



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

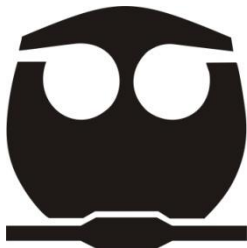
**Estudio del efecto del ultrasonido en sangre
humana mediante una prueba reométrica.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

BRENDA SÁNCHEZ VÁZQUEZ



MEXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARCO ANTONIO URESTI MALDONADO

VOCAL: Profesor: OCTAVIO MANERO BRITO

SECRETARIO: Profesor: LUIS MEDINA TORRES

1er. SUPLENTE: Profesor: PRAXEDIS ISRAEL SANTAMARÍA MATA

2° SUPLENTE: Profesor: FAUSTO CALDERAS GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES - UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. OCTAVIO MANERO BRITO

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. FAUSTO CALDERAS GARCÍA

SUSTENTANTE: BRENDA SÁNCHEZ VÁZQUEZ

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	4
Justificación.....	5
Introducción.....	6
I. Generalidades.....	7
Sangre.....	7
Reología.....	19
Ultrasonido.....	28
II. Desarrollo experimental.....	30
III. Resultados y Discusión.....	34
IV. Conclusiones.....	46
V. Perspectivas.....	47
VI. Bibliografía.....	48

ABREVIATURAS

G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
	Densidad
	Esfuerzo
	Rapidez de corte
H	Viscosidad absoluta
μ	Viscosidad dinámica o aparente
V	Viscosidad cinemática
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Hz	Hertz
	Deformación máxima (amplitud)
	Esfuerzo máximo
W	Velocidad angular
F	Frecuencia
T	Tiempo

RESUMEN

El presente trabajo muestra el efecto que ejerce la aplicación de ultrasonido sobre la sangre humana mediante una prueba reométrica. Los experimentos se realizaron en un Reómetro de esfuerzos controlados AR 1000 N TA INSTRUMENTS®, localizado en el Instituto de Investigaciones de Materiales-UNAM, que tiene acoplado un accesorio con elementos piezoeléctricos que generan ondas ultrasónicas y que fue diseñado especialmente para esta clase de pruebas (patente en trámite).

La primera parte de la experimentación se basó en realizar un protocolo de trabajo. Una vez logrado este objetivo se procedió a realizar pruebas oscilatorias de baja amplitud y de corte simple en estado estacionario, para seguir la evolución de los módulos viscoso y elástico (G'' y G') y la viscosidad con respecto al tiempo. Al aplicarse pulsos ultrasónicos se observaron cambios tanto en ambos módulos como en la viscosidad. Además, se tomaron fotos con ayuda de un microscopio óptico de las muestras antes y después de los experimentos.

Previamente, se realizaron pruebas bioquímicas para saber la concentración de colesterol total en las muestras de sangre. Los resultados de éstas se utilizaron para poder relacionar el efecto del colesterol sobre la reología de la sangre en presencia de pulsos ultrasónicos. Dicho efecto se estudió mediante pruebas reométricas.

Se demostró que diversas frecuencias de ultrasonido afectan el comportamiento reológico (módulos viscoso y elástico de la sangre). Sorpresivamente, se encontró que el contenido de colesterol ofrece una mayor estabilidad a la sangre frente a las perturbaciones ocasionadas por pulsos ultrasónicos.

ABSTRACT

This study shows the effect of ultrasound on human blood through reometric tests. Experiments were performed in a controlled stress rheometer AR 1000 N TA INSTRUMENTS, located in the Institute of Materials Research-UNAM. This equipment has attached an accessory with piezoelectric elements which generates ultrasonic waves. It was designed, developed and constructed specifically for this kind of tests (patent under revision).

First part of the experimental procedure consisted on developing a work protocol. After, low amplitude oscillatory and simple shear experiments were done in steady state, in order to follow the viscous and elastic moduli evolution. When ultrasonic pulses were applied, changes in both modules (G'' and G') and viscosity were observed. In addition, photographs of the samples were taken before and after of the application of ultrasound using an optical microscope.

Subsequently, biochemical tests were made to determine the total cholesterol concentration in blood. These results were used to correlate the effect of cholesterol on blood rheology under ultrasonic pulses.

Results show that ultrasound affects the blood rheological behavior (viscosity and modulus). Surprisingly, it was found that the higher cholesterol concentration provides greater blood stability against any perturbation caused by the ultrasonic pulses.

JUSTIFICACIÓN

Aún cuando los avances científicos desarrollados en el campo de la reología se han incrementado considerablemente, en la rama de la hemorreología existe muy poca información acerca de la relación de las propiedades mecánicas y dinámicas que tiene la sangre humana, mucho menos la repercusión que tiene la aplicación de ultrasonido en ésta. En este estudio se pretende ampliar los conocimientos en este ámbito, dado que los resultados que arrojará este estudio serán punto de partida en la investigación básica y de aplicaciones tecnológicas en diferentes áreas de la medicina. Este trabajo representa un gran avance en el área de la hemorreología, ya que no existen datos “in situ” de las repercusiones que ocasiona el ultrasonido en la sangre, reportados en la literatura.

INTRODUCCIÓN

La sangre es un fluido que tiene muchas funciones en el cuerpo humano, entre ellas el transporte de oxígeno, metabolitos y nutrientes. Una muestra de sangre está constituida principalmente por dos componentes, es decir, hay 50 % de plasma y 50 % de células. El plasma es un líquido acuoso constituido por 91.5 % agua y 8.5 % de solutos, entre estos últimos se encuentran proteínas tales como la albumina, globulinas y fibrinógeno, además de electrolitos, nutrientes, hormonas, etc. Mientras que las células son: glóbulos rojos, glóbulos blancos, y plaquetas.

Para realizar sus diversas tareas, la sangre recorre una intrincada red de venas y arterias, con diámetros que van de 5 μm hasta 3 cm. El flujo de la sangre a través de esta red depende de la composición de la misma y la presión que obligue a ésta a fluir.

Dentro de la sangre existen diversas interacciones intercelulares. La agregación celular promueve una función adecuada de la sangre, sin embargo, cambios en esta agregación pueden llegar a tener repercusiones fisiológicas y patológicas. La presencia de colesterol representa un punto importante, ya que en función de la concentración de éste se forman estructuras transitorias más complejas y difíciles de desagregar.

Como ya se menciona, la sangre está constituida principalmente por dos componentes: el plasma y las células. La presencia de todas estas partículas, influyen directamente en su viscosidad. Sin embargo, la reología de la sangre está dictada en su totalidad por los eritrocitos, dado que es la población dominante de células frente a los leucocitos y plaquetas. Cabe mencionar que las proteínas (anticuerpos, albúmina etc.), colesterol total y triglicéridos hacen evidente su presencia y concentración cuando la rapidez de deformación es alrededor de 1 s^{-1} .

La sangre es una suspensión muy concentrada cuyas propiedades de flujo son muy importantes, a la vez que poco habituales, por lo que existe una

rama de la reología dedicada al estudio de la reología de la sangre, ésta es llamada hemorreología.

El ultrasonido es una onda mecánica cuya frecuencia se ubica por arriba de 20 kHz, está por debajo del rango audible para el ser humano. En la actualidad tiene diversas aplicaciones tanto en el aspecto clínico como en el aspecto industrial.

En este trabajo, se estudia el comportamiento reológico de sangre humana aplicando pulsos de ultrasonido en lapsos de tiempo controlados con la finalidad de monitorear las estructuras transitorias que se forman a lo largo del experimento.

OBJETIVO.

Objetivos generales

- Identificar las variables críticas con las cuales se puede estudiar la sangre humana para así poder desarrollar un protocolo de trabajo.
- Mediante pruebas reológicas de tipo oscilatorio de baja amplitud, observar el cambio en el módulo elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo causado por el efecto del ultrasonido en la sangre humana.
- Analizar el comportamiento reológico de la sangre humana, al aplicar pulsos de ultrasonido y buscar una relación entre ésta y la concentración de lípidos en plasma.

Objetivos particulares

- Encontrar una frecuencia donde se logre desagregar las estructuras transitorias formadas por las células de la sangre
- Proponer qué elementos (eritrocitos, proteínas, etc.) de la sangre humana se ven afectados por la frecuencia ultrasónica encontrada.
- Analizar el comportamiento de los lípidos, mediante técnicas reológicas, al aplicar pulsos de ultrasonido a la sangre humana.

HIPÓTESIS

- Los eritrocitos de manera natural forman estructuras transitorias de baja duración, este fenómeno se ve potenciado por la presencia de colesterol total; por ende la duración de estas estructuras transitorias será mayor.
- Debido a la naturaleza de las proteínas encontradas en la sangre humana, estas serán afectadas en mayor medida por los pulsos de ultrasónicos.
- Al utilizar frecuencias de resonancia en el material piezoeléctrico se observarán cambios más significativos en ambos módulos ya que se estará manifestando la mayor cantidad de energía posible.
- La onda mecánica ocasionada por el ultrasonido perturbará la sangre de tal manera que el colesterol que se encuentra aglomerado se desagregará, logrando que los módulos tiendan a disminuir, siendo así que las muestras con mayor contenido de colesterol presentarán este efecto más marcado.

I ANTECEDENTES

1.1 Sangre humana

La sangre tiene como papel principal el transporte de nutrientes, metabolitos, oxígeno, dióxido de carbono y demás sustancias a través de todo el cuerpo humano. Para realizar esta tarea, la sangre recorre una intrincada red de conductos, con diámetros que van de los 3 cm hasta los 5 μm . El flujo de la sangre a través de esta red depende de la composición de la misma y la presión que obligue a ésta a fluir. En un humano adulto, la sangre esta compuesta por dos elementos principales, los elementos celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y elementos localizados en el plasma (mezcla de metabolitos, proteínas y lipoproteínas en una solución de sales y agua). Con respecto a la densidad de la sangre, esta se ha determinado en por varios grupos de investigación y se ha encontrado que la densidad de sangre total oscila entre 1,06 —, 1,058 —, y 1,035 —. Esta se calculó en todos los casos empleando la relación: —————. Las variaciones en la densidad de la sangre son por la presencia de anemias, hemoconcentración (pérdida excesiva de líquidos en casos de diarreas abundantes, sudoración, asistolia etc.) y hemodilución (hidremia). [15]

1.1.1 Iones

Disueltos en el agua hay iones inorgánicos tales como el bicarbonato (HCO_3^-), potasio (K^+), sodio (Na^+), cloruro (Cl^-), fosfatos (PO_4^{3-}) y calcio (Ca^{2+}), entre otros. Desde el punto de vista reológico esto resulta muy importante [5]; la concentración de estos iones repercute directamente en la presión osmótica y a su vez con el contenido de agua dentro y fuera de la célula; la viscosidad de la sangre se modifica por la cantidad de agua en el medio [11] .A continuación se presentan los valores normales de estos iones en una persona sana (Tabla 1.1 y 1.2).

Cationes	Concentración normal (mEq/ L)
Sodio	142
Potasio	4
Calcio	5

Tabla 1.1-Concentración plasmática promedio de iones inorgánicos.

