cálculos renales artificiales fue *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, proporcionada por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM, a razón de 10 µl/ml de solución salina al 0.8% (p/v)¹.

3.3.2 Materiales para la fabricación de los cálculos renales artificiales

De acuerdo con experiencias anteriores [21,36] los cálculos se fabricaron con materiales ya probados y simplemente se varió el porcentaje de éstos para obtener cálculos artificiales con diferentes durezas. Los cálculos renales artificiales (CRA) fueron elaborados con agua destilada y la combinación de dos tipos de materiales utilizados por algunos odontólogos para la manufactura de moldes: yeso blanca nieves y Vel-Mix (KERR CORPORATION. West Collins Ave. Ext 1717, C.P. 92867, Orange CA, EUA). Ambos materiales básicamente están compuestos por calcio [37,38].

3.3.3 Generadores de ondas de choque

En la primera fase experimental del trabajo de tesis (objetivos específicos 1, 3) se utilizó el generador de ondas de choque experimental electrohidráulico, MEXILIT II. La descarga eléctrica fue generada mediante bujías intercambiables de baja impedancia con electrodos de tungsteno, separados 1 mm. De acuerdo con los procedimientos establecidos para el uso del MEXILIT II, las bujías fueron precalentadas con 100 descargas a 18 kV ± 0.1 kV. El MEXILIT II fue operado de 18 a 24 kV. La frecuencia de las ondas de choque fue de 0.4 Hz. Se utilizó un reflector elíptico de acero inoxidable,

¹ Se recomienda revisar los apéndices A y B.

denominado E4. El reflector E4 tiene las características siguientes: semieje mayor de 13.9 cm, semieje menor de 7.8 cm. La profundidad del reflector (distancia entre el borde y la parte interior más baja) es de 13.58 cm. La distancia del borde superior del reflector a F2 es 13.44 cm.

Para el objetivo específico 1, los CRA se colocaron en el foco F2 del reflector elíptico dentro de una bolsa transparente de polipropileno con 5 ml de agua destilada sellada con calor. Las bolsas usadas tuvieron dimensiones promedio de $1.9 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ de ancho y $9.8 \text{ cm} \pm 1 \text{ mm}$ de largo, lo cual hizo posible sacar el aire de éstas sin que se rompieran al pulverizar los CRA con una prensa mecánica. Una vez sellada la bolsa, se amarró hasta el nivel de agua para que no hubiera una interfase aire-agua que aumentara la cavitación. El error de posicionamiento se estimó en $\pm 1 \text{ mm}$. El nivel del agua se mantuvo en $14 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$ arriba de F2.

Para el objetivo específico 3, los cálculos renales artificiales inoculados (CRAI) fueron colocados en dos tipos de arreglos: 1) en una bolsa transparente de polipropileno con 5 ml de solución salina al 0.8% (p/v) sellada con calor, y 2) en una bolsa transparente de polipropileno con 5 ml de solución salina al 0.8% (p/v), misma que fue cubierta con una bolsa negra de polipropileno previamente desinfectada con alcohol al 70%. Ambas bolsas fueron selladas simultáneamente con calor, procurando sacar el aire (los dos tipos de arreglos tuvieron dimensiones promedio de $1.8 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ de ancho y $9.8 \text{ cm} \pm 1 \text{ mm}$ de largo). Una vez selladas las bolsas, se amarraron hasta el nivel de agua para que no hubiera una interfase aire-agua que aumentara la cavitación. A cada tratamiento se le asignaron dos CRAI de control, un modelo suave inoculado y un modelo duro inoculado, que fueron colocados dentro de la tina de pruebas a la misma altura que el CRAI de tratamiento, lejos del efecto de la onda de choque y de la radiación electromagnética producida. La temperatura del agua dentro de la tina fue la ambiente (21°C a 24°C). Antes de iniciar los tratamientos, los CRAI se mantuvieron 2 min dentro de la tina de pruebas para aclimatarlos.

En la segunda fase experimental (objetivo específico 4), además del MEXILIT II se

utilizó el generador de ondas de choque comercial piezoeléctrico Piezolith 2300. El generador piezoeléctrico fue operado a $7.67 \text{ kV} \pm 0.15 \text{ kV}$. La frecuencia de las ondas de choque fue de 0.4 Hz. El nivel de agua desde el fondo al borde de la tina se mantuvo en 34.5 cm. La temperatura del agua fue de $33 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se trabajó únicamente con modelos suaves inoculados colocados dentro del segundo arreglo de bolsas. El error de posicionamiento se estimó en $\pm 0.25 \text{ mm}$. A cada litotriptor se le asignó un modelo suave inoculado de control. En el caso del Piezolith 2300, el control fue colocado dentro de la tina de pruebas a la misma altura que el modelo suave inoculado de tratamiento, lejos del efecto de la onda de choque. Antes de iniciar los tratamientos, los modelos se mantuvieron 2 min dentro de la tina de pruebas para aclimatarlos.

3.3.4 Objetivo específico 1. Elaboración de los cálculos renales artificiales

Las proporciones de los materiales se seleccionaron de manera que los modelos, estando inmersos en agua destilada por más de 24 h, resistieran sin disolverse o desmoronarse. Para cada combinación se fabricaron lotes con 5 modelos. Los moldes usados consistieron en cilindros con dimensiones promedio de $8 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$ de diámetro y $7.3 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$ de largo, cuya base inferior fue cubierta con *parafilm* para evitar que la mezcla escurriera mientras solidificaba.

Los modelos se hicieron bajo el siguiente protocolo: en una balanza analítica (SARTORIUS mod. 2842) con incertidumbre de 10^{-4} g , se pesaron el yeso blanca nieves y el Vel-Mix. Se mezclaron adecuadamente con una espátula. Se incorporó el volumen correspondiente de agua destilada con una pipeta cuidando de homogenizar la mezcla. Para evitar la formación de burbujas, la mezcla se vertió lentamente en los moldes empleando una micropipeta de volumen variable con expulsor de puntas. Los modelos se secaron colocándolos en cajas *petri* dentro de una incubadora a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 90 min (tiempo en el que la mezcla solidificó). Finalmente se removió el *parafilm* del molde para que los modelos fueran extraídos cuidadosamente aplicando

presión sobre una de sus caras.

Se buscó que el número de ondas de choque para la fragmentación del modelo duro fuera alrededor de 4 veces el número usado con el modelo suave. Con la finalidad de que al fragmentarse el modelo suave con un número menor de ondas de choque con respecto a las usadas en el modelo duro, las células contenidas en el interior del modelo suave quedaran expuestas más rápidamente. El número de ondas de choque requerido se muestra en la tabla 3-1.

Tipo de modelo	Número de OCH
Suave	90
Duro	400

Tabla 3-1 Número de ondas de choque aplicadas a cada tipo de modelo.

De acuerdo con lo anterior, se determinó el porcentaje de los componentes para la fabricación de los dos tipos de modelos utilizados en los experimentos: modelo suave y modelo duro (Tabla 3-2).

Componentes	Peso para el modelo suave (%)	Peso para el modelo duro (%)
Vel-Mix	1	20
Yeso blanca nieves	49	30
Agua destilada	50	50

Tabla 3-2 Porcentajes del peso de los componentes para cada tipo de modelo.

La prueba de reproducibilidad de manufactura para el modelo suave consistió en determinar su coeficiente de fragmentación después de 90 ondas de choque. Para ese fin, se comprobó que, después de someterse a 90 ondas de choque, la mayoría de sus residuos pasaran primeramente por una malla de 1.8×1.8 mm, y los residuos restantes debían pasar por una malla de 3.1×3.1 mm. A su vez, la prueba de reproducibilidad de manufactura para el modelo duro consistió en determinar su coeficiente de

fragmentación después de 400 ondas de choque. Para ello, se verificó que después de someterse a 400 ondas de choque, la mayoría de sus residuos pasaran primeramente por una malla de 1.8×1.8 mm, y los residuos restantes debían pasar por una malla de 3.1×3.1 mm. La selección de las mallas para tamizado se basó en que se ha reportado la posible eliminación de residuos por vías naturales (residuos clínicamente insignificantes) después de un tratamiento con LEOCH, de entre 2 a 3 mm (se ha registrado la eliminación espontánea de fragmentos de 4 a 5 mm, pero es muy inusual) [39,40].

Para conocer el coeficiente de fragmentación de las ondas de choque aplicadas a cada modelo, se analizaron los residuos obtenidos en cada exposición. Para esto se registró la masa inicial de cada uno de los 5 modelos. Posteriormente se colocaron en bolsas de polipropileno con 5 ml de agua destilada y se sometieron a las ondas de choque de interés en el generador MEXILIT. Los residuos de cada modelo se enjuagaron separadamente a través de las mallas para tamizar. Los fragmentos recuperados de las mallas se metieron a secar en un horno (VWR 1330G) a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. Al término de este tiempo se dejaron por una hora a temperatura ambiente y se volvieron a pesar para obtener las respectivas masas finales. Los coeficientes de fragmentación, c_{fr} , se calcularon según la ecuación:

$$c_{fr} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100, \quad (6)$$

donde m_i es la masa inicial del modelo y m_f es la masa final de los fragmentos.

3.3.5 Objetivo específico 2. Protocolo de inoculación de los cálculos renales artificiales con una cepa de *Salmonella Typhimurium*

Se utilizaron medios de cultivo marca Bioxon (Becton Dickinson, México). La cepa se activó incubándola en caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) al 0.6%, a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h (ver apéndice B.2). Las células se recuperaron mediante centrifugación (Hamilton Bell, EUA, modelo VanGuard V6000) a 3000 rpm por 10 min

a temperatura ambiente y se suspendieron a razón de 10µl/ml de solución salina al 0.8% (p/v). Los CRA se inocularon sustituyendo el volumen de agua destilada por el mismo volumen de suspensión. El inóculo perfectamente homogenizado se agregó a la mezcla de yeso blanca nieves y Vel-Mix. Los moldes (previamente desinfectados con una solución al 70% de alcohol durante 10 min) se colocaron en una caja *petri*. Mediante el uso de una micropipeta se vació en éstos la misma cantidad de mezcla previamente homogenizada. Finalmente se colocó la caja *petri* en una incubadora a 36°C ± 1°C durante 90 min (tiempo en el que la mezcla solidificó).

Para evaluar las poblaciones microbianas en fase estacionaria de crecimiento (ver apéndice A) en cada modelo, se utilizó la técnica de conteo de células viables en placa de agar soya tripticaseína con extracto de levadura (ASTEL) al 0.6% (p/v). Para ese fin, se hicieron diluciones seriadas a partir de 1 ml de la muestra que se distribuyeron en cajas *petri* con la finalidad de conseguir colonias separadas (unidades formadoras de colonias (UFC)). El conteo directo de las UFC/ml nos da información sobre la población de bacterias mesófilas aerobias. Cada colonia se forma a partir de una célula, o de un aglomerado de células, por esa razón se reportan como UFC (ver apéndice B.3).

La comprobación de la inactivación de los tratamientos se determina con la diferencia entre la población viable de los CRAI sometidos a los diferentes tratamientos (N) con sus respectivos controles (N₀), de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Inactivación} = \log(N_0 / N). \quad (7)$$

Se hizo un análisis de varianza para determinar si: a) las UFC/ml obtenidas en los modelos suaves y duros eran estadísticamente iguales y, b) si existían diferencias significativas entre los resultados de la primera (A) y segunda (B) réplicas. Para ello, se trabajó con un total de 12 CRAI (6 modelos suaves y 6 modelos duros), divididos en 4 lotes con 3 modelos cada uno. La réplica A consistió en 2 lotes: un lote con 3 modelos suaves y un lote con 3 modelos duros; e igualmente para la réplica B (Tabla 3-3).

Lote	Réplica	Tipo de modelo (dureza)
1	A	Suave
1	A	Suave
1	A	Suave
2	B	Suave
2	B	Suave
2	B	Suave
3	A	Duro
3	A	Duro
3	A	Duro
4	B	Duro
4	B	Duro
4	B	Duro

Tabla 3-3 Ordenamiento de las réplicas para determinar viabilidad reproducible

Los CRAI se colocaron por separado dentro de bolsas de polipropileno con 5 ml de solución salina al 0.8% (p/v). Usando un algodón rociado con alcohol al 70% se desinfectó la superficie de las bolsas. Debido a que los CRAI fueron pulverizados mediante una prensa mecánica (para homogenizar la mezcla) se les colocó una segunda bolsa sin sellar como precaución. Una vez pulverizado el CRAI, se procedió con la técnica de conteo en placa después 36 h de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

3.3.6 Objetivo específico 3. Efectos del MEXILIT II sobre cálculos inoculados

Se utilizó un diseño experimental factorial 2^3 [41] para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la radiación electromagnética generada por la descarga eléctrica de alto voltaje y la dureza de los CRAI sobre la viabilidad de células, en fase estacionaria de crecimiento. Se realizaron tres réplicas, que se trataron estadísticamente como lotes. Cada lote se dividió en dos sub-lotes con cuatro CRAI cada uno. El orden de réplicas se muestra en la tabla 3-4.

	LOTE	EXPOSICIÓN A LA LUZ	DUREZA	NÚMERO DE OCH
Sub-lote 1.A	1	No	Duro	90
	1	No	Duro	400
	1	No	Suave	90
	1	Sí	Suave	400
Sub-lote 1.B	1	No	Suave	400
	1	Sí	Duro	400
	1	Sí	Duro	90
	1	Sí	Suave	90
Sub-lote 2.A	2	No	Duro	90
	2	No	Duro	400
	2	Sí	Suave	400
	2	Sí	Duro	400
Sub-lote 2.B	2	Sí	Duro	90
	2	No	Suave	90
	2	No	Suave	400
	2	Sí	Suave	90
Sub-lote 3.A	3	Sí	Duro	400
	3	No	Suave	400
	3	No	Duro	400
	3	No	Suave	90
Sub-lote 3.B	3	Sí	Suave	90
	3	Sí	Duro	90
	3	No	Duro	90
	3	Sí	Suave	400

Tabla 3-4 Ordenamiento de los experimentos de la primera fase experimental.

Los CRAI que no fueron expuestos a la luz, se colocaron en el segundo arreglo de bolsas. Aquellos expuestos a la radiación electromagnética, se colocaron en el primer arreglo.

Con un transductor (Imotec GmbH, Würselen, Alemania) colocado dentro de una bolsa transparente en F2, y colocado dentro de una bolsa transparente cubierta con una bolsa negra en F2, se verificó que no hubiera una variación significativa en el pulso de presión entre los dos tipos de arreglos utilizados. Se hicieron 10 mediciones para cada uno de los casos. El voltaje se fijó en 24 kV.

De la tabla 3-5 se aprecia que la duración del pulso (ancho) en los dos tipos de arreglos utilizados puede considerarse prácticamente la misma. La diferencia entre la altura (mV) de los pulsos de presión registrados en los dos tipos de arreglos (~ 2%), es mucho menor que cualquiera de sus desviaciones estándar (~ 32%). Por tanto, el arreglo de bolsas usado no es un factor influyente en el experimento.

Pulso de presión con una bolsa transparente		Pulso de presión con una bolsa transparente cubierta con una bolsa negra	
AMPLITUD(mV)	ANCHO (µs)	AMPLITUD (mV)	ANCHO (µs)
428 ± 139.7	2.65 ± 0.96	419.6 ± 133.8	2.63 ± 0.94

Tabla 3-5 Pulsos de presión.

En cada sub-lote se manejaron dos CRAI de control, un modelo de control suave y un modelo de control duro. Ambos CRAI de control se colocaron por separado en una bolsa transparente de polipropileno sellada con 5 ml de solución salina al 0.8% (p/v). A lo largo del desarrollo experimental los CRAI de control permanecieron inmersos en la tina del MEXILIT II, lejos del foco dinámico. Al finalizar los experimentos, los modelos de control se pulverizaron mediante una prensa mecánica para posteriormente emplear la técnica de conteo en placa, a partir de un ml de la mezcla homogenizada.

En el transcurso de 5 días se trabajó con sólo un lote de la siguiente manera: en el primer día se activó la cepa de *Salmonella* Typhimurium; en el segundo día se fabricaron los CRAI para el primer sub-lote y se hicieron las corridas experimentales correspondientes. Después de someterse al tratamiento, los residuos de los CRAI fueron

pulverizados para obtener una mezcla homogénea. Finalmente, se realizó el conteo en placa, pasadas 36 h de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. En el tercer día nuevamente se activó cepa de *Salmonella* Typhimurium; en el cuarto día se fabricaron los CRAI para el segundo sub-lote y se hicieron las corridas experimentales correspondientes. Después de 36 h de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se hizo el conteo en placa correspondiente a los cálculos tratados. Los pasos se repitieron hasta cubrir las tres réplicas.

3.3.7 Objetivo específico 4. Efectos del MEXILIT II y el Piezolith 2300 sobre cálculos inoculados

La segunda fase experimental consistió en dar un número de ondas de choque semejante a lo usado en los tratamientos clínicos de litotripsia extracorporal (2730 ondas de choque). Debido a que se buscó simular la situación más cercana a un caso clínico, se bloqueó el pulso de luz inherente a la descarga electrohidráulica. Para ello se trabajó con modelos suaves colocados dentro del arreglo con bolsa negra.

Para estudiar la influencia del generador de ondas de choque utilizado sobre la viabilidad de las células en fase estacionaria de crecimiento, se trataron 8 modelos (3 modelos suaves para el MEXILIT II y 3 modelos suaves para el Piezolith 2300, más 2 modelos de control, uno para cada litotriptor). Se realizaron tres réplicas, que se trataron estadísticamente como lotes. El orden de las réplicas se muestra en la tabla 3-6.

Lote	Generador de ondas de choque
1	Piezolith 2300
1	MEXILIT II
2	Piezolith 2300
2	MEXILIT II
3	MEXILIT II
3	Piezolith 2300

Tabla 3-6 Ordenamiento de los experimentos de la segunda fase experimental.

Ambos CRAI de control se colocaron por separado en una bolsa transparente de polipropileno sellada con calor, que contenía 5 ml de solución salina al 0.8% (p/v). A lo largo del desarrollo experimental los CRAI de control permanecieron inmersos en la tina del MEXILIT II o del Piezolith 2300, lejos del foco dinámico. Al finalizar los tratamientos, los modelos de control se pulverizaron mediante una prensa mecánica para posteriormente aplicarles la técnica de conteo en placa. Después de 36 h de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se hizo el conteo en placa de los tratamientos, cuyos residuos previamente fueron homogenizados mediante una prensa mecánica.

Capítulo 4 Resultados

4.1 Objetivo específico 1. Elaboración de los cálculos renales artificiales

La masa promedio de los modelos suaves fue de $0.64 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$, mientras que la de los modelos duros fue de $0.76 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$.

La tabla 4-1 muestra los coeficientes de fragmentación (ecuación 6) para cada tipo de modelo después de someterse a las de ondas de choque de interés. Se comprobó que para ambos modelos, la mayoría de sus residuos (~96 % de la masa inicial del CRA) pasaban por la malla de $1.8 \times 1.8 \text{ mm}$, y la masa restante pasaba por la malla de $3.1 \times 3.1 \text{ mm}$.

Dimensiones de la malla para tamizado	Coeficiente de fragmentación (%)	
	Modelo suave después de 90 ondas de choque	Modelo duro después de 400 ondas de choque
$1.8 \times 1.8 \text{ mm}$	95.64 ± 1.74	96.3 ± 1.28
$3.1 \times 3.1 \text{ mm}$	100	100

Tabla 4-1 Coeficientes de fragmentación del modelo suave y duro.

De las masas recuperadas de los modelos duros expuestos a 90 ondas de choque con la malla de $3.1 \times 3.1 \text{ cm}$, se obtuvo un coeficiente de fragmentación de $64.8 \% \pm 5.4\%$.

4.2 Objetivo específico 2. Protocolo de inoculación de los cálculos renales artificiales con una cepa de *Salmonella* Typhimurium

El análisis de variancia fue programado con el lenguaje R [42]. Las cuentas viables obtenidas inmediatamente después de la deshidratación (solidificación) de los modelos estuvieron entre 8.1 y 7.3 \log_{10} de UFC/ml (Figura 4-1). Esto es, el número máximo de UFC/ml fue 1.41×10^8 mientras que el mínimo fue 2.1×10^7 .