Aniones	Concentración normal (mEq/ L)
Fosfato	2
Bicarbonato	27
Cloruro	104

Tabla 1.2- Concentración plasmática promedio de aniones inorgánicos

1.1.2 Eritrocitos

También llamados glóbulos rojos o hematíes, éstos son los elementos formes más abundantes en la sangre humana, son discos bicóncavos de aproximadamente 0,005 mm de diámetro y 0,001 mm de ancho. Los eritrocitos contienen en su interior la hemoglobina y son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo. Del total de la sangre, los eritrocitos representan el 40 a 50 % en hombres y del 36 al 46 % en mujeres, siempre y cuando no haya una patología en curso. En comparación los glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas representan únicamente el 1% del total de una muestra de sangre. [12]

La reología de la sangre está dictada en su totalidad por los eritrocitos, dado que es la población dominante de células frente a los leucocitos y plaquetas. Cabe mencionar que las proteínas (anticuerpos, albúmina etc.), colesterol total y triglicéridos hacen evidente su presencia y concentración cuando la rapidez de deformación es alrededor de 1 s^{-1} . [14]

Se pensaba que la sangre se comportaba como un fluido newtoniano; según lo reportado por *Thurston, G. B.*, sin embargo, la sangre tiene un comportamiento diametralmente diferente, es un fluido cuya viscosidad cortante depende de la rapidez de deformación, es decir se comporta como un fluido no newtoniano. La prueba de dicho comportamiento se ve reflejada en una curva viscosidad vs. rapidez de deformación, en donde el perfil reológico de la sangre corresponde a la de un fluido adelgazante; esto se debe a que las interacciones químicas y físicas entre una célula y otra se debilitan paulatinamente, por acción del flujo, por lo tanto los elementos formes se orientan en la dirección en la cual están siendo obligados a fluir, lo que se refleja en la disminución de la viscosidad conforme la rapidez de deformación aumenta. A continuación se presenta en la Tabla 1.3 la composición de la sangre. [1]

91.5 % de agua		
8.5% de solutos	7% proteínas	Albúmina 54% Globulinas 38% Fibrinógeno 7% Otras 1%
	1,5% otros componentes	Electrolitos Nutrientes Gases Enzimas Hormonas Amortiguadores Vitaminas Productos de desecho

Tabla 1.3- Composición de la sangre

1.1.3 Interacciones intercelulares

Las repercusiones fisiológicas y patológicas de la agregación celular juegan un papel trascendental en la función adecuada de la sangre. Mecanismos como impedimento estérico entre glicoproteínas y la carga eléctrica natural (negativa) de las células sanguíneas son los principales mecanismos que afectan la interacción de los eritrocitos y la formación de estructuras llamadas *Rouleaux* o “pilas de monedas”, además de formaciones irregulares o *clusters*, estas formaciones se refieren solamente a los eritrocitos y se presentan en casos como el embarazo, aumento en la concentración de fibrinógeno, inmunoglobulinas policlonales o α_2 macroglobulina. (Figura 1.1). [13]

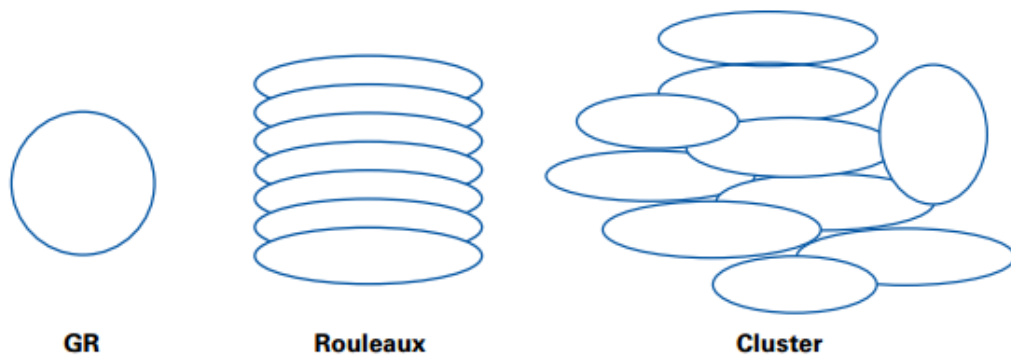


Figura 1.1- Representación de glóbulos rojos, Rouleaux y Cluster. [23]

Es de suma importancia mencionar que la estructuración a la que se refiere en este trabajo es transitoria, se considera así sólo cuando unos pocos eritrocitos quedan juntos o tienen interacción entre sí, a pesar de que el tiempo sea muy corto. Dicha estructuración es transitoria y de corta duración a diferencia de un trombo o un coágulo que son estructuras estables y de larga duración estabilizadas por proteínas.

1.1.4 Plaquetas

Estos elementos sanguíneos son células no nucleadas, se producen a partir del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea. El proceso de adhesión (unión de las plaquetas a superficies endoteliales) es

reversible y tiene como finalidad el cierre de brechas en el endotelio. La agregación (unión de plaquetas entre si), es un proceso irreversible que tiene la finalidad de formar tapones plaquetarios y secretar sustancias quimiotácticas procoagulantes.

Este par de procesos se presentan de manera natural cuando hay lesiones en el endotelio o cuando el flujo sanguíneo presenta una turbulencia tal que las colisiones entre las plaquetas provocan lesiones en su membrana y se activan. Se ha encontrado que el efecto de la agregación plaquetaria inducida por el esfuerzo cortante (SIPA), se hace presente cuando dicho esfuerzo es \sim o 0.1 Pa, pero se hace más evidente cuando el esfuerzo es mayor a \sim o 0.8 Pa en pruebas de corte simple.

Estos elementos celulares carecen de importancia reológica siempre dado que en las pruebas oscilatorias de baja amplitud, el esfuerzo cortante es aproximadamente 10 veces más pequeño \sim o 0.1 Pa que lo reportado en el estudio de fenómenos SIPA, *Gaurav Girdhar et al 2008*. Además la agregación plaquetaria está mediada por la concentración de Ca^{2+} libre en plasma, de esta razón se hace necesario, para manejar la sangre *in vitro*, el uso de el EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) o sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético. Esta sustancia actúa mediante un efecto quelante sobre el ion calcio, impide la formación de los complejos procoagulantes en los que este ion participa [15].

1.2 Metabolitos plasmáticos y su repercusión reológica

1.2.1 Colesterol

Los lípidos en el cuerpo humano son la principal fuente de energía metabólica. En el aspecto clínico, los lípidos plasmáticos importantes son el colesterol total, el de alta densidad, de baja densidad y los triacilgliceroles (triglicéridos). El colesterol puede provenir tanto de la dieta o de la síntesis *in novo* en prácticamente todas las células

El colesterol es un lípido de gran masa molecular (386.65 g/mol) el cual juega un papel importante como componente estructural de las membranas celulares y es un precursor inmediato de los ácidos biliares, vitamina D y hormonas esteroideas. Se encuentra de manera abundante en las estructuras mielinadas del cerebro y en el sistema nervioso central, también está presente en pequeñas cantidades en la mitocondria.

Los lípidos fluyen por medio del torrente sanguíneo y al tener una base grasa no se mezclan con la sangre, la cual tiene una base acuosa, por lo que el cuerpo combina el colesterol en partículas recubiertas de proteínas llamadas lipoproteínas (lípido + proteína) que se mezclan fácilmente con la sangre. Las proteínas usadas se llaman apolipoproteínas, [6]

El colesterol, los triglicéridos y los fosfolípidos son los contenidos en las partículas mencionadas anteriormente. A pesar de que el colesterol es esencial para el buen funcionamiento del cuerpo, cuando existe una cantidad excesiva es perjudicial para las arterias y el corazón.

Las lipoproteínas se clasifican en base a su tamaño, densidad y movilidad electroforética, habiendo quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL).

Las dos lipoproteínas principales son las LDL y HDL. Aproximadamente entre el 60% y 70% del colesterol se transporta en partículas de LDL y éstas lo llevan a donde se necesite, por el contrario las HDL recogen el colesterol sobrante de los tejidos y células devolviéndolos al hígado.

En trabajos previos, se ha encontrado que las concentraciones de colesterol total en sangre repercuten directamente en la viscosidad de la misma, tal como se muestra en la siguiente Figura (1.2) [15]

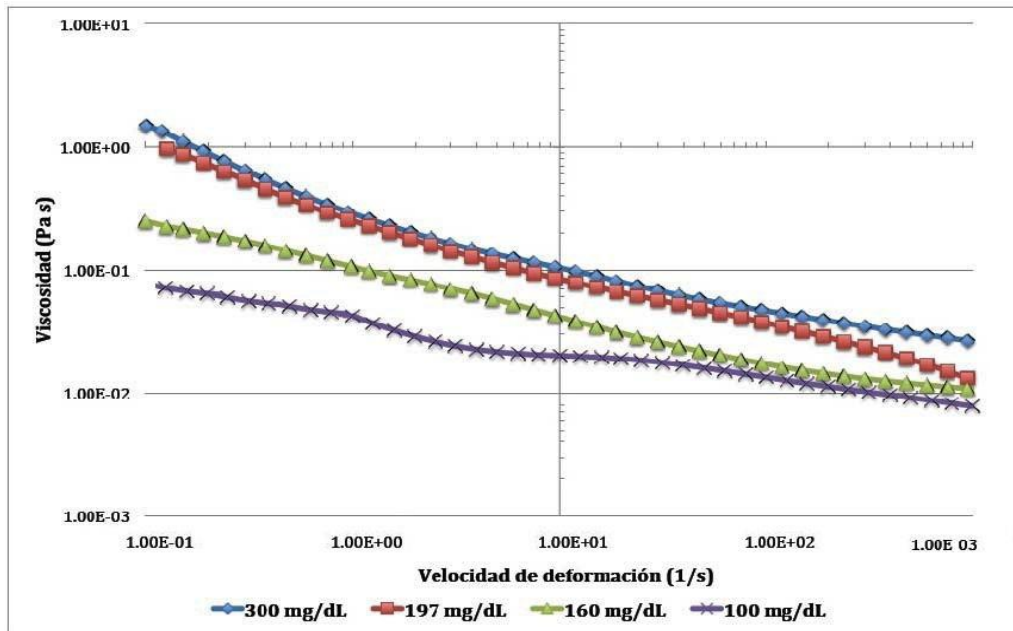


Figura 1.2- 4 Muestras de sangre con diferentes concentraciones de colesterol total y su repercusión en la viscosidad de la misma, en ensayos de corte simple en estado estacionario.