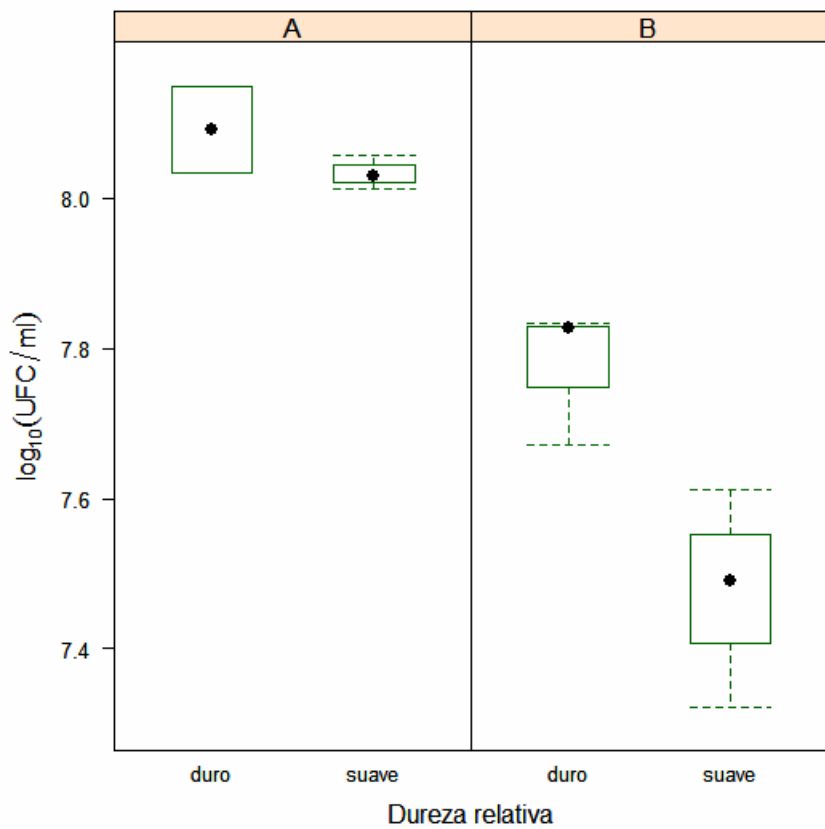


Figura 4-1 $\log_{10}(UFC/ml)$ en agar soya tripticaseína con extracto de levadura (ASTEL) de *S. Typhimurium* inmovilizada en cálculos artificiales. Los resultados están agrupados por dureza relativa: suave y duro; y por réplica A (un lote con 3 modelos suaves y un lote con 3 modelos duros) y B (un lote con 3 modelos suaves y un lote con 3 modelos duros).

Se observa además que las UFC/ml obtenidas en la réplica A fueron significativamente mayores que las obtenidas en la réplica B. También muestra que las UFC/ml obtenidas en los cálculos suaves de la réplica B parecen ser significativamente menores que las obtenidas en los cálculos duros de la misma réplica. No obstante, tal comportamiento se ve disminuido en la réplica A.

El análisis de varianza (ANOVA) confirmó las tendencias observadas en la figura 4-1, i.e., la diferencia en las UFC/ml observadas entre réplicas y para los cálculos duros y suaves son estadísticamente significativas (Tabla 4-2). Sin embargo, también sugiere que no hay diferencias significativas entre los cálculos del mismo lote.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Replica	1	0.50	0.50	52.90	0.0002
Dureza	1	0.10	0.10	10.58	0.0140
Replica:Dureza	1	0.04	0.04	4.13	0.0816
Residuals	7	0.07	0.01		

Tabla 4-2 ANOVA de la cuenta viable (objetivo específico 2)

Se concluye que la inoculación de los cálculos renales artificiales no ofrece una variación entre ellos para fines del análisis estadístico microbiológico.

4.3 Objetivo específico 3. Efectos del MEXILIT II sobre cálculos inoculados

El análisis del efecto que las ondas de choque generadas por el MEXILIT II producen sobre los cálculos renales artificiales inoculados con *Salmonella* Typhimurium, también fue programado con el lenguaje R [42] (ver apéndice C).

La inactivación logarítmica conseguida se muestra en la figura 4-2. En esta figura se observa que la inactivación máxima fue de $1.35 \log_{10}(N_0/N)$, donde N_0 son las UFC/ml del modelo de control y N son las UFC/ml del modelo de tratamiento. La máxima inactivación corresponde a la aplicación de 400 ondas de choque a modelos suaves y con luz. Para este caso, N_0 fue 40×10^6 y N fue 1.77×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 95%. De los datos seleccionados por dureza (400 ondas de choque, con luz) resultó que para los modelos suaves la mediana de la inactivación logarítmica fue de 0.9 con extremos de 0.82 y $1.35 \log_{10}(N_0/N)$ (mínimo y máximo, respectivamente). La media de la inactivación fue $1.03 \pm 0.28 \log_{10}(N_0/N)$ (punto rojo). Para los modelos duros la mediana, mínimo y máximo fueron 0.52, 0.5 y $0.75 \log_{10}(N_0/N)$, respectivamente. La media de la inactivación fue $0.59 \pm 0.14 \log_{10}(N_0/N)$ (punto rojo). En el caso de la inactivación máxima, N_0 fue 99×10^6 y N fue 1.77×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 82%.

Se observa que en los modelos duros expuestos a la radiación UV y visible, emitida por las descargas eléctricas que generan a las ondas de choque en el sistema electrohidráulico, el valor de la media para 90 y 400 ondas de choque fue $0.5 \pm 0.08 \log_{10}(N_0/N)$ y $0.59 \pm 0.14 \log_{10}(N_0/N)$, respectivamente. En los modelos suaves se tuvieron $0.45 \pm 0.12 \log_{10}(N_0/N)$ y $1.03 \pm 0.28 \log_{10}(N_0/N)$ como valores de la media para 90 y 400 ondas de choque, respectivamente. La comparación entre las medias (\pm su desviación estándar) sugiere, en los modelos duros expuestos a luz, un incremento pequeño en la inactivación conforme se aumentó el número de ondas de choque aplicado.

Por otra parte, la inactivación máxima alcanzada en los tratamientos sin exposición a la radiación UV y visible, fue $0.49 \log_{10}(N_0/N)$, que corresponde a la aplicación de 400 ondas de choque a modelos suaves. En este caso, N_0 fue 50×10^6 y N fue 16.2×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 67%. La inactivación mínima conseguida fue de $0.06 \log_{10}(N_0/N)$; que corresponde a la aplicación de 90 ondas de choque a modelos duros. Para este caso, N_0 fue 99×10^6 y N fue 85×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 14%. Las medias obtenidas en los modelos duros para ambas exposiciones, 90 y 400 ondas de choque, fueron $0.18 \pm 0.1 \log_{10}(N_0/N)$ y $0.18 \pm 0.05 \log_{10}(N_0/N)$, respectivamente. Lo anterior apunta a que la inactivación lograda en los modelos duros sin exposición a luz parece ser independiente del número de ondas de choque aplicadas. Para los modelos suaves el valor de la media para 90 y 400 ondas de choque fue $0.09 \pm 0.12 \log_{10}(N_0/N)$ y $0.34 \pm 0.13 \log_{10}(N_0/N)$, respectivamente.

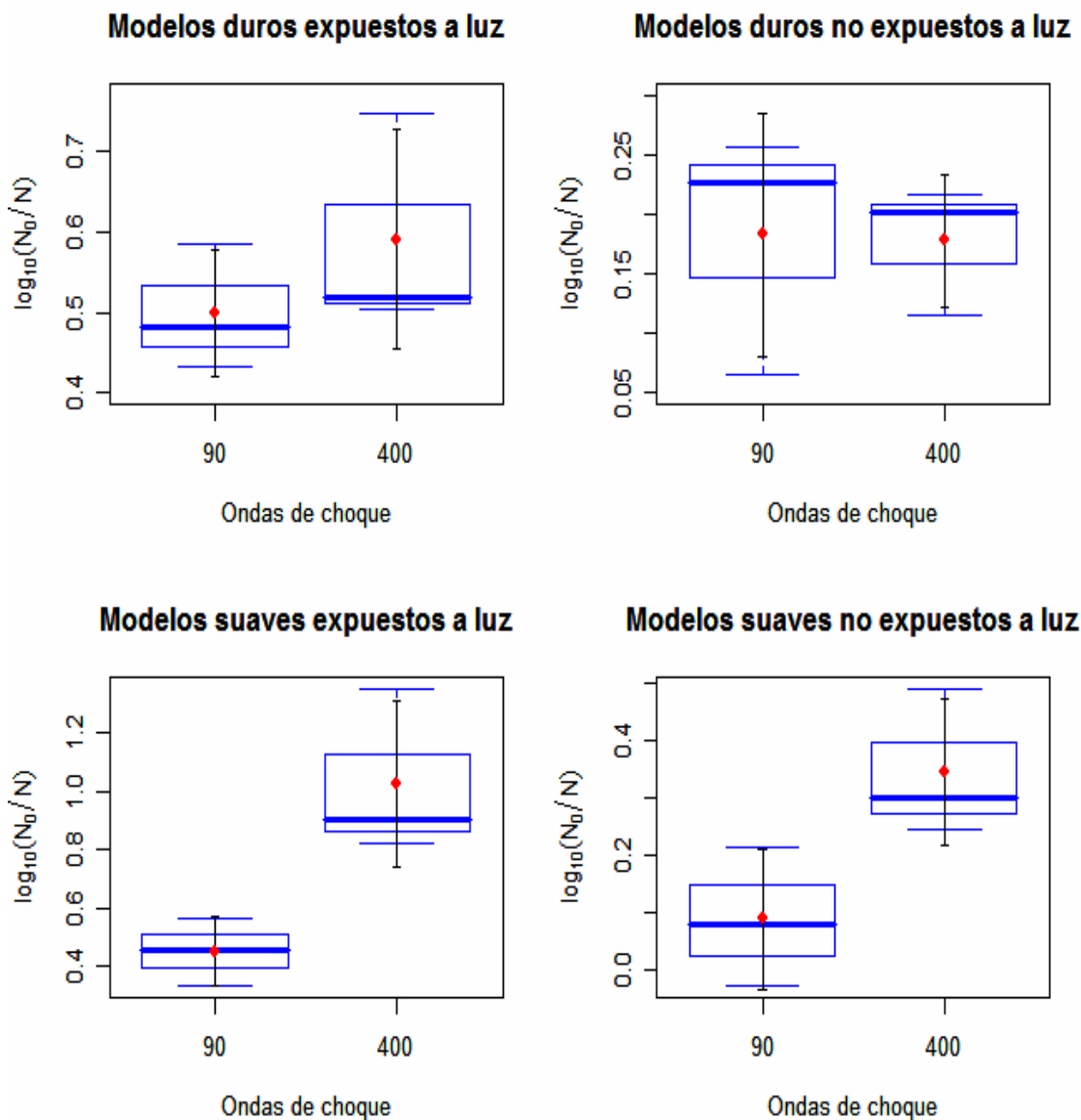


Figura 4-2 Inactivación logarítmica de *S. Typhimurium* inmovilizada en cálculos renales artificiales. Se evaluó el efecto de la aplicación de 90 y 400 ondas de choque; la dureza relativa de los cálculos, y el efecto a la exposición de la luz producida por la descarga eléctrica: “Modelos duros expuestos a luz”, “Modelos duros no expuestos a luz”; “Modelos suaves expuestos a luz”, “Modelos suaves no expuestos a luz”.

Los valores anteriores y el análisis del ANOVA (Tabla 4-3) revelaron que la inactivación del pulso de luz y la interacción entre las ondas de choque aplicadas (radiación:ondas) y la dureza relativa (radiación:dureza) de los cálculos son estadísticamente significativas en la inactivación lograda.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
RADIACION	1	1.18	1.18	46.81	0.0000
DUREZA	1	0.08	0.08	3.10	0.1035
ONDAS	1	0.32	0.32	12.64	0.0040
LOTE	5	0.17	0.03	1.31	0.3232
RADIACION:DUREZA	1	0.00	0.00	0.01	0.9158
RADIACION:ONDAS	1	0.04	0.04	1.40	0.2600
DUREZA:ONDAS	1	0.16	0.16	6.38	0.0266
Residuals	12	0.30	0.03		

Tabla 4-3 ANOVA de la inactivación logarítmica (objetivo específico 3)

4.4 Objetivo específico 4. Efectos del MEXILIT II y el Piezolith 2300 sobre cálculos inoculados

El análisis del efecto que un número de ondas de choque semejante al usado en los tratamientos clínicos de litotripsia extracorporal (2730 OCH) generadas por dos tipos de litotriptores, produce sobre los cálculos renales artificiales inoculados con *Salmonella* Typhimurium, se programó con el lenguaje R [42] (ver apéndice C).

La inactivación logarítmica conseguida se muestra en la figura 4-3. Se observa que la inactivación máxima fue de $0.15 \log_{10}(N_0/N)$, donde N_0 son las UFC/ml del modelo de control y N son las UFC/ml del modelo de tratamiento; que corresponde al litotriptor piezoeléctrico comercial Piezolith 2300. Para este caso, N_0 fue 26.3×10^6 y N fue 18.6×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 29%. La media de la inactivación fue $0.13 \pm 0.01 \log_{10}(N_0/N)$ (punto rojo). Mientras que la mayor inactivación alcanzada en el MEXILIT II fue $0.07 \log_{10}(N_0/N)$. Para este caso, N_0 fue 22×10^6 y N fue 18.9×10^6 , por lo que la inactivación lograda fue aproximadamente del 14%. La media de la inactivación fue $0.04 \pm 0.02 \log_{10}(N_0/N)$ (punto rojo).

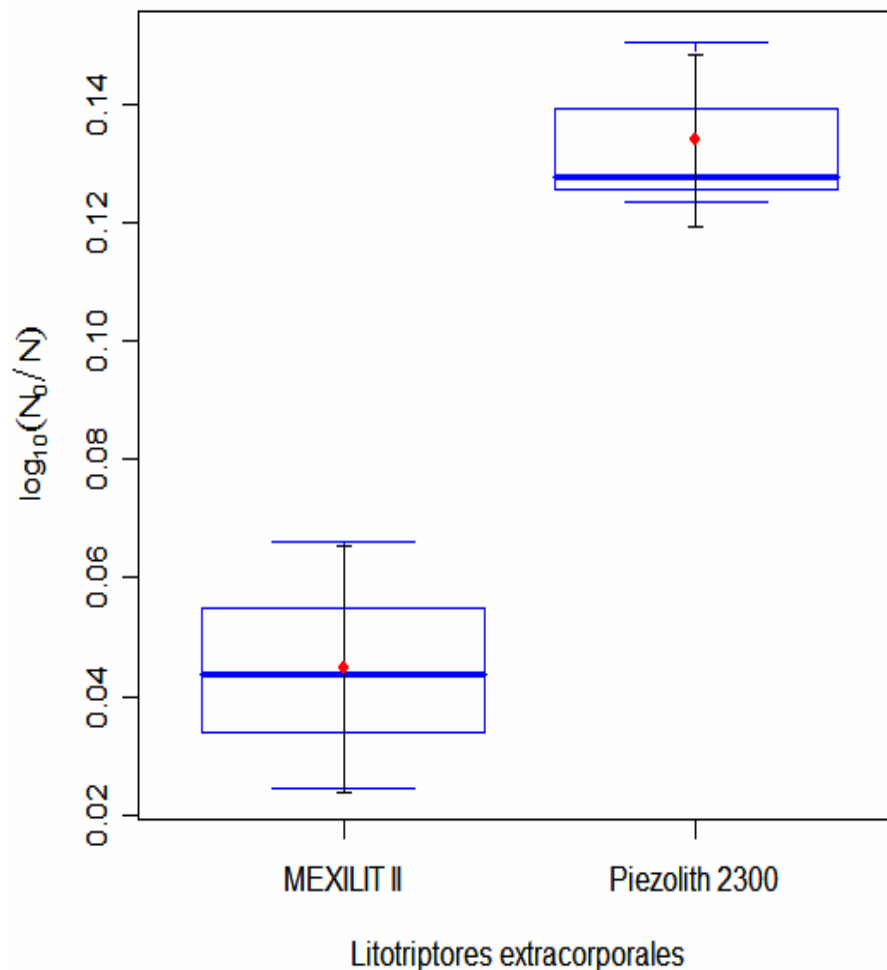


Figura 4-3 Inactivación logarítmica de *S. Typhimurium* inmovilizada en cálculos renales artificiales. Se evaluó el efecto de la aplicación de 2730 ondas de choque con dos generadores de ondas distintos: electrohidráulico y piezoeléctrico.

El ANOVA (Tabla 4-4) confirmó la tendencia observada en la figura 4-3. La inactivación de *Salmonella Typhimurium* suspendida en cálculos renales artificiales suaves para el MEXILIT II fue significativamente menor que la lograda con el Piezolith 2300.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Generador_de_OCH	1	0.0119299	0.0119299	31.0619	0.01140
LOTE	1	0.0001395	0.0001395	0.3631	0.58928
Residuals	3	0.0011522	0.0003841		

Tabla 4-4 ANOVA de la inactivación logarítmica (objetivo específico 4)

Discusión

Se han descrito las formas de acción de las ondas de choque sobre los cálculos renales. Por una parte están los efectos directos de la onda expansiva y en segundo término, los efectos generados por las ondas secundarias, es decir, la cavitación. Los efectos directos se relacionan con los cambios mecánicos, producto de las variaciones de amplitud de presión positiva durante la propagación de la onda. Los efectos bioquímicos están relacionados con respuestas micromecánicas de cavitación, y se refieren a la liberación de radicales libres de los compartimentos intracelulares. Un punto que aún está en discusión es a cuál de los efectos se le asocia un mayor daño celular.

Los resultados obtenidos demostraron que las ondas de choque pueden tener ciertos efectos sobre la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium suspendida en cálculos renales artificiales. La interacción más importante en la inactivación fue la que se dio en modelos suaves expuestos al pulso de luz generado por la descarga eléctrica a la dosis alta de ondas de choque ($1.35 \log_{10}$ UFC/ml). Esto concuerda con lo encontrado por Loske et al. [17] en experimentos con *Salmonella* Typhimurium suspendida en solución salina, en donde además se reportó que al tener una interfase aire-solución salina, i.e., el efecto de la cavitación aumentada, la inactivación aumentó ($1.68 \log_{10}$ UFC/ml). Tal comportamiento de la inactivación se explica en parte debido a que las células contenidas en los modelos suaves quedan expuestas más rápidamente al pulso de luz (el valor de su coeficiente de fragmentación alcanza el máximo, 310 ondas de choque, antes que el modelo duro).

Debido a que en la LEOCH no llega luz al cálculo, se diseñó una segunda fase experimental en la cual el pulso de luz generado por la descarga eléctrica fue bloqueado, y la dosis de ondas de choque fue comparable con la usada en un tratamiento clínico. Se usaron dos tipos de litotriptores con la finalidad de evaluar los efectos asociados únicamente a las ondas de choque. Los resultados revelaron que en el caso del MEXILIT II, la inactivación máxima lograda con 2730 ondas de choque y sin luz, fue de aproximadamente 14%, mientras que para el Piezolith 2300 fue de aproximadamente

29%. Aunque lo anterior implicaría que un tratamiento de LEOCH *in vivo* puede no sólo romper el cálculo infectado sino también reducir la viabilidad microbiana, la fracción de bacterias sobrevivientes al tratamiento resultó ser de aproximadamente 70%. Esto significa que aproximadamente 7.7×10^6 UFC/ml fueron viables; cifra clínicamente significativa, que dentro de los tejidos del riñón puede derivar en bacteriuria y/o infecciones en el tracto urinario, sobre todo, si algunos residuos no son eliminados. Esto puede explicar parcialmente la reincidencia de infecciones urinarias que sigue al tratamiento de LEOCH [8,10].

Actualmente se ha descrito la teoría de la adherencia de bacterias a sustratos formando *biopelículas*, logrando así mayor protección a agentes externos [43]. Lo anterior da una razón de por qué las bacterias en los intersticios de los cálculos renales son menos susceptibles a los antimicrobianos. Según lo hallado por Michaels et al. [6], las bacterias alojadas en intersticios aumentaban su susceptibilidad a antimicrobianos después de un tratamiento con LEOCH. Lo anterior sugiere que los *biopelículas* bacterianos son rotos por las ondas de choque, lo cual no pasa en una cirugía abierta y, por lo tanto, los remanentes pueden tratarse eficazmente con agentes antimicrobianos. Además, se ha sugerido [24] que la cavitación puede ser un factor en la disminución de bacteriuria e infecciones urinarias persistentes reportadas [6,7]. No obstante, existe la posibilidad de septicemia asociada con LEOCH [44], la cual está relacionada con el número de UFC, su virulencia y la resistencia del huésped tratado. Por ello algunos autores [6,7,10,11,12] enfatizan el uso de antibióticos en presencia de infecciones urinarias sintomáticas antes y después de un tratamiento con LEOCH.

En experimentos sobre células en suspensión [45] se reportó que el número de células lesionadas aumenta linealmente con el número de ondas de choque aplicadas y la magnitud de la energía de las mismas. Asimismo, algunos resultados [46] sugieren que el diseño experimental (tipo de célula, tipo de suspensión y litotriptor usado, entre otros) determinan la viabilidad lograda. Los resultados obtenidos con el MEXILIT II, aparentemente sugieren que para células suspendidas en materiales con propiedades acústicas muy distintas al medio de propagación de las ondas de choques, la

correspondencia entre el número de ondas de choque aplicadas y la magnitud de la energía de las mismas, no necesariamente es lineal.