A lo largo de la ventana de observación es notorio el efecto que tiene el colesterol total en la viscosidad de la sangre, siendo más evidente a baja rapidez de deformación; esto se debe a los mecanismos naturales de agregación celular (de manera transitoria únicamente) y sinergizados por la concentración de colesterol. En la Figura 1.3 se ilustran dichos mecanismos de desagregación celular por acción de fuerzas cortantes. [16]

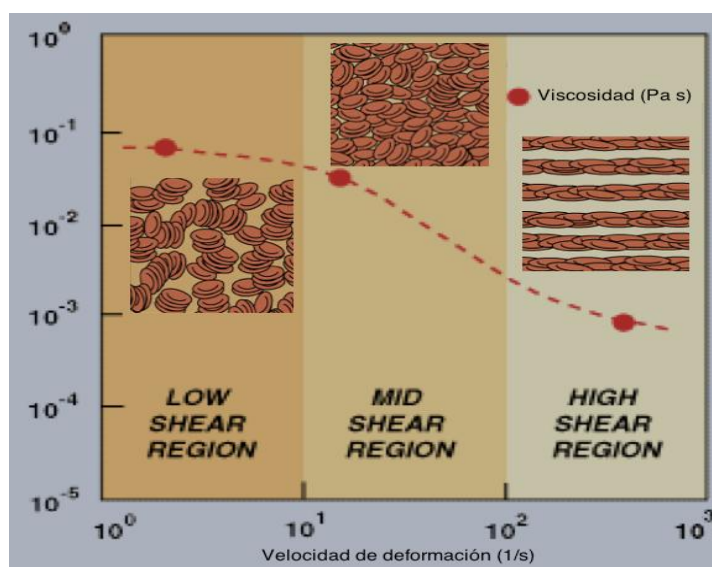


Figura 1.3-La línea en negro representa una muestra de sangre real sin diluir y la línea punteada roja es una muestra de plasma rica en albúmina.

A baja rapidez de deformación, los eritrocitos están prácticamente estáticos y conforme la rapidez de deformación aumenta, éstos se orientan en dirección al flujo y poco a poco se van desagregando.

1.2.2 Colesterol HDL y LDL

El colesterol HDL (*High density lipoprotein*) es una lipoproteína que se encarga de transportar el colesterol desde los tejidos y llevarlo hacia el hígado para su posterior excreción, es llamado colesterol bueno. La relación entre los eventos cardiovasculares y las concentraciones elevadas de colesterol, asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), están claramente establecida gracias a numerosos ensayos clínicos. Además, la reducción del LDL con estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, esta enzima cataliza la conversión de hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A a mevalonato y por ende regula la síntesis de colesterol) se ha mostrado como una terapia muy eficaz en la prevención tanto primaria como secundaria. También, el incremento de los valores de colesterol-HDL trae

consigo un beneficio adicional a la reducción del Colesterol-LDL con tratamientos con estatinas. [8]

Por otro lado, el colesterol LDL (*low density lipoproteins*) es la forma como generalmente se transporta el colesterol en el sistema cardiovascular, en situaciones donde la célula requiere colesterol para su membrana, se expresan proteínas receptoras de colesterol LDL las cuales atrapan esta molécula (colesterol LDL) y mediante un mecanismo hidrolítico lo liberan en dicha membrana, debido a esto, esta molécula se asocia con la formación de la placa aterosclerótica y eventualmente, si crece en exceso o se rompe, puede producir infarto al miocárdico. Se muestran los valores reales comunes de colesterol total, HDL y LDL en la Tabla 1.4.

Colesterol total (mg/dL)	LDL colesterol (mg/dL)
	<100 Óptimo
<200 Deseable	100–129 Deseable
200–239 Límite alto	130–159 Límite alto
>=240 Alto	160–189 Alto
	>=190 Muy alto

Tabla 1.4.-Valores de colesterol total.

1.2.3 Triglicéridos.

Estas moléculas son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol (1,2,3-Propanotriol), donde cada grupo hidroxilo se encuentra esterificado con un ácido graso saturado o insaturado. Biológicamente los triglicéridos tienen la función de reserva energética, aislantes térmicos y dan protección mecánica, son los constituyentes de los tejidos adiposos que están situados en la planta del pie, en la palma de la mano y rodeando el riñón a manera de protección.

La obesidad ha sido asociada a perturbaciones en el comportamiento reológico de la sangre, tal como la elevación de la viscosidad sanguínea y viscosidad plasmática. Por otro lado, en enfermedades cardiovasculares el aumento de colesterol y glucosa también juegan un papel

muy importante en las perturbaciones del comportamiento reológico de la sangre. [18]

Mediante técnicas reométricas, se ha encontrado que la formación de estructuras transitorias se hace evidente cuando la rapidez de deformación es 1 s^{-1} en flujo cortante simple, en estado estacionario. En consecuencia la elevada concentración de triglicéridos y colesterol en la sangre, desencadena una formación elevada de estructuras transitorias y una disminución en el flujo de ésta a baja rapidez de deformación. En esta zona los eritrocitos están prácticamente sin moverse, aquí es donde los mecanismos electroestáticos dominan sobre cualquier otra fuerza que provoque que los eritrocitos se estructuren momentáneamente. La presencia de una mayor cantidad de triglicéridos y sobre todo los que tienen esterificados ácidos grados saturados, hace más rígida la membrana celular y por ende, los eritrocitos requieren una mayor fuerza para ser deformados y las estructuras transitorias para ser desagregadas. [19]

1.3 Viscoelasticidad de la sangre

Este concepto es el más abordado en el campo de la reología ya que describe el comportamiento de muchos materiales. En general este concepto hace referencia a la superposición de los efectos de disipación de energía (viscosos) y de los efectos de almacenamiento de energía (elásticos).

1.4 Estructuración transitoria formada por células sanguíneas

La agregación transitoria de células sanguíneas es un proceso que se ve inducido por factores como interacciones de moléculas de alto peso absorbidas en la superficie de las células sanguíneas, colesterol y triglicéridos. [20]

A diferencia de la estructuración desde el punto de vista clínico, en las paredes de las arterias se comienza a acumular colesterol, dando lugar

a la formación de la placa aterosclerótica, tal y como la Figura 1.4 lo esquematiza.



Figura 1.4-Representación de la acumulación de la placa aterosclerótica. [15]

La geometría particular y la superficie irregular de la placa modifican los patrones de flujo y posiblemente contribuyen a la probabilidad de rotura de la placa y la trombosis oclusiva.

1.5 Fluidos viscoelásticos

Este concepto hace referencia a un tipo de fluidos donde se presenta la coexistencia de propiedades elásticas y viscosas, particularmente la saliva, la sangre, el semen y en general cualquier fluido biológico se comporta de esta manera.

Los fluidos viscoelásticos se deforman instantáneamente por acción de una fuerza. En el momento inicial el material en cuestión fluye, de modo que la tensión se relaja hasta que el material llega a un estado de equilibrio. Cuando el tiempo tiende a infinito, la tensión se ha relajado totalmente, si se retira la tensión, en cualquier momento antes de la relajación, el material recuperará sus condiciones estructurales iniciales.

1.5.1 Régimen de viscoelasticidad lineal

Este concepto hace referencia a la zona en la cual la deformación aplicada a un material es lo suficientemente pequeña para no modificar el estado de equilibrio; donde las propiedades reológicas son independientes de la magnitud del esfuerzo aplicado.

Como anteriormente se ha definido, los fluidos viscoelásticos son aquellos en los que se presenta la coexistencia de un comportamiento elástico y viscoso; esta propiedad es característica de fluidos compuestos por grandes cadenas o estructuras. La respuesta dinámica de estos materiales se emplea para elucidar los aspectos estructurales de un sistema a una escala macroscópica. [21].

2. Reología

La reología es la ciencia que se encarga de estudiar el flujo y la deformación de la materia y describe la interrelación entre fuerza, tiempo y deformación. La ciencia de la reología engloba tanto la rama de la mecánica de los sólidos como la de los fluidos.

Las aplicaciones de la reología son diversas, entre las cuales están:

- Predecir el comportamiento macroscópico del fluido bajo condiciones de proceso, para lo cual se hace uso de las relaciones constitutivas y de las funciones materiales.
- Estudiar de manera indirecta la microestructura del fluido y evaluar el efecto de factores externos sobre dicha microestructura. Para esto se comparan las funciones materiales o propiedades reológicas.
- Formulación para el desarrollo de productos.
- Control de calidad de los alimentos.
- Estudio de la textura y consistencia de productos alimenticios: dichas propiedades son muy importantes para que un producto sea del agrado del consumidor.
- Producción de pegamentos: el estudio de su plasticidad, de la forma de fluir dentro del recipiente que lo contiene, etc.
- Producción de pinturas: una pintura debe ser esparcida de forma fácil, pero sin que escurra.
- Producción de productos cosméticos y de higiene corporal: la duración de una laca sobre el pelo, la distribución de la pasta de dientes por toda

la boca, la forma de cómo se esparce una crema, etc. Todas estas características se estudian con la reología para obtener la mayor eficacia del producto.

- Producción de medicamentos: se estudia su estabilidad química, su tiempo de caducidad y su facilidad de extrusión, entre otras.
- Caracterización de elastómeros y de polímeros tipo PVC.
- Estabilidad de emulsiones y suspensiones.
- Caracterización de gasolinas y otros tipos de hidrocarburos.
- Caracterización de metales (en situaciones de elevada temperatura), y de cristales líquidos.
- Control de sustancias que sean transportadas a lo largo de un recipiente cilíndrico (para evitar la reopexia).
- Estudio del magma en vulcanología: cuanto más fluido sea el magma más tendencia va a tener el volcán a que provoque una erupción.
- Caracterización de los líquidos y tejidos fisiológicos, y los efectos de las enfermedades y fármacos sobre ellos. Algunos ejemplos de la aplicación de la reología a sistemas biológicos son las propiedades de flujo de la sangre y del moco. [22]

2.1 Fuerza

Una fuerza se define en términos de su capacidad de producir una aceleración, pero también es un agente capaz de reformar un cuerpo. Sin embargo, únicamente la fuerza no constituye un criterio reológico útil, por lo que se considera la relación fuerza entre área (F/A), cociente al cual se le denomina “esfuerzo”, la unidad de fuerza es el Newton (N) y la del área metro cuadrado, quedando así una relación de N/m^2 .

2.2 Viscosidad

La viscosidad se puede definir como la oposición de un fluido para ofrecer resistencia al esfuerzo, es decir, resistencia a deformarse. Hay que hacer notar que la viscosidad sólo existe cuando el fluido está en movimiento.

También, la viscosidad expresa una medida de la resistencia a la deformación de un fluido. En el Sistema Internacional de Unidades, la viscosidad se expresa en N·s/m², o en Pa·s (Pascal-segundo), siendo 1 Pa= 1N/m². Todos los fluidos conocidos presentan algún nivel de viscosidad, por lo que el fluido hipotético con viscosidad nula es conocido como un fluido inviscido.

La viscosidad se rige por el rozamiento existente entre las capas adyacentes en un líquido. Cuando un fluido tiene una viscosidad muy alta, el rozamiento entre las capas es mayor, logrando así que el movimiento sea lento.