En la actualidad se investiga la posible aplicación de las ondas de choque extracorporales en padecimientos crónicos de tejidos blandos. Lo cierto es que los mecanismos de acción de las ondas de choque en tales padecimientos no son del todo conocidos. Se ha reportado [47,48] que su uso causa lesiones graves cuando hay una variación drástica en la impedancia del medio que rodea al tejido blando de interés (por ejemplo, tejido pulmonar - aire). A la fecha las mayores contribuciones están asociadas con ortopedia y traumatología.

Dentro de los padecimientos crónicos en la próstata se hace referencia al alojamiento de microcolonias adheridas al epitelio de sus conductos y debido a que forman *biopelículas* se encuentran protegidas del efecto de antimicrobianos, dificultando su erradicación. Con los resultados encontrados en esta tesis y considerando que la próstata es un tejido blando y que no hay grandes diferencias de impedancia acústica entre el medio que la rodea (a excepción del recto), quizá resulte posible la aplicación de ondas de choque para facilitar la erradicación de dichas bacterias.

Por otra parte, recientemente se ha reportado [49] que las ondas de choque producen efectos de sensibilización en células tumorales ante la aplicación de algunos tipos de medicamentos.

Conclusiones

- El factor más importante en la inactivación de las bacterias contenidas en los cálculos renales artificiales se atribuye a la radiación UV y visible, emitida por las descargas eléctricas que generan a las ondas de choque en el sistema electrohidráulico.
- Al bloquear la radiación UV y visible, emitida por las descargas eléctricas que generan a las ondas de choque en el sistema electrohidráulico, no fue posible lograr una inactivación mayor que el 29% ($0.15 \log_{10}(N_0/N)$) con ninguno de los dos litotriptores usados, incluso aplicando casi 3000 ondas de choque.
- Los factores que intervienen en la inactivación de células suspendidas en un medio con impedancia acústica similar a la del medio de propagación de la onda de choque (fluido), no deben ser generalizados para células suspendidas en materiales con propiedades acústicas diferentes al medio de propagación (cálculo renal).
- La aplicación de ondas de choque a cálculos renales infectados contribuye a disminuir la viabilidad de las bacterias contenidas en éstos. No obstante, por la cantidad de bacterias sobrevivientes, un tratamiento de LEOCH debe ir acompañado de antimicrobianos para tener un efecto bactericida eficaz.

Apéndice A. Generalidades de *Salmonella Typhimurium*

Salmonella enterica serovar Typhimurium (también llamada *Salmonella Typhimurium*) es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de este género resisten fácilmente las temperaturas de congelación, la acción bacteriostática del tetrationato y el selenito sódicos, así como el efecto antibiótico de la penicilina y otros antimicrobianos incluyendo, según la cepa, a los agentes terapéuticos tradicionales empleados en su contra. Las principales padecimientos clínicos asociados a *S. Typhimurium* son: a) la gastroenteritis, b) septicemia y c) las fiebres entéricas (fiebres tifoidea y paratifoidea) [50].

En general, si analizamos el crecimiento microbiano en el tiempo, éste describe una curva de crecimiento que puede ser dividida en cuatro fases: fase lag o de retraso, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Figura A.1).

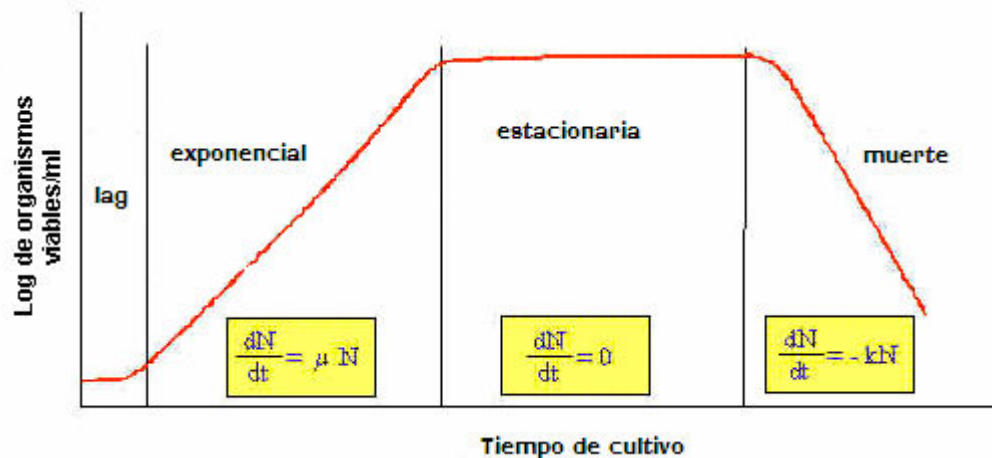


Figura A-1. Curva de crecimiento microbiano

a) Fase lag o de retraso

Cuando una población microbiana es inoculada en un medio fresco, el crecimiento generalmente no principia de inmediato, sino después de cierto tiempo (breve o largo), llamado fase lag. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta una fase lag, aún cuando las células del inóculo estén vivas. Esto se debe a que las células generalmente agotan diferentes coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere de cierto tiempo para su resíntesis. Un retraso también se presenta cuando el inóculo está formado por células dañadas (no muertas) por tratamientos con calor, radiación o agentes químicos y/o físicos, debido al tiempo necesario para que las células puedan reparar dicho daño. También se observa cuando una población se transfiere de un medio de cultivo rico a uno pobre. Esto se debe a que es necesario que las células tengan sustrato íntegro para la síntesis de los metabolitos esenciales que no están presentes en

dicho medio, es decir, es una fase de preparación y adaptación al medio. Su duración depende del medio de cultivo y del estado fisiológico de las células vivas

b) Fase exponencial

Es una consecuencia de la fisión binaria celular. La población de la mayor parte de los organismos unicelulares crece exponencialmente. La tasa de crecimiento exponencial varía mucho de un organismo a otro. Por ejemplo: *Salmonella Typhimurium* crece muy rápidamente en cultivo, con un tiempo de generación de 20 a 30 min. La temperatura, composición del medio de cultivo, entre otros, afectan la velocidad de crecimiento exponencial.

c) Fase estacionaria

En esta fase el crecimiento exponencial se detiene, los nutrientes indispensables se agotan, no hay incremento o decremento en el número de células. Existe acumulación de sustancias tóxicas. Los microorganismos son fisiológicamente activos y viables.

d) Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte. Durante esta fase, el conteo en placa puede permanecer constante pero la viabilidad disminuye lentamente. En algunos casos, la muerte se acompaña por lisis celular, dando lugar a una disminución del conteo de viabilidad.

Apéndice B. Técnicas microbiológicas

Se detallan las técnicas de microbiología utilizadas a lo largo del desarrollo experimental de la tesis.

B.1 Preparación de material microbiológico

Se describen los procesos para hacer las siguientes preparaciones: peptona de caseína al 0.1% (p/v), solución salina al 0.8% (p/v), agar soya tripticaseína con extracto de levadura (ASTEL) al 0.6% (p/v) y caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) al 0.6% (p/v)

Materiales y método

El material requerido para la preparación de los medios de cultivo y el material microbiológico fue:

Balanza analítica	Agitador magnético
Espátula	Mechero de Bunsen
Tapones de algodón cubiertos con gasa	Peptona de caseína
Recipientes de pesado	Agar soya tripticaseína con extracto de Levadura al 0.6% (p/v)
Cajas petri	Caldo soya tripticaseína con extracto de Levadura al 0.6% (p/v)
Tubos con taparrosca	Autoclave
Matraz	
Cloruro de sodio	
Matraz volumétrico (500 ml y 1000 ml)	

La fórmula en gramos por 1000 ml de agua destilada se muestra en la tabla A.1.

Material microbiológico	Masa (g)
Peptona de caseína	30
Agar soya tripticaseína	40
Caldo soya tripticaseína	1
Cloruro de sodio	8.5

Tabla A.1 Fórmula en gramos por 1000 ml de agua destilada

- Rehidratar 1g de peptona de caseína en 1000 ml de agua destilada. Mediante agitador magnético disolverla completamente. Distribuir volúmenes de 9 ml en tubos taparrosca. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 minutos.
- Calentar hasta el punto de ebullición 500 ml de agua destilada en un matraz de 1000 ml. Colocar en el agitador magnético e incorporar el ASTEL para disolverlo completamente. Distribuir en matraces. Colocarles los tapones de algodón. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 minutos. Conservar en refrigeración de 2°C a 8°C.

- Calentar hasta el punto de ebullición 250 ml de agua destilada en un matraz de 500 ml. Colocar en el agitador magnético e incorporar el CSTEL para disolverlo completamente. Distribuir volúmenes de 50 ml en matraces. Colocarles los tapones de algodón. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) por 15 minutos. Conservar en una gaveta cerrada alejada de gradientes de temperatura.
- Incorporar 0.85 g de cristales de NaCl a 100 ml de agua destilada. Mezclar hasta disolverlos. Distribuir volúmenes de 50 ml en matraces. Colocarles los tapones de algodón. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) por 15 minutos. Conservar en una gaveta cerrada alejada de gradientes de temperatura.

B.2 Siembra de medios de cultivo: activación de cepa de *Salmonella Typhimurium*

Mediante la técnica aséptica se activó la cepa de *Salmonella Typhimurium* empleada para inocular los cálculos renales artificiales.

Materiales y método

Matraz con 50 ml de CSTEL
 Cepa de *Salmonella Typhimurium*
 Asa de punta redonda
 Mechero de Bunsen
 Baño térmico a 34.5 ° C

(Los pasos descritos a continuación deben trabajarse alrededor del mechero de Bunsen)

- Flamear el asa de punta redonda desde la base hasta la punta. Destapar el tubo de ensayo que contenga la cepa de *Salmonella Typhimurium* y flamear su boca. Enfriar en las paredes el asa.
- Raspar sobre la cepa de *Salmonella Typhimurium*. Flamear la boca del tubo y cerrarlo.
- Retirar el tapón de algodón del matraz a inocular y flamear la boca de éste.
- Introducir el asa con la colonia en el matraz y agitarla vigorosamente.
- Flamear el asa y la boca del tubo. Cerrar con el tapón de algodón.
- Colocar el matraz en el baño térmico a 35°C durante 24 h.