A continuación se mencionan algunos valores de viscosidad de diferentes materiales. (Ver Tabla 2.1)

Material	Viscosidad Típica (mPa·s)
Vidrio	10 ⁴³
Vidrio fundido	10 ¹⁵
Asfalto	10 ¹¹
Polímeros fundidos	10 ⁶
Miel	10 ⁵
Caramelo	10 ⁴
Glicerol	10 ³
Aceite de oliva	10 ⁻²
Agua	10 ⁰
Sangre	10 ⁻³
Aire	10 ⁻²

Tabla 2.1- Valores de viscosidad aproximada a T y P ambiente.

Existen tres tipos de viscosidad: la viscosidad dinámica, la viscosidad cinemática y la viscosidad aparente.

2.2.1 Viscosidad dinámica o absoluta

Si se representa la curva de fluidez (esfuerzo cortante vs velocidad de deformación), la viscosidad dinámica o absoluta, denominada “ μ ” se define como la pendiente en cada punto de dicha curva. (Ver Figura 2.1)

2.2.2 Viscosidad aparente

La viscosidad aparente “ η ” se define como el cociente entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Este término es el que se utiliza al hablar de “viscosidad” para fluidos no newtonianos (Figura 2.1).

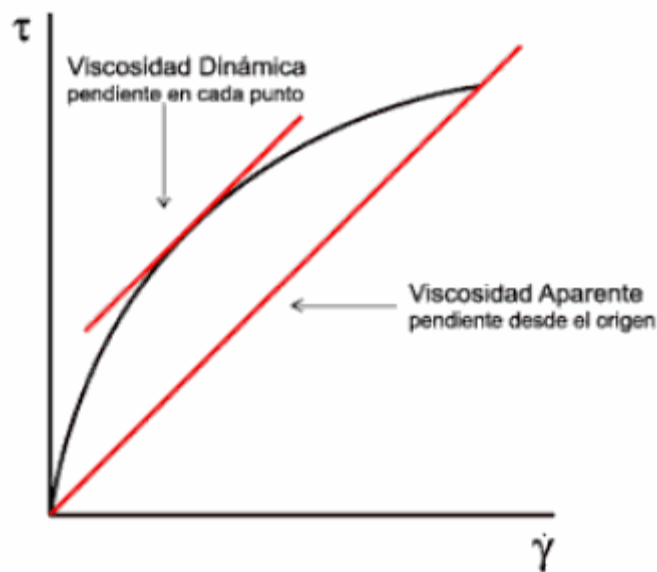


Figura 2.1- Curva de fluidez para representar la viscosidad dinámica y aparente.

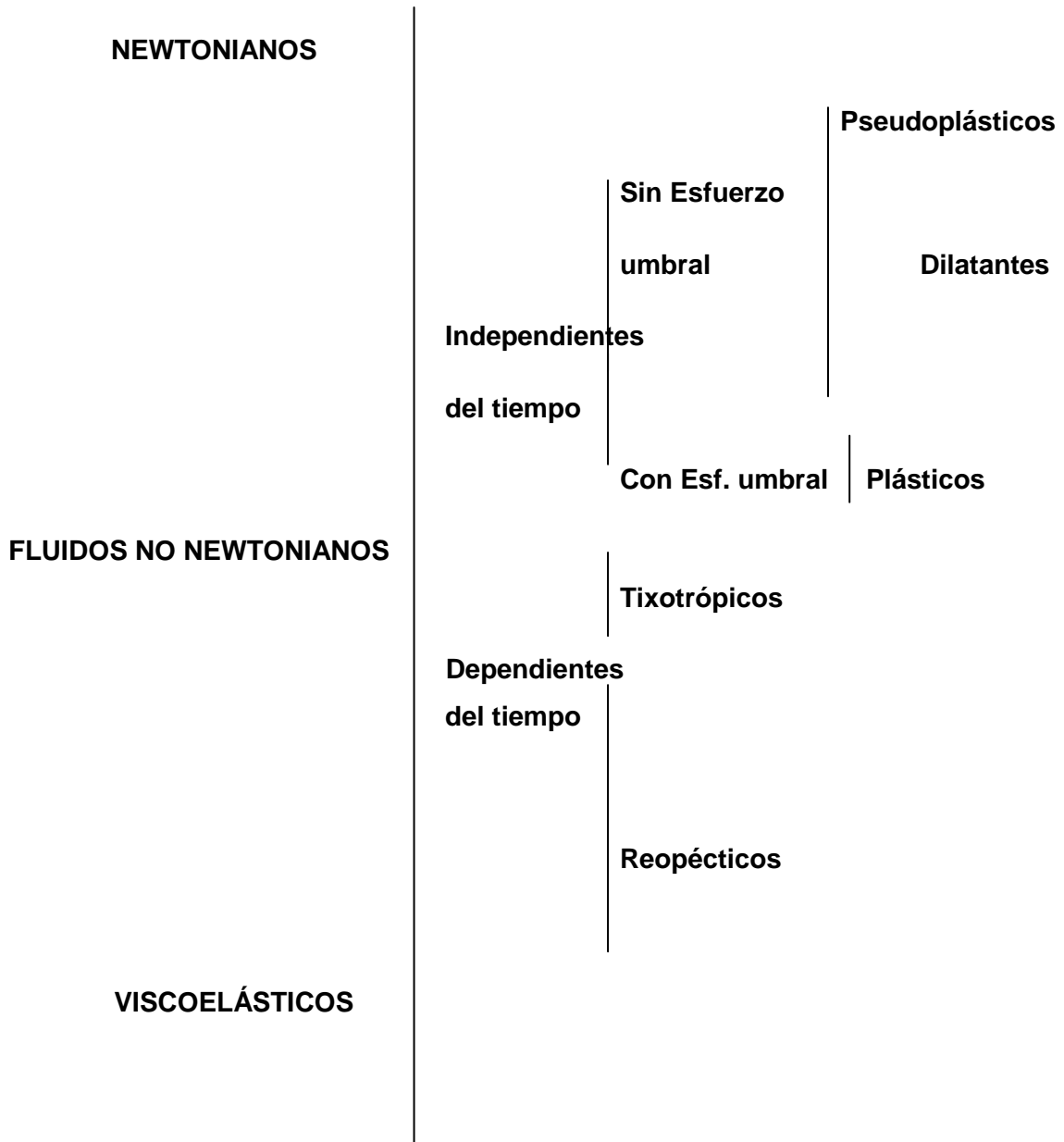
2.2.3.- Por último, existe otro término de viscosidad “ ν ” denominada viscosidad cinemática, que es el cociente de la viscosidad dinámica entre la densidad del fluido utilizada. Las unidades más utilizadas de esta viscosidad son los centistokes

2.3 Tipos de fluidos

Un fluido es un material incapaz de soportar la acción de un esfuerzo de corte, es decir por pequeño que sea el esfuerzo aplicado, el fluido

experimentará una deformación continua en el tiempo. Cabe mencionar que cuando se deje de aplicar el esfuerzo, el fluido no recupera su forma original.

[22] El comportamiento de los fluidos se clasifica principalmente en:



2.3.1 Fluidos newtonianos.

Los newtonianos son aquellos fluidos que se rigen mediante la ley de viscosidad de Newton, es decir, la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación es lineal.

Un fluido Newtoniano, también llamado fluido verdadero es aquel que, sometido a un esfuerzo tangencial o cortante, se deforma con una velocidad que es directamente proporcional al esfuerzo aplicado.

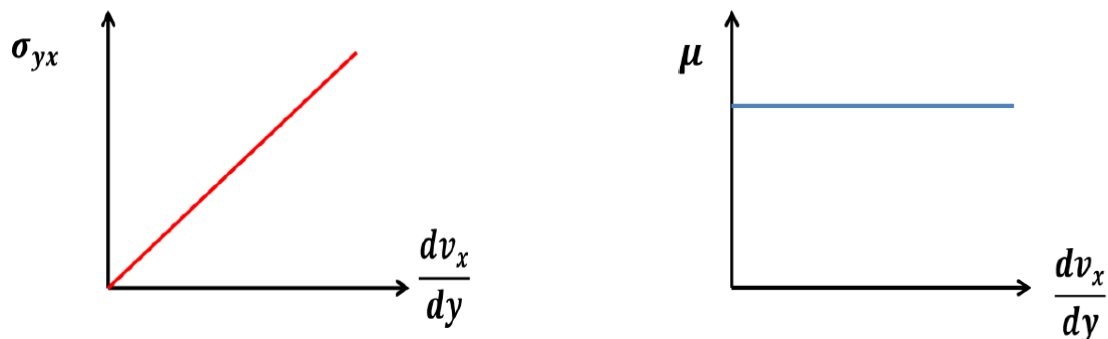


Figura 2.2. Fluidos Newtonianos

Algunos ejemplos de fluidos newtonianos son el agua, la gasolina y el aire.

2.3.2 Fluidos no newtonianos

Los fluidos en los cuales el esfuerzo de corte no es directamente proporcional a la relación de deformación (rapidez de deformación) se definen como fluidos no-newtonianos. Por lo general, éstos fluidos se clasifican de acuerdo a su comportamiento con el tiempo:

- Fluidos independientes del tiempo de aplicación.
- Fluidos dependientes del tiempo de aplicación.

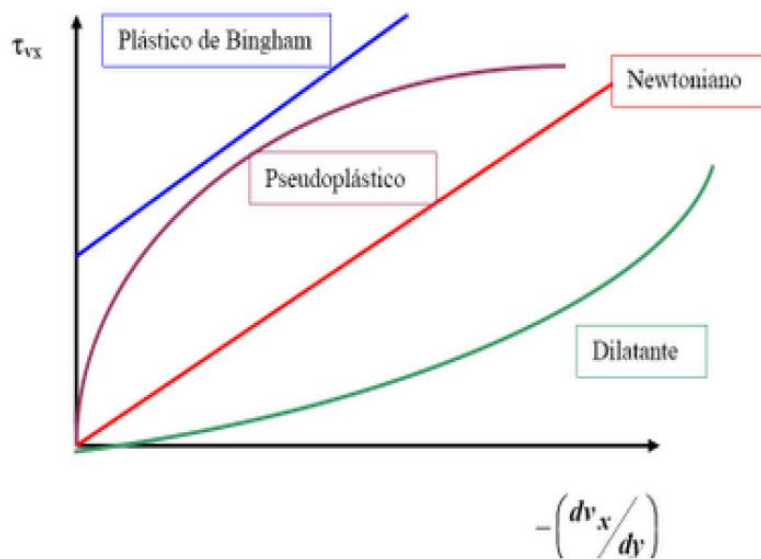


Figura 2.3- Esfuerzo cortante en función de la rapidez de deformación para diversos tipos de fluidos.

2.3.3 Fluidos Viscoelásticos

Los fluidos viscoelásticos, como su nombre lo dice, se caracterizan por presentar propiedades viscosas y elásticas. Esto se puede deber a la existencia de moléculas muy grandes y flexibles o a la presencia de partículas

2.4 Ley de Newton de la Viscosidad

Consideremos un fluido (líquido o gas) contenido entre dos grandes láminas planas y paralelas, de área A , separadas entre sí por una distancia muy pequeña Y (Figura 2.4). Supongamos que el sistema está inicialmente en reposo, pero que al cabo del tiempo $t=0$, la lámina inferior se pone en movimiento en la dirección del eje x , con una velocidad constante V . A medida que transcurre el tiempo el fluido gana cantidad de movimiento, y, finalmente se establece el perfil de velocidad en régimen estacionario. Una vez alcanzado dicho estado estacionario de movimiento, es preciso aplicar una fuerza constante F para conservar el movimiento de la lámina inferior. Esta fuerza viene dada por la siguiente expresión (suponiendo que el flujo es laminar):

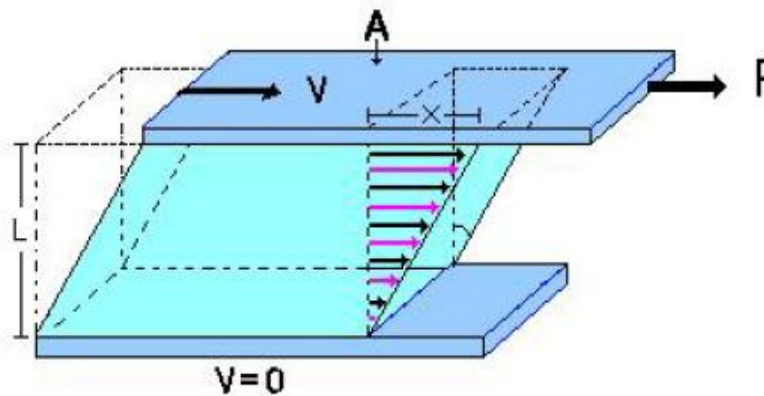


Figura 2.4 Experimento hipotético basado en las afirmaciones de Newton.

Es decir, que la fuerza por unidad de área es proporcional a la disminución de la velocidad con la distancia “L”. La constante de proporcionalidad se denomina *viscosidad* del fluido. La fuerza ejercida sobre el área de la placa de fluido es el *Esfuerzo Cortante*. El esfuerzo cortante que se ejerce en la dirección x sobre la superficie de un fluido, situada a una distancia constante y , se designa τ , y el componente x del vector de velocidad del fluido, por v_x . De acuerdo con estos símbolos, la ecuación queda de la siguiente forma:

—

Es decir, que la fuerza por unidad de área es proporcional al gradiente de la velocidad local. Ésta es la *Ley de Newton de la viscosidad*. La rapidez de deformación es una magnitud que mide el cambio de deformación respecto al tiempo. Para problemas uniaxiales es simplemente la derivada temporal de la deformación longitudinal. [4]

2.5 Pruebas de flujo oscilatorio

En este ensayo una pequeña deformación es aplicada a la muestra a través de un esfuerzo oscilatorio de baja amplitud.

Cuando una muestra es sometida a una pequeña deformación, el esfuerzo generado será sinusoidal y tendrá la misma frecuencia que la deformación. Sin embargo, en muchas ocasiones, el esfuerzo no está en fase con la deformación sino desplazado un cierto ángulo de fase . Las ecuaciones que describen las funciones son:

Las funciones del material para el flujo oscilatorio se pueden descomponer en componentes sinusoidales, uno en fase con la deformación ($\sin wt$) y otro fuera de fase en un ángulo de 90° (wt).

Cabe mencionar que la frecuencia es la magnitud que mide el número de repeticiones por unidad de tiempo de cualquier fenómeno.

En la viscoelasticidad lineal las funciones materiales son los módulos de almacenamiento, G' o elástico y de pérdida, G'' o viscoso e indican la cantidad de energía que se almacena en el material en cada ciclo de deformación, y el último es un indicativo de la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de deformación.

De esta manera, para un sólido perfectamente elástico, donde toda la energía se almacena y se recupera en cada ciclo, G'' tendrá un valor de cero y

el esfuerzo y la deformación estarán en fase ($d=0$); contrariamente, para un líquido perfectamente viscoso, donde toda la energía se disipa en forma de calor, G' tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán desfasados 90° . Por lo tanto, para un material viscoelástico donde tanto la componente elástica como la viscosa están presentes, el ángulo de desfasamiento (d) tendrá un valor intermedio entre 0° y 90°

2.5.1 Oscilaciones sinusoidales [25]

Este tipo de ensayos, consisten en la aplicación de un esfuerzo o deformación sinusoidal de pequeña amplitud. La respuesta sinusoidal obtenida, deformación o esfuerzo, es resuelta o separada en sus componentes elástico y viscoso. Si por ejemplo, se aplica una deformación sinusoidal, el esfuerzo oscilará sinusoidalmente a la misma frecuencia, pero en general estará desplazado en un ángulo de fase con respecto a la onda de tensión.

Esto es ilustrado y expresado matemáticamente de la siguiente forma:

Donde γ_0 y τ_0 son las amplitudes de la onda de deformación y de esfuerzo, respectivamente, y w es la frecuencia angular.

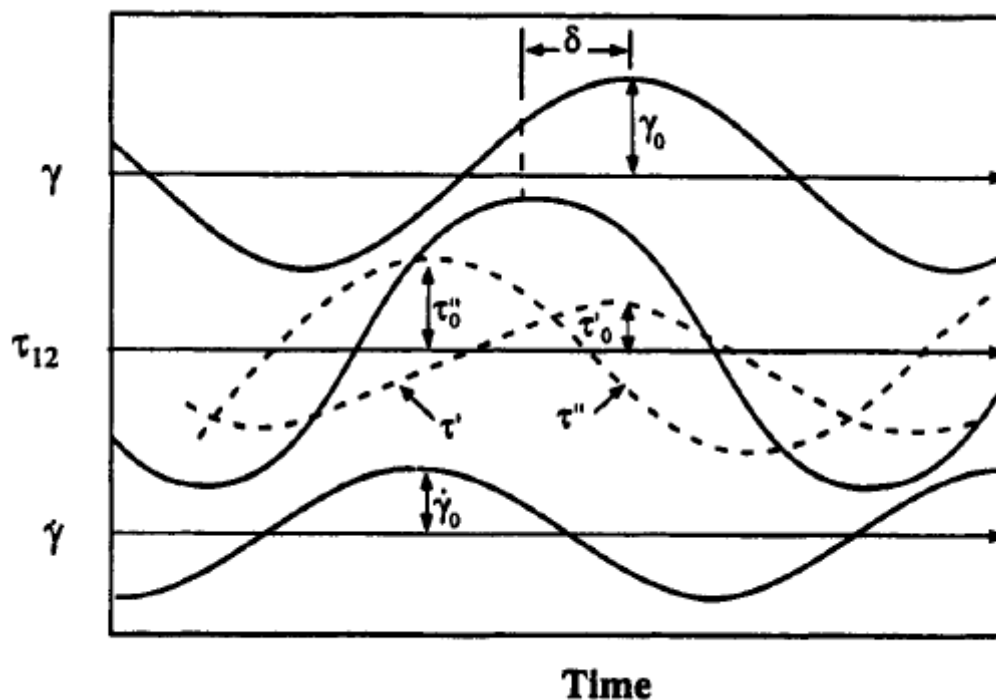


Figura 2.5. Deformación sinusoidal oscilante que produce una fase de esfuerzo sinusoidal desplazada por una cantidad δ . Para el análisis de la onda del esfuerzo, la onda se descompone en otras dos, σ_1 en fase con ϵ y σ_2 90 fuera de fase. Note que σ_1 está en fase con la onda de rapidez de deformación $\dot{\epsilon}$.

La onda de esfuerzo puede descomponerse en otras dos, tal y como se describe en la figura: una en fase con la onda de deformación ϵ y otra 90 fuera de fase con dicha onda ϵ . De esta manera:

Por propiedades trigonométricas, la ecuación anterior arroja lo siguiente:

$$\sigma = \sigma_1 \cos(\omega t) + \sigma_2 \sin(\omega t)$$

Esta descomposición sugiere dos módulos dinámicos:

$$\sigma_1 = E' \dot{\epsilon} \quad \sigma_2 = E'' \dot{\epsilon}$$

El primero es el modulo en fase o elástico, el segundo es el modulo fuera de fase o viscoso. La ecuación 1.4 puede también escribirse como:

$$\sigma = E' \dot{\epsilon} \cos(\omega t) + E'' \dot{\epsilon} \sin(\omega t)$$

La ecuación 1.3 puede escribirse también de esta manera:

Físicamente, E'' es una medida de la energía disipada por ciclo de deformación por unidad de volumen. El E' es una medida de la energía elástica.

Para predecir el comportamiento de un material, se utilizara la figura 2.6. Para un sólido elástico ideal, el esfuerzo cortante está en fase con la deformación aplicada ϵ , y para un fluido newtoniano (líquido viscoso ideal) el esfuerzo

cortante está 90° fuera de fase con la deformación aplicada .
 Para un fluido visco-elástico el esfuerzo cortante se desplaza respecto a la señal de deformación un ángulo de diferencia de valor entre 0° y 90°. En la figura 2.6 pueden diferenciarse los tres tipos de comportamientos en función de las respuestas obtenidas.

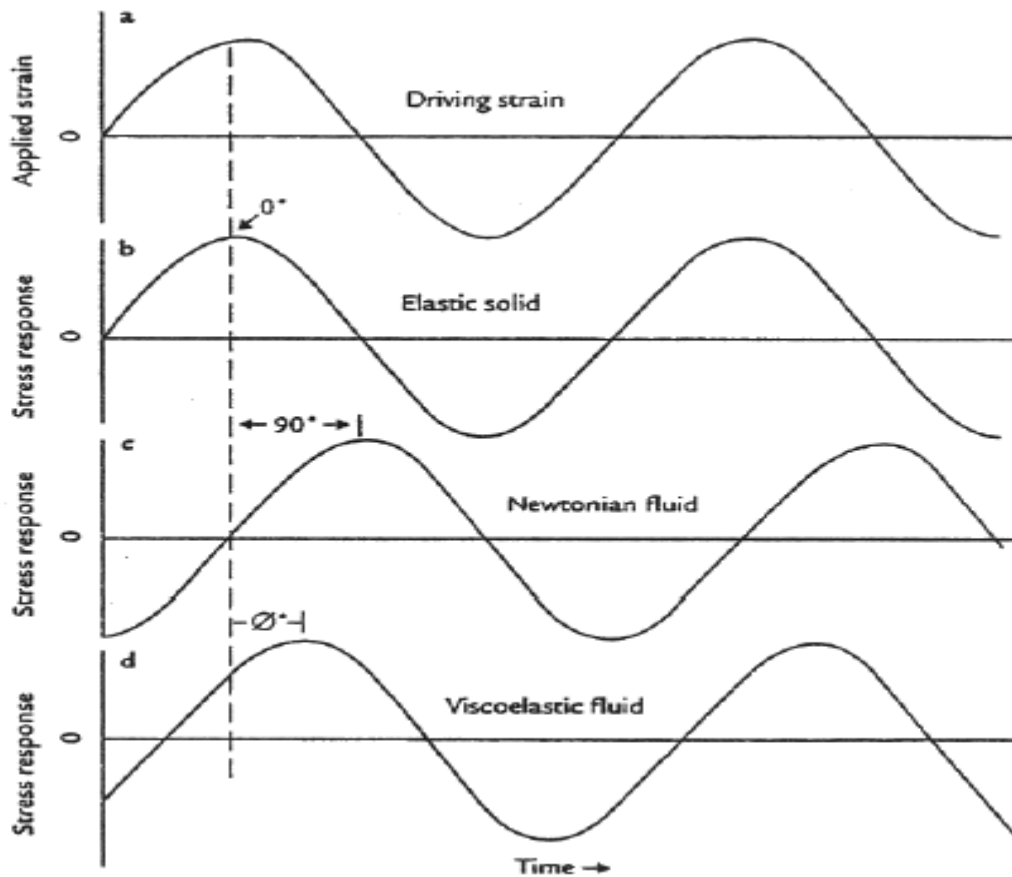


Figura 2.6. Esquema de medidas oscilatorias fundamentales. (a) deformación aplicada contra tiempo y esfuerzo resultante contra tiempo que es medido en (b) un sólido elástico, (c) líquido newtoniano y (d) fluido visco-elástico

3. Ultrasonido

El ultrasonido se define como una serie de ondas de presión, generalmente longitudinales, originadas por la vibración de un cuerpo elástico (cristal piezoeléctrico) y propagadas por un medio material cuya frecuencia supera la del sonido audible por el humano. Recordemos que el humano tiene un rango normal de audición que está aproximadamente entre 20 Hz a 20.000 Hz, es decir el ultrasonido tiene una frecuencia superior a 20.000 Hz (20 kHz).