B.3 Técnica de conteo en placa

Mediante la técnica de conteo en placa se determina el crecimiento microbiano de la población de bacterias mesófilas aerobias de una muestra a partir de diluciones seriadas que se vierten en cajas *petri* con la finalidad de conseguir colonias separadas. Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que, si se encuentra en condiciones de sustrato y ambientales adecuadas, da lugar a la producción de una colonia en un lapso breve (horas). La cuenta directa de las UFC da información de la población

total de bacterias mesófilas aerobias en la muestra.

Materiales y método

Vortex	Mezcla inoculada con <i>Salmonella</i>
Centrífuga	Typhimurium
Cajas petri	Matraz con 250 ml de ASTEL
Tubos para centrifuga	Matraz con 50 ml de solución salina al 0.8% (p/v)
Pipeta de 10 ml	0.8% (p/v)
Micropipeta de 1000 µl	Tubos con 9 ml de peptona al 0.1% (p/v)
Puntas esterilizadas para micropipetas	

(Los pasos descritos a continuación deben trabajarse dentro de la campana de flujo laminar, i.e., bajo condiciones asépticas)

- Tomar 1 ml de la mezcla inoculada con *Salmonella* Typhimurium (CRAI pulverizado y homogenizado en 5ml de solución salina al 0.8% (p/v)). Vaciarlos en el tubo para centrifuga y centrifugar por 10 min. Añadir 9 ml de solución salina al 0.8% (p/v) al tubo y homogenizar con el vortex. La solución así obtenida se llamará muestra.
- Hacer la primera dilución de la muestra tomando con una micropipeta 1 ml directamente de ésta. Vaciar en un tubo con 9 ml de peptona al 0.1% (p/v), marcándolo como dilución 10^{-1} . Agitar con el vortex por 10 s. Cambiar la punta de la micropipeta.
- Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y vaciar en un tubo con 9 ml de peptona al 0.1% (p/v), marcándolo como dilución 10^{-2} . Mezclar agitando con el vortex por 10 s. Cambiar la punta de la micropipeta.
- Repetir el paso c seis veces más (hasta llegar a la dilución 10^{-8}).
- Agitar con el vortex por 10 s el tubo marcado como 10^{-8} . Tomar con una micropipeta 1 ml del contenido de éste e inocular directamente sobre el centro de la caja *petri* marcada como 10^{-8} . No cambiar la punta.
- Agitar con el vortex por 10 s el tubo marcado como 10^{-7} . Tomar con una micropipeta 1 ml del contenido de éste e inocular directamente sobre el centro de la caja *petri* marcada como 10^{-7} . No cambiar la punta.
- Repetir el paso f hasta llegar a la dilución 10^{-1} .
- Vaciar el ASTEL sobre un par de cajas de *petri*. Mezclar realizando la siguiente serie de movimientos: 1) describiendo círculos mover 10 veces en el sentido de las manecillas del reloj y 10 veces en sentido contrario, 2) mover 10 veces a lo largo de una línea hacia arriba y hacia abajo, y 3) mover 10 veces a lo largo de una línea de un lado a otro. Los movimientos anteriores permiten homogenizar adecuadamente el ASTEL con las diluciones. Esperar a que solidifique.
- Colocar las cajas *petri* en la incubadora a 36°C en posición invertida durante 36 h.
- Contar las colonias separadas, para así obtener las UFC/ml. Esto es,

$$UFC = \frac{\text{No. de colonias}}{\text{Factor de dilución} \times 1}$$

con

$$\text{Factor de dilución} = 10^{-1}, \dots, 10^{-8}.$$

Apéndice C. Código fuente en lenguaje R versión 2.2.1

Código fuente utilizado para el análisis de los resultados en el lenguaje R versión 2.2.1.

```
#SCRIPT DE GRAFICAS de los objetivos específicos 3 y 4.
#Script probado en configuración para Windows XP con R version 2.2.1

#paquetes requeridos
require(Hmisc)#para errbar()

#-----Funciones en común

# Función que dibuja una gráfica de error que muestra la SD
# y la media sobre una gráfica existente de tipo caja con dos
# valores en x
#
# Parametros:
# @datos. Conjunto de datos de los que se obtendra la media y la SD
# @factorIn. Factor considerado:
#           1 = DUREZA, 2 = ONDAS DE CHOQUE, 3=Generador_de_OCH
# @radiacionIn. SI = con luz, NO = sin luz
# @ondasIn. Número de ondas de choque
# @durezaIn. Tipo de dureza (DURO,SUAVE)
# @return. Matriz de dos filas que contiene un resumen de la media, la SD
#          de los dos valores de 'x'
dibujaGraficaErr=function(datos, factorIn, radiacionIn, ondasIn, durezaIn) {

  attach(datos)

  #calcular las medias y la SD
  meanV<-c(mean(log_No.N[1:3]),mean(log_No.N[4:6]))
  sdV<-c(sd(log_No.N[1:3]),sd(log_No.N[4:6]))

  #limites del error
  yplusV<-c(meanV[1]+sdV[1],meanV[2]+sdV[2])
  yminusV<-c(meanV[1]-sdV[1],meanV[2]-sdV[2])

  #dibujar grafica de error
  errbar(c(1,2),c(meanV),c(yplusV),c(yminusV),
            lty=1,lwd=0,cap=0.018,add=TRUE)
  #media
  points(c(1,2),c(meanV),pch=19,col="red")

  #resumen de media y SD
  resumen<-matrix(c(" ",0," ",0.0,0.0,0.0,0.0),
                 nrow=2,ncol=7,byrow=TRUE,
                 dimnames=list(NULL,c("RADIACION","ONDAS",
                                       "DUREZA","MEAN","SD","YPLUS","YMINUS")))
  #Tipo de factor
  if(factorIn==1) #dureza
    { resumen[1,]<-c(radiacionIn, ondasIn, "DURO",
                    meanV[1], sdV[1], yplusV[1], yminusV[1])
      resumen[2,]<-c(radiacionIn, ondasIn, "SUAVE",
                    meanV[2], sdV[2], yplusV[2], yminusV[2])
    }
  if(factorIn==2) #ondas
    { resumen[1,]<-c(radiacionIn, "90", durezaIn,
                    meanV[1], sdV[1], yplusV[1], yminusV[1])
      resumen[2,]<-c(radiacionIn, "400", durezaIn,
```

```

                                meanV[2],sdV[2],yplusV[2],yminusV[2])
        }
        detach(datos)
        datos<-NULL
        rm(datos)
        return(resumen)#regresa medias y SD
    }

# Dibuja una gráfica de tipo Box con dos valores en 'x'
# Parametros:
# @archivoDeDatos. Nombre del archivo 'csv' que contiene los datos
#           a graficar
# @factorIn. Factor considerado:
#           1 = DUREZA, 2 = ONDAS DE CHOQUE, 3=Generador_de_OCH
# @xlabIn. Etiqueta de los datos en eje 'x'
# @mainIn. Título del gráfico
# ver dibujaGraficaErr para los demas parametros de entrada y de salida
dibujaBoxPlot=function(archivoDeDatos, factorIn, ylimIn, xlabIn,
                        mainIn,radiacionIn,ondasIn,durezaIn){
    inactiva.data <- new
    inactiva.data <- read.csv(paste(ruta,archivoDeDatos,sep=""),
                              header = TRUE)
    attach(inactiva.data)

    #calcular log
    inactiva.data$log_No <- log10(inactiva.data$No)
    inactiva.data$log_N <- log10(inactiva.data$N)
    inactiva.data$log_No.N <- inactiva.data$log_No - inactiva.data$log_N

    #Tipo de factor
    if(factorIn==1) #dureza
        myFactor<-log_No.N ~ as.factor(DUREZA)
    if(factorIn==2) #ondas
        myFactor<-log_No.N ~ as.factor(ONDAS)
    if(factorIn==3) #generador de ondas de choque
        myFactor<-log_No.N ~ as.factor(Generador_de_OCH)

    boxplot(myFactor, ylim = ylimIn, xlab=xlabIn,main=mainIn,
            ylab=expression(log[10](Cuenta ~ viable)),
            col=NULL,border="blue",horizontal=FALSE)
    resumen <- dibujaGraficaErr(inactiva.data,factorIn,
                                radiacionIn,ondasIn,durezaIn)
    detach(inactiva.data)
    rm(inactiva.data)
    return(resumen)
}

#-----Empiezan las gráficas

#Dibuja las gráficas1 y guarda un resumen de todas las medias y las SD
#en la variable 'resumenG1'
grafical=function(){
    #dividir pantalla en un grid de 2X2
    par(mfrow=c(2,2))

    #resumen de medias y SD
    resumenG1<-matrix(c(" ",0," ",0.0,0.0,0.0,0.0),
                      nrow=8,ncol=7,byrow=TRUE,
                      dimnames=list(NULL,c("RADIACION","ONDAS",
                      "DUREZA","MEAN","SD","YPLUS","YMINUS")))

```

```

x<-dibujaBoxPlot("RsiO90.csv", 1,NULL,"Dureza relativa",
                 "Modelos expuestos a 90 OCH con luz","SI",90,NULL)
resumenG1[1,]<-x[1,]
resumenG1[2,]<-x[2,]

x<-dibujaBoxPlot("RsiO400.csv", 1,c(0.37,1.35),"Dureza relativa",
                 "Modelos expuestos a 400 OCH con luz","SI",400,NULL)
resumenG1[3,]<-x[1,]
resumenG1[4,]<-x[2,]

x<-dibujaBoxPlot("RnoO90.csv", 1,c(-0.1,0.3),"Dureza relativa",
                 "Modelos expuestos a 90 OCH sin luz","NO",90,NULL)
resumenG1[5,]<-x[1,]
resumenG1[6,]<-x[2,]

x<-dibujaBoxPlot("RnoO400.csv", 1,NULL,"Dureza relativa",
                 "Modelos expuestos a 400 OCH sin luz","NO",400,NULL)
resumenG1[7,]<-x[1,]
resumenG1[8,]<-x[2,]
resumenG1 #muestra medias y SD
}

#Grafica 2
grafica2=function(){
  #dividir pantalla en un grid de 2X2
  par(mfrow=c(2,2))

  x<-dibujaBoxPlot("DuroRsi.csv", 2,c(0.4,0.77),"Ondas de choque",
                  "Modelos duros expuestos a luz","SI",NULL,"DURO")
  x<-dibujaBoxPlot("DuroRno.csv", 2,c(0.05,0.3),"Ondas de choque",
                  "Modelos duros no expuestos a luz","NO",NULL,"DURO")
  x<-dibujaBoxPlot("SuaveRsi.csv", 2,NULL,"Ondas de choque",
                  "Modelos suaves expuestos a luz","SI",NULL,"SUAVE")
  x<-dibujaBoxPlot("SuaveRno.csv", 2,NULL,"Ondas de choque",
                  "Modelos suaves no expuestos a luz","NO",NULL,"SUAVE")
}

#Grafica 3 Inactivación logarítmica en modelos suaves expuestos a 2730 OCH
grafica3=function(){
  par(mfrow=c(1,1))
  inactiva3.data<-NULL
  inactiva3.data <- read.csv(
    paste(ruta,"objetivo_especifico4.csv",sep=""),
    header = TRUE)

  inactiva3.data
  inactiva3.data$log_No <- log10(inactiva3.data$No)
  inactiva3.data$log_N <- log10(inactiva3.data$N)
  inactiva3.data$log_No.N <- inactiva3.data$log_No -
    inactiva3.data$log_N

  inactiva3.data
  attach(inactiva3.data)

  meanV<-c(mean(log_No.N[1:3]),mean(log_No.N[4:6]))#medias
  sdV<-c(sd(log_No.N[1:3]),sd(log_No.N[4:6]))#statistical deviation

  yplusV<-c(meanV[1]+sdV[1],meanV[2]+sdV[2])
  yminusV<-c(meanV[1]-sdV[1],meanV[2]-sdV[2])

  #grafica Box