Cuando se habla de ultrasonido, la frecuencia de una onda consiste en el número de ciclos o cambios de presión que ocurren en un segundo. Se mide en ciclos por segundo, o lo que es lo mismo, en Hertz (1 Hz= 1/s). Lo que determina la frecuencia del ultrasonido son principalmente dos cosas: la fuente emisora y el medio a través del cual está viajando.

Como ya se mencionó anteriormente, el ultrasonido es un sonido cuya frecuencia se ubica por arriba de 20 kHz. Las frecuencias que se utilizan en medicina para fines de diagnóstico clínico están comprendidas más frecuentemente en el rango de 2-28 MHz, sin embargo, cuando existen fines experimentales se manejan frecuencias superiores a 50 MHz.

La técnica que se emplea para producir ondas ultrasónicas para uso clínico consta en hacer contactos eléctricos a las caras opuestas de un cristal, por ejemplo cuarzo o titanato de estroncio. Si se aplica un voltaje alterno de alta frecuencia a estos contactos, el cristal vibra con la misma frecuencia que el voltaje aplicado y emite un haz de ondas ultrasónicas. Este método de transformar energía eléctrica en energía mecánica, llamado efecto piezoeléctrico, también es reversible. Si alguna fuente externa hace vibrar el cristal, se produce un voltaje alterno entre las terminales del cristal. Por lo tanto, un solo cristal genera y recibe ondas ultrasónicas.

Puesto que el ultrasonido puede viajar kilómetros en el agua, se usa en el sonar, la contraparte ultrasónica del radar, que emplea ondas de radio para la detección y el alcance de objetos. Los pulsos de sonido generados por aparatos de sonar son reflejados por objetos submarinos y los ecos resultantes son recogidos por un detector. El sonar también es usado

ampliamente por los pescadores para detectar los bancos de peces y de manera similar, se usa en las cámaras de autoenfoco. En medicina, el ultrasonido se usa para limpiar dientes, para examinar tejidos y órganos internos que son casi invisibles a los rayos X, realizar ecografías, evaluar la circulación de la sangre a través de los vasos sanguíneos, incluyendo las arterias y venas más importantes del organismo que se encuentran en el abdomen, brazos, piernas y cuello. Además, se usa para fines estéticos, ya que se cree eliminan afecciones como celulitis o varices. La aplicación mejor conocida es su uso para observar un feto sin exponerlo a rayos X. En aplicaciones industriales y caseras, se usan los baños ultrasónicos para limpiar partes metálicas de máquinas y joyas.

Las frecuencias ultrasónicas se extienden hasta el intervalo de los megahertz (MHz), pero el espectro de frecuencias de sonidos no continúa indefinidamente. Existe un límite superior de aproximadamente 10^9 Hz o 1GHz (gigahertz), que es determinado por el límite superior de la elasticidad de los materiales a través de los cuales se propaga el sonido. [24]

II DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y equipo

Para el estudio reológico de muestras de sangre se empleó lo siguiente:

- Reómetro de esfuerzos controlados AR1000 (TA Instruments®) con una geometría de cilindros controlados de 41 mm, usando una separación del plato estacionario, es decir un “gap” de 200 mm.
- Sangre con anticoagulante (EDTA) extraída por punción venosa con sistema Vacutainer®.
- Software de análisis de datos “Data Analysis”.
- Microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200
- Reactivo: Eosina amarillenta, Fórmula: $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, MW.= 691,86

4.2 Métodos

4.2.1. Obtención de la muestra de sangre

La sangre fue obtenida por punción venosa mediante el sistema Vacutainer en tubos con EDTA, creando turgencia al obstruir parcialmente el paso del fluido sanguíneo mediante un torniquete aplicado a la altura del músculo del bíceps del paciente. La toma de muestra fue en el laboratorio T-102 del Instituto de Investigaciones en Materiales donde se le realizó la caracterización reológica, mientras que las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

5.2.1 Caracterización reológica

La muestra de sangre se agita dentro del mismo tubo para homogeneizarla y se coloca en el plato interior del reómetro limpio y seco. Posteriormente la geometría ubicada en la parte superior del reómetro se hace descender, hasta una distancia de 200 μm .

Se realiza un barrido de deformación a diferentes frecuencias de oscilación, para determinar la zona de viscoelasticidad lineal. Una vez determinada dicha zona, se procede a realizar un barrido de frecuencia de 0.1 hasta 100 rad/s, siguiendo la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de la muestra.

Para las pruebas que implican trabajar con ultrasonido, lo primero que se hizo fue un barrido de frecuencias de ultrasonido para saber con certeza en qué frecuencias se mostraban los cambios más significativos. Se permitió que la muestra tuviera un periodo de estabilización el cual se encuentra entre 5-10 min, inmediatamente después se encendió el ultrasonido a una frecuencia de 20 kHz por 5 min. A continuación se dejó la muestra sin ultrasonido 5 min, al finalizar dicho intervalo de tiempo se encendió de nuevo el ultrasonido en 25 kHz. Dicho procedimiento se repitió por períodos de 5 min, con incrementos de 5 kHz cada vez que se encendió el equipo de ultrasonido.

Todos los datos obtenidos de los ensayos de las muestras de sangre, son almacenados para su posterior análisis en el software Data Analysis[®].

4.3 Equipo

Uso del reómetro de esfuerzos controlados AR-1000-N TA INSTRUMENTS

[®]

El equipo que se empleo fue un reómetro de esfuerzos controlados de la compañía TA Instruments modelo AR 1000N, con la adaptación de un dispositivo de ultrasonido (patente en trámite), empleando una configuración de tres transductores de 50 Watts cada uno, a una separación de 90° uno del otro. Este método permite obtener datos del efecto de ultrasonido en el fluido en tiempo real. El ultrasonido se obtiene a partir de un de Generador de

Ultrasonido con una potencia de 600 W, marca “El Águila” serie 044-G. Es de suma importancia mencionar que debido a las limitaciones del equipo, ya que se está utilizando un equipo innovador, el experimento debió llevarse a una temperatura de 27°C.



Figura 4.1- Reómetro con adaptación de ultrasonido.

El reómetro consta de un motor de inducción electrónica, controlado con un soporte de aire para todo el sistema de rotación. Las pruebas reológicas para este estudio se hicieron con una geometría de cilindros concéntricos de 41 mm de diámetro. (Figura 4.2)

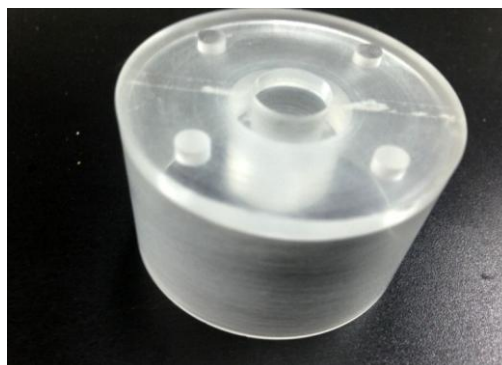


Figura 4.2- Geometría de cilindros concéntricos de 41 mm de diámetro.

Antes de realizar las pruebas reológicas, se necesita determinar la zona de viscoelasticidad lineal, para que las funciones propias de los materiales a analizar sean únicamente función de la estructura y del tiempo y no de la magnitud de esfuerzo o deformación impuesta para el análisis. Por otro lado, las bajas deformaciones impuestas por el reómetro de esfuerzos controlados asegura estar siempre dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, que como se ha dicho, está sujeto a deformaciones infinitesimales muy cercanas al equilibrio, de forma que la respuesta sólo esté ligada a la estructura; por esta razón este flujo se emplea como herramienta para la caracterización de materiales.

Uso de la centrifuga

Para separar el plasma de los eritrocitos se usó una centrifuga en la cual se colocó la sangre por un periodo de 5 min a una velocidad de 4000 RPM.

Uso de microscopio óptico

Primero que nada, se realizó un frotis sanguíneo de las muestras antes y después de la experimentación, se tiñeron con eosina amarillenta para poder lograr un contraste de los glóbulos rojos. Se empleó un microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200 el cual tiene una cámara integrada y el lente utilizado fue de 100X.



Figura 4.3 Microscopio óptico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de flujo oscilatorio

Se trabajó en un régimen tal, que la respuesta reológica de la sangre frente a la perturbación mecánica provocada por el ultrasonido será seguida mediante una prueba oscilatoria

Las muestras usadas para estas pruebas no fueron caracterizadas bioquímicamente debido a que se utilizaron para lograr establecer un protocolo de trabajo. Sin embargo, por estudios anteriores, se sabe que los niveles de colesterol de estas muestras son parcialmente elevados, sin embargo, no llegan a niveles patológicos.

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes a las pruebas realizadas mediante un ensayo oscilatorio de baja amplitud. En ellas se experimentó con sangre completa, es decir, eritrocitos y plasma; eritrocitos suspendidos en solución isotónica, plasma y por último se utilizaron únicamente frecuencias de resonancia.