```

```

boxplot(log_No.N ~ as.factor(Generador_de_OCH),
        xlab="Litotriptores extracorporales",
        ylab=expression(log[10](Cuenta ~ viable)),
        col=NULL,border="blue",horizontal=FALSE)
#grafica de error
errbar(c(1,2),c(meanV),c(yplusV),c(yminusV),
        lty=1,lwd=0,cap=0.018,add=TRUE)
#media
points(c(1,2),c(meanV),pch=19,col="red")

# muestra Media y SD para grafica3
# primer dato corresponde a MEXILIT y el segundo a Piezolith
meanV
sdV
#libera
detach(inactiva3.data)
inactiva3.data<-NULL
rm(inactiva3.data)
}

#Path de todos los archivos 'csv' usados para cargar los datos
ruta<-"C:/Archivos de programa/R/R-2.2.1/work/"

#llama a todas las graficas
grafica1() #grafica Diseño 1a
grafica2() #grafica Diseño 1b
grafica3() #grafica Diseño 2

#SCRIPT Para el cálculo de las ANOVAS de los objetivos específicos 3 y 4.

#Path de todos los archivos 'csv' usados para cargar los datos
ruta<-"C:/Archivos de programa/R/R-2.2.1/work/"

#-----Anova Objetivo especifico3
#cargar datos
inactiva.data <- read.csv(paste(ruta,"resultados_finales.csv",sep=""),
                          header = TRUE)
attach(inactiva.data)

#calcular logaritmos
inactiva.data$log_No <- log10(inactiva.data$No)
inactiva.data$log_N <- log10(inactiva.data$N)
inactiva.data$log_No.N <- inactiva.data$log_No - inactiva.data$log_N

#calcular ANOVA
inactiva.aov <- aov(log_No.N ~ (RADIACION + DUREZA + ONDAS)^2 + LOTE,
                    data = inactiva.data )

#resumen
summary(inactiva.aov)

#liberar
detach(inactiva.data)
rm(inactiva.data)
rm(inactiva.aov)

#-----Anova Objetivo especifico4
#cargar datos
inactiva1.data <- read.csv(paste(ruta,"objetivo_especifico4.csv",sep=""),

```



```

header = TRUE)
attach(inactiva1.data)

#calcular logaritmos
inactiva1.data$log_No <- log10(inactiva1.data$No)
inactiva1.data$log_N <- log10(inactiva1.data$N)
inactiva1.data$log_No.N <- inactiva1.data$log_No - inactiva1.data$log_N

#calcular ANOVA
inactiva1.aov <- aov(log_No.N ~ (Generador_de_OCH)^2 + LOTE,
                    data = inactiva1.data )

#presentar resumen
summary(inactiva1.aov)

#liberar
detach(inactiva1.data)
rm(inactiva1.data)
rm(inactiva1.aov)

```

Contenido de los archivos utilizados en los Scripts.

SuaveRsi.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	SI	SUAVE	90	5000000	17700000	7.69897	7.247973	0.45099674
2	SI	SUAVE	90	3500000	16400000	7.544068	7.214844	0.3292242
3	SI	SUAVE	90	6100000	16600000	7.78533	7.220108	0.56522175
1	SI	SUAVE	400	3400000	5100000	7.531479	6.70757	0.82390874
2	SI	SUAVE	400	4000000	1770000	7.60206	6.247973	1.35408672
3	SI	SUAVE	400	6100000	7600000	7.78533	6.880814	0.90451624

SuaveRno.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	NO	SUAVE	90	3400000	28400000	7.531479	7.453318	0.07816058
2	NO	SUAVE	90	3500000	21400000	7.544068	7.330414	0.21365427
3	NO	SUAVE	90	4200000	45000000	7.623249	7.653213	-0.02996322
1	NO	SUAVE	400	5000000	16200000	7.69897	7.209515	0.48945499
2	NO	SUAVE	400	3500000	17600000	7.544068	7.245513	0.29855538
3	NO	SUAVE	400	4200000	24000000	7.623249	7.380211	0.24303805

DuroRsi.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	SI	DURO	90	4600000	15200000	7.662758	7.181844	0.48091424
2	SI	DURO	90	4300000	11200000	7.633468	7.049218	0.58425043
3	SI	DURO	90	6400000	23700000	7.80618	7.374748	0.43143163
1	SI	DURO	400	4600000	14400000	7.662758	7.158362	0.50439534
2	SI	DURO	400	9900000	17700000	7.995635	7.247973	0.74766193
3	SI	DURO	400	4500000	13600000	7.653213	7.133539	0.51967361

DuroRno.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	NO	DURO	90	4100000	22700000	7.612784	7.356026	0.256758
2	NO	DURO	90	9900000	85000000	7.995635	7.929419	0.06621627
3	NO	DURO	90	6400000	38000000	7.80618	7.579784	0.22639638

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	NO	DURO	400	41000000	25800000	7.612784	7.41162	0.20116415
2	NO	DURO	400	99000000	76000000	7.995635	7.880814	0.1148216
3	NO	DURO	400	44000000	26700000	7.643453	7.426511	0.21694142

RsiO400.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	SI	DURO	400	46000000	14400000	7.662758	7.158362	0.50439534
2	SI	DURO	400	99000000	17700000	7.995635	7.247973	0.74766193
3	SI	DURO	400	45000000	13600000	7.653213	7.133539	0.51967361
1	SI	SUAVE	400	34000000	5100000	7.531479	6.70757	0.82390874
2	SI	SUAVE	400	40000000	1770000	7.60206	6.247973	1.35408672
3	SI	SUAVE	400	61000000	7600000	7.78533	6.880814	0.90451624

RsiO90.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	SI	DURO	90	46000000	15200000	7.662758	7.181844	0.48091424
2	SI	DURO	90	43000000	11200000	7.633468	7.049218	0.58425043
3	SI	DURO	90	64000000	23700000	7.80618	7.374748	0.43143163
1	SI	SUAVE	90	50000000	17700000	7.69897	7.247973	0.45099674
2	SI	SUAVE	90	35000000	16400000	7.544068	7.214844	0.3292242
3	SI	SUAVE	90	61000000	16600000	7.78533	7.220108	0.56522175

RnoO400.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	NO	DURO	400	41000000	25800000	7.612784	7.41162	0.20116415
2	NO	DURO	400	99000000	76000000	7.995635	7.880814	0.1148216
3	NO	DURO	400	44000000	26700000	7.643453	7.426511	0.21694142
1	NO	SUAVE	400	50000000	16200000	7.69897	7.209515	0.48945499
2	NO	SUAVE	400	35000000	17600000	7.544068	7.245513	0.29855538
3	NO	SUAVE	400	42000000	24000000	7.623249	7.380211	0.24303805

RnoO90.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N	log_No	log_N	log_No.N
1	NO	DURO	90	41000000	22700000	7.612784	7.356026	0.256758
2	NO	DURO	90	99000000	85000000	7.995635	7.929419	0.06621627
3	NO	DURO	90	64000000	38000000	7.80618	7.579784	0.22639638
1	NO	SUAVE	90	34000000	28400000	7.531479	7.453318	0.07816058
2	NO	SUAVE	90	35000000	21400000	7.544068	7.330414	0.21365427
3	NO	SUAVE	90	42000000	45000000	7.623249	7.653213	-0.02996322

Resultados_finales.csv

LOTE	RADIACION	DUREZA	ONDAS	No	N
uno	NO	DURO	90	41000000	22700000
uno	NO	DURO	400	41000000	25800000
uno	NO	SUAVE	90	34000000	28400000
uno	SI	SUAVE	400	34000000	5100000
dos	NO	SUAVE	400	50000000	16200000
dos	SI	DURO	400	46000000	14400000
dos	SI	DURO	90	46000000	15200000
dos	SI	SUAVE	90	50000000	17700000

tres	NO	DURO	90	99000000	85000000
tres	NO	DURO	400	99000000	76000000
tres	SI	SUAVE	400	40000000	17700000
tres	SI	DURO	400	99000000	17700000
cuatro	SI	DURO	90	43000000	11200000
cuatro	NO	SUAVE	90	35000000	21400000
cuatro	NO	SUAVE	400	35000000	17600000
cuatro	SI	SUAVE	90	35000000	16400000
cinco	SI	DURO	400	45000000	13600000
cinco	NO	SUAVE	400	42000000	24000000
cinco	NO	DURO	400	44000000	26700000
cinco	NO	SUAVE	90	42000000	45000000
seis	SI	SUAVE	90	61000000	16600000
seis	SI	DURO	90	64000000	23700000
seis	NO	DURO	90	64000000	38000000
seis	SI	SUAVE	400	61000000	76000000

Objetivo_especifico4.csv

LOTE	Generador_de_OCH	Número_de_OCH	No	N
1	MEXILIT II	2730	22000000	19900000
2	MEXILIT II	2730	22000000	18900000
3	MEXILIT II	2730	22000000	20800000
1	Piezolith 2300	2730	26300000	19600000
2	Piezolith 2300	2730	26300000	18600000
3	Piezolith 2300	2730	26300000	19800000