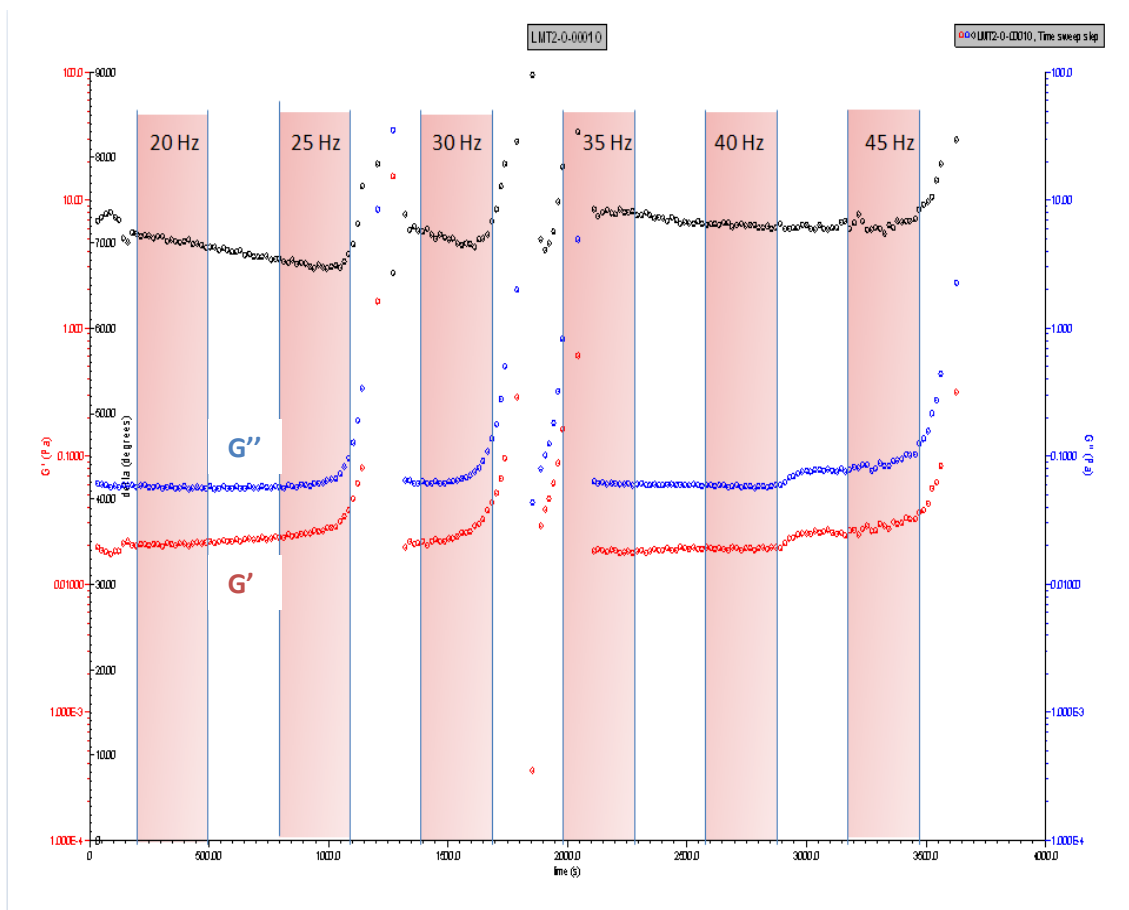


Figura 5.1.- Sangre completa

En la Figura 5.1, se presenta la evolución de los módulos G' y G'' de una muestra de sangre completa, primero que nada, es importante mencionar que el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'), lo que nos indica que a pesar de que la sangre es una solución viscoelástica predomina su componente viscosa. Si se encontraran estos módulos al inverso la sangre tendría un comportamiento diferente, es decir, al dominar la componente elástica la sangre no fluiría adecuadamente por todo el sistema cardiovascular, particularmente en los capilares.

Se observa que los cambios más significativos se dan en el lapso donde se suspende el ultrasonido, esto indica que al iniciar el pulso ultrasónico, las perturbaciones en el fluido no se manifiestan, la energía se almacena y al momento de suspender el pulso ésta se libera, sucede de manera similar el siguiente lapso, un almacenamiento de energía y una liberación o una relajación de estructuras, esto se ve reflejado en que ambos módulos regresan a su magnitud original.

La perturbación aplicada no es lo suficientemente grande para destruir por completo las estructuras transitorias contenidas en la sangre, ya que los módulos se logran estabilizar nuevamente en sus condiciones basales. Esto puede interpretarse como que las modificaciones causadas no provocan cambios considerables en el comportamiento reológico de la sangre.

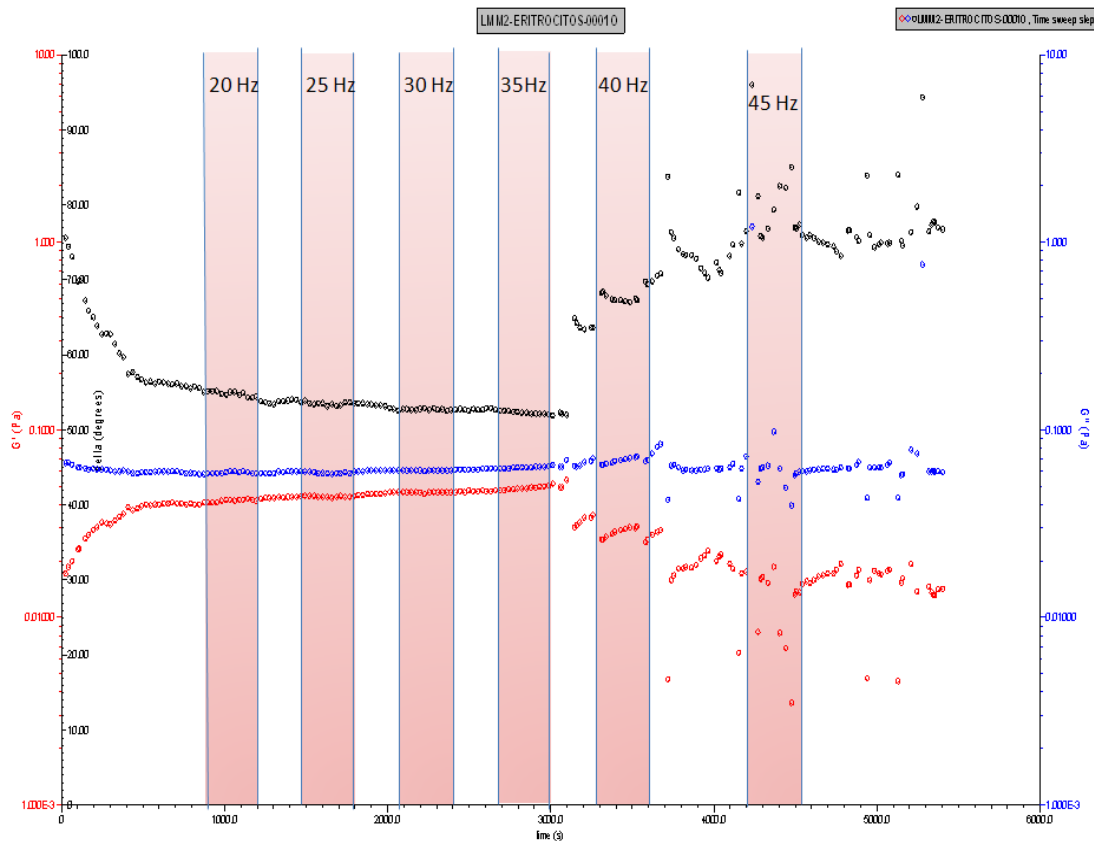


Figura 5.2- Eritrocitos suspendidos en solución isotónica

En la Figura 5.2 se muestra un ensayo similar al anterior, salvo que en este caso solamente se emplean eritrocitos. Estos no responden de manera similar a la perturbación mecánica, como lo hace la sangre completa. Al retirar el pulso ultrasónico de 35 kHz, el módulo elástico de la sangre disminuye y en posteriores exposiciones al ultrasonido no regresa a sus condiciones basales. La posible interpretación de este fenómeno se debe a la ausencia de proteínas y lípidos contenidos en el plasma, estabilizan a la sangre desde el punto de vista mecánico. Al sólo estar presentes los eritrocitos en el análisis el nivel de estructuración es menor y muy probablemente las células sanguíneas sufran daños en su membrana. Al realizar las pruebas de microscopía se observó que la morfología de los eritrocitos no se modifica de manera notoria en una serie

de campos de observación, sin embargo, no se sabe si los eritrocitos observados siguen siendo funcionales.

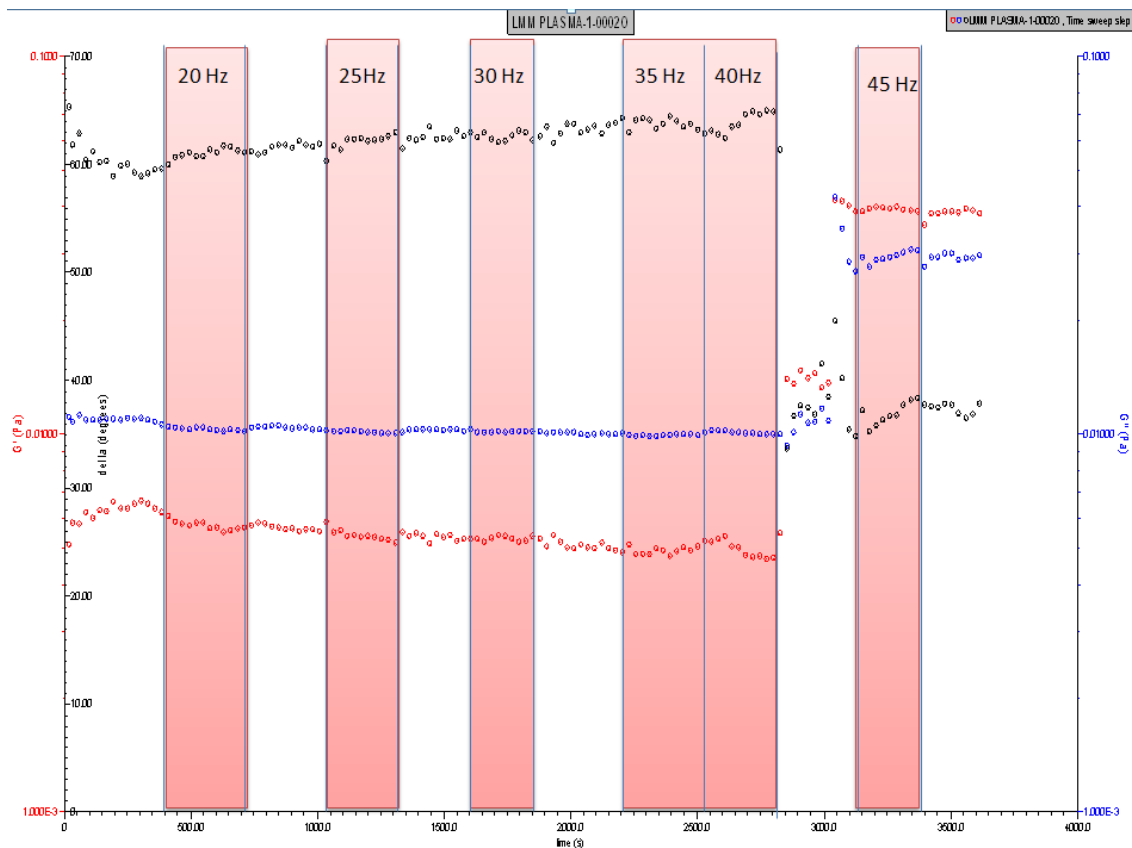


Figura 5.3. Plasma

En la Figura 3, se presentan los resultados del ensayo oscilatorio con plasma, lo que implica trabajar con sales, proteínas y agua ya que son sus principales componentes. Prácticamente a las sales y al agua no se les puede atribuir los cambios observados en la gráfica. Los cambios ocasionados en ambos módulos son considerables. Al contrario de los experimentos anteriores, al final de éste los módulos sí se estabilizaron pero no en las condiciones basales, además de que ambos se invierten, es decir, el módulo elástico ahora es superior al viscoso, (lo que probablemente implica una desnaturalización de las proteínas), ya que al cambiar de conformación y plegamiento logran que el plasma se vuelva más elástico. Se cree que esta desnaturalización también pudo haber sido causada por un cambio de temperatura por fricción por el tipo

de ensayo usado. Aquí, un punto importante es determinar si esta desnaturalización es irreversible o reversible mediante un mismo ensayo más prolongado, dejando la sangre sin el efecto del ultrasonido.