Referencias

- [1] Conte. A., Grases F., Costa-Bauzá A. & Pizá P.: Microinfecciones y litiasis renal. Arch. Esp. de Urol. [online]., **54**(9):855-860, 2001. URL http://www.arch-espanoles-de-urologia.es/ver_articulo.php?id=54-09-3#
- [2] Lerner S.P., Gleeson M.J. & Griffith D.P.: Infection stones. J. Urol., **141**:753-758, marzo 1989.
- [3] Fowler J.E., Jr.: Bacteriology of branched renal calculi and accompanying urinary tract infection. J. Urol., **131**:213-215, Febrero 1984.
- [4] Krieger J.N.: Urinary tract infections: What's new? J. Urol., **168**:2351–2358, diciembre 2002.
- [5] Fuertes M., Fernández J.C., Mohamed Z., Samblas R., Fernández H., Senovilla J.L. & Resel L.: Estado actual de la litotripsia extracorpórea mediante ondas de choque. Clínicas Urológicas de la Complutense, **3**:529-561, 1995.
- [6] Michaels E., Fowler. J.E., Jr. & Mariano M.: Bacteriuria following extracorporeal shock wave lithotripsy of infection stones. J. Urol., **140**:254-256, agosto 1988.
- [7] Pode D., Lenkovsky Z., Shapiro A. & Pfau A.: Can extracorporeal shock wave lithotripsy eradicate persistent urinary infection associated with infected stones?. J. Urol., **140**:257-259, agosto 1988.
- [8] Beck E.M & Riehle R.A., Jr.: The fate of residual fragments after extracorporeal shock wave lithotripsy monotherapy of infection stones. J. Urol., **145**:6-10, enero 1991.
- [9] Stroom S.B.: Long-term incidence and risk factors for recurrent stones following percutaneous nephrostolithotomy or percutaneous nephrostolithotomy/extracorporeal shock wave lithotripsy for infection related calculi. J. Urol., **153**:584–587, marzo 1995.
- [10] Raz R., Zoabi A., Sudarsky. M. & Shental J.: The induced of urinary tract infection in patients without bacteriuria who underwent extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Urol., **151**:329-330, febrero 1994.
- [11] Pettersson B. & Tiselius H.-G.: Are prophylactic antibiotics necessary during extracorporeal shock wave lithotripsy?. Br. J. Urol., **63**:449-452, 1989.
- [12] Li L., Shen Z., Wang H., Fu S. & Cheng G.: Investigation of infection risk and the value of urine endotoxin during extracorporeal shock wave lithotripsy. Chi. Med. J., **114**(5):510-513, 2001.
- [13] Westh H., Knudsen F., Hedengran A-M., Weischer M., Mogensen P., Andersen J. & The Copenhagen Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy Study Group.: Extracorporeal

shock wave lithotripsy of kidney stones does not induced transient bacteremia. A prospective study. *J. Urol.*, **144**:15-16, julio 1990.

[14] Gasser T.C. & Frei R.: Risk of bacteremia during extracorporeal shock wave lithotripsy. *Br. J. Urol.*, **71**:17-20, 1993.

[15] Loske A.M., Prieto F.E., Zavala M., Santana A. & Armenta E.: Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation. *Shock Waves*, **9**:49-55, 1999.

[16] Von Eiff C., Overbeck J., Haupt G., Herrmann S., Winckler S., Richter K.-D., Peters G. & Spiegel H.-U.: Bactericidal effect of extracorporeal shock wave on *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, **49**: 709-711. 2000

[17] Loske A.M., Álvarez U., Cabello M., Herrera C., Barajas A. & Prieto F.E.: Bactericidal effect of underwater shock waves. S.E.A., septiembre 2002 URL: <http://www.ia.csic.es/sea/sevilla02/ult01012.pdf>

[18] Loske A.M, Mora U., Hernández C., Castaño E. & Prieto F.E.: Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. *Innovative Food Sci. & Emerging Tech.*, **3**:321-327, 2002.

[19] Loske, A.M.: Generación de ondas de choque débiles en agua por rompimiento eléctrico, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 1990.

[20] Loske A.M. & Prieto F.E.: Las ondas de choque en la litotripsia extracorporeal. *Rev. Fac. Med. UNAM*, **33**(2):81-136, marzo-abril 1990.

[21] Loske A.M. & Prieto F.E: Fundamentos técnicos de litotripsia extracorporeal. JGH Editores, México, 1999. ISBN 970-681-001-3.

[22] Méndez, A.: Operación y control automatizados de un generador de ondas de choque, Tesis de Ingeniería, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2005.

[23] Hunter P.T., Finlayson B., Hirko R.J., Voreck W.C., Walker R., Walck S. & Nasr M.: Measurement of shock waves pressures used for lithotripsy. *J. Urol.*, **136**:733-738, septiembre 1986.

[24] Loske A.M.: Application of shock waves in medicine. In G. Ben-Dor, G. Elperin, & O. Igra, *Handbook of shock waves*. Academic Press, Nueva York, **2**: 415-440, 2001. ISBN 0-12-086432-2.

[25] Thiel, M.: Application of shock waves in medicine. *Clinical orthopaedics and related research*. **387**:18-21, 2001.

[26] Lawrence A.C.: Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL. *J. Urol.*, **140**:1587-1590, diciembre 1988.

- [27] Wilde T., Díaz B., Samacá Y., Silva J. M. & Morales G.: Litiasis renal y ureteral. Asociación Colombiana de Facultades de Medicina (ASCOFAME). [online]. URL: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urologia/guiacolombianalitiasis.pdf>
- [28] Gault M.H. & Chafe L.: Relationship of frequency, age, sex, stone weight and composition in 15, 624 stones: comparison of result for 1980 to 1983 and 1995 to 1998. *J. Urol.*, **164**:302–307, agosto 2000.
- [29] Grases F., Conte A., Costa-Bauzá A. & Ramis M.: Tipos de cálculos renales. Relación con la bioquímica urinaria. *Arch. Esp. de Urol.* [online]., **54**(9):861-871, 2001. URL http://www.arch-espanoles-de-urologia.es/ver_articulo.php?id=54-09-4#
- [30] Kramer G., Klingler H.C. & Steiner G.E.: Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr. Opin. Urol.*, **10**:35-38, 2000.
- [31] García E. Olavi E., Çiftçioglu N, Lovaco F., Correa C., González J., Mampaso F., Liaño F., García E. y Escudero A.: Nanobacteria. Un modelo de neo-litogénesis experimental. *Arch. Esp. de Urol.* [online]., **53**(4): 291-303, 2000. URL: http://www.arch-espanoles-de-urologia.es/ver_articulo.php?id=53-04-1
- [32] López H., Zitto T. & Bresso C.: Infección urinaria. *IntraMed* [online]. URL: http://www.intramed.net/actualidad/art_1.asp?idActualidad=42427&nomCat=Art%C3%A Dculos
- [33] Franco D.: Comparación del estudio bacteriológico de los cálculos urinarios e infección de vías urinarias. Tesis de postgrado, Hospital Civil Dr. Juan I. Menchaca, Subdirección de enseñanza e investigación médica, UDG, marzo 2003.
- [34] Lingman J.E., Woods J., Toth P.D., Evan A.P. & McAtter J.A.: The role of lithotripsy and its side effects. *J. Urol.*, **141**:793-797, marzo 1989.
- [35] Marcellan F.J., Ibarz L. & Salinas D.: Litiasis infecciosa. Tratamiento y complicaciones. *Arch. Esp. de Urol.* [online]., **54**(9):937-950, mayo 2001. URL: http://www.arch-espanoles-de-urologia.es/ver_articulo.php?id=54-09-10#
- [36] Prieto F.E., Loske A.M. & Yarger F.L.: An underwater shock wave research device. *Rev. Sci. Instru.*, **62**(7):1849-1853, julio 1991.
- [37] KERR DIV OF SYBRON CORP -- 00438 VEL-MIX STONE -- 6520-00-935-1009. URL: <http://web.grcc.cc.mi.us/Pr/msds/dental/Vel-Mix.txt>
- [38] Bayne S.C.: CAST and DIE STONE CAST (Gypsum Products). DENT204, UNC Casting Alloys. URL <http://www.dent.unc.edu/portfolios/bayne/dental-materials/Die-Stone-PPT-SS.pdf>
- [39] Hong T.Y & Wong M.: How significant are clinically insignificant residual fragments following lithotripsy? *Curr. Opin. Urol.* **15**:127–131, 2005.

[40] Goefrit O.N., Pode D. Meretyk S., Katz G., Shapiro A., Golijanin D., Wiener D.P., Shenfeld O.Z. & Landau E.H.: Is the pediatric ureter as efficient as the adult ureter in transporting fragments following extracorporeal shock wave lithotripsy for renal calculi larger than 10 mm.? J. Urol., **166**:1862–1864, november 2001.

[41] Box G.E.P, Hunter W.G. and Hunter J.J.: Statistics for experiments. Ed. John Wiley & Sons. Nueva York, 1978.

[42] R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

[43] Tenke P., Kovacs B., Jäckel M. & Nagy E.: The role of biofilm infection in urology. W. J. Urol., **24**: 13–20, enero 2006.

[44] Rassweiler J., Renner C. & Eisenberger F.: The management of complex renal stones. Br. J. Urol., **86**:919-928, noviembre 2000.

[45] Suhr D., Brummer F. & Hulser D.F.: Cavitation generated free radicals during shock wave exposure: Investigations with cell free solutions and suspended cells. Ultrasound Med. Biol., **17**(8):761-768, 1991.

[46] Smits. G.A.H.J., Oosterhof G.O.N, de Ruyter A.E., Schalken J.A. & Debruyne F.M.J.: Cytotoxic effects of high energy shock wave in different in vitro models: influence of experimental set-up. J. Urol., **145**:171-175, enero 1991.

[47] Speed C.: Extracorporeal shock-wave therapy in the management of chronic soft tissue conditions. J. Bone Joint Surg. (Br), **86-B**:165-71, marzo 2004.

[48] Leal C., López J.C. & Reyes O.E.: Ondas de choque en Ortopedia y Traumatología. Revista colombiana de ortopedia y traumatología, **16**(2): Sección V, julio 2002.

[49] Mastikhin I., Teslenko V., Nikolin V., Kolosova N. & Gorchakov V.: Tumor growth inhibition by shock wave activated cellular sensitivity to chemotherapy. W.C.U., 1161-1164, septiembre 2003. URL: http://www.unb.ca/fredericton/science/physics/prof/WCU_Paris_paper.pdf

[50] Garza R.: BACTERIOLOGÍA. Patología asociada a las enterobacterias y *P. aeruginosa*. VII. ENTEROBACTERIAS y *P. aeruginosa*. URL: <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/APUN-EnterobPseud.pdf>