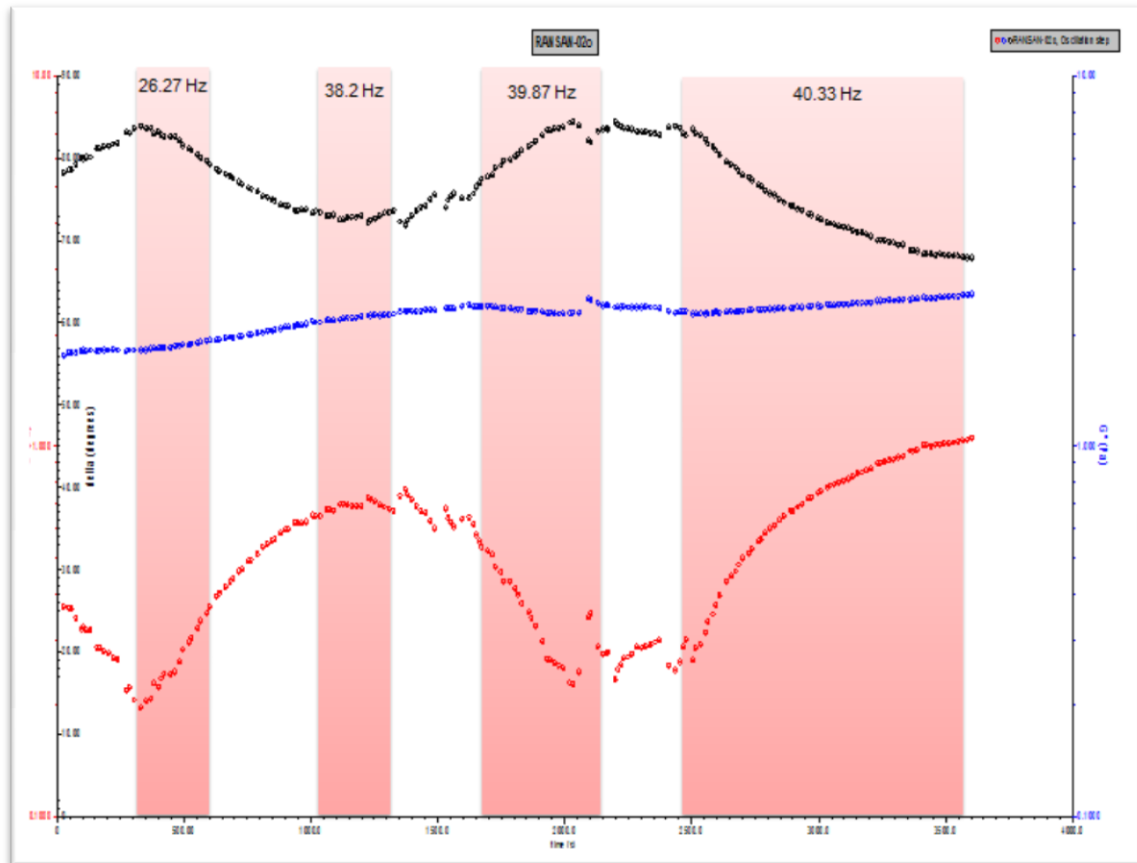


Figura 5.4. Frecuencias de resonancia

En la Figura 5.4, se usaron frecuencias de resonancia (máxima eficiencia de los piezoeléctricos) en una muestra de sangre. La sangre respondió directamente a estas frecuencias, logrando que las estructuras transitorias que se están formando aumenten su tamaño y rigidez, modificando los módulos de tal manera que no se logra una estabilización. Es evidente que el módulo más afectado es el elástico ya que es el que sufre cambios más significativos, con esto se puede decir que la parte de la sangre que se comporta de manera elástica es la que está almacenando en mayor cantidad la energía de la vibración ultrasónica.

Una vez analizando las gráficas se concluyó que la frecuencia en la que se empezaba a observar un efecto significativo, es una frecuencia de

aproximadamente 35 kHz, por la que las siguientes pruebas se realizaron empezando a partir de esta frecuencia.

Es importante mencionar que los módulos elástico y viscoso son exclusivamente entes matemáticos, es decir, sólo sirven para poder modelar el comportamiento reológico de la sangre en este régimen.

PROTOCOLO

1. Realizar punción venosa mediante sistema Vacutainer usando tubos con EDTA (morados). Obtener 2 tubos de sangre.
2. Colocar el aditamento de ultrasonido en el reómetro, conectado correctamente los cables (rojo con rojo, negro con negro).
3. Conectar el osciloscopio al aditamento de ultrasonido para monitorear que las frecuencias sean correctas.
4. Prender el reómetro, junto con el enfriador.
5. Colocar la geometría de cilindros concéntricos.
6. Calibrar el reómetro.
7. Usar un % de deformación de 180, con una frecuencia de 5 rad/seg. Seleccionando la opción de “barrido de tiempo” (time sweep).
8. Agitar la muestra dentro del mismo tubo para homogeneizarla, evitando causar hemólisis.
9. Verter el contenido de un tubo de la muestra dentro del cilindro del reómetro.
10. Comenzar a correr el experimento.
11. Dejar de 5-10 minutos de estabilización.
12. Prender el ultrasonido a 35 kHz, dejarlo 5 minutos.
13. Suspender el ultrasonido durante 5 minutos.
14. Volver a encender el ultrasonido a 40 Hz dejándolo 5 min.
15. Repetir los pasos 13 y 14, por períodos de 5 min, con incrementos de 5 kHz cada vez que se encienda el equipo de ultrasonido.
16. El otro tubo de muestra se utilizará para realizar las pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas

En la siguiente tabla, se presentan los resultados de las muestras de sangre completa consideradas para el siguiente estudio reológico, el cual sigue el mismo protocolo que los experimentos anteriores.

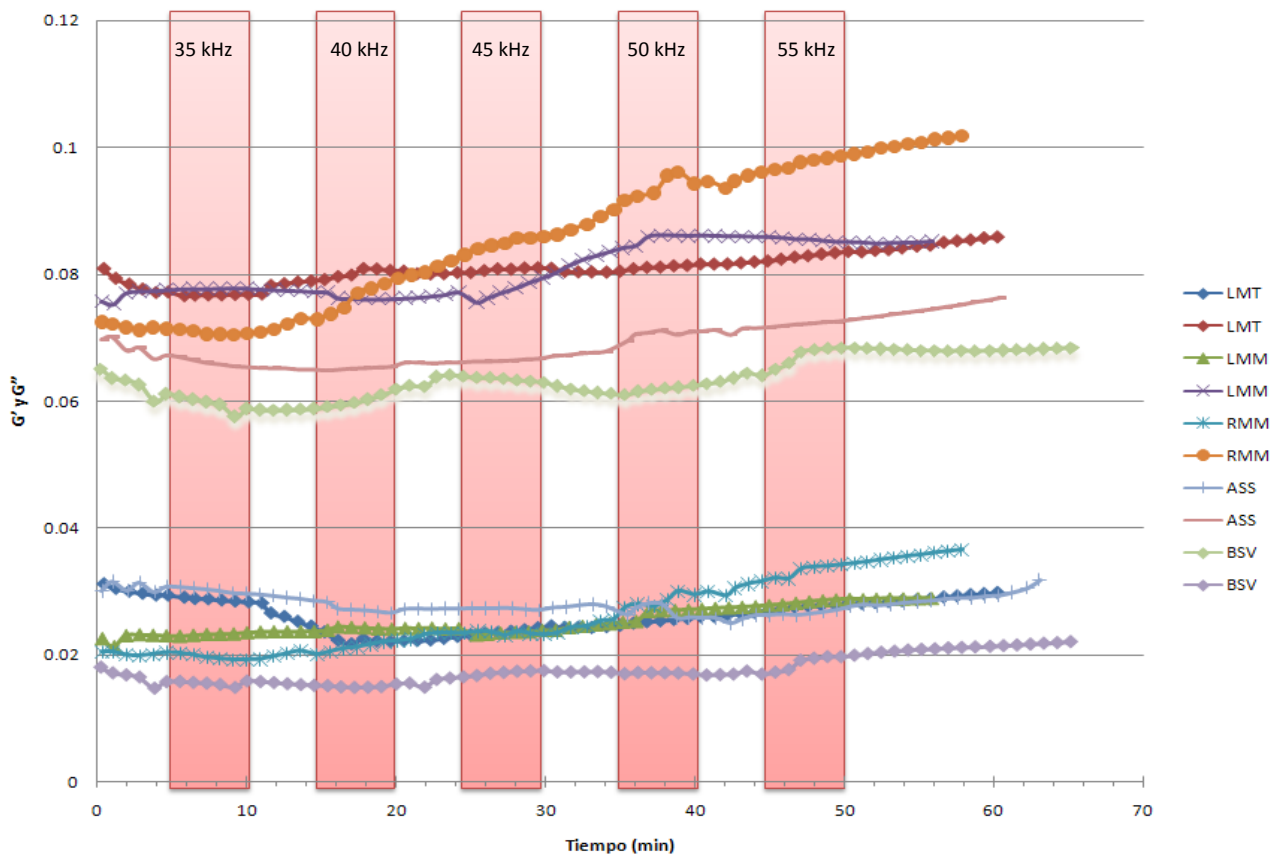
En la Tabla 5.1 se resume la concentración de colesterol total y triglicéridos.

Muestra	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
LMM	230	130
BSV	180	200
ASS	230	250
LMT	259	200
RMM	210	190

Tabla 5.1- Resultados de las pruebas bioquímicas

La Figura 5.5, muestra los módulos G' y G'' de una prueba de flujo oscilatorio para las 5 muestras. Las regiones marcadas por los marcos son pulsos de ultrasonido aplicados a la muestra.

Figura 5.5.- Conducta del módulo elástico y viscoso con respecto al tiempo de las muestras de la Tabla 5.1.



Para facilitar la lectura de la gráfica, se separaron los módulos en diferentes gráficas, Figura 5.6 y 5.7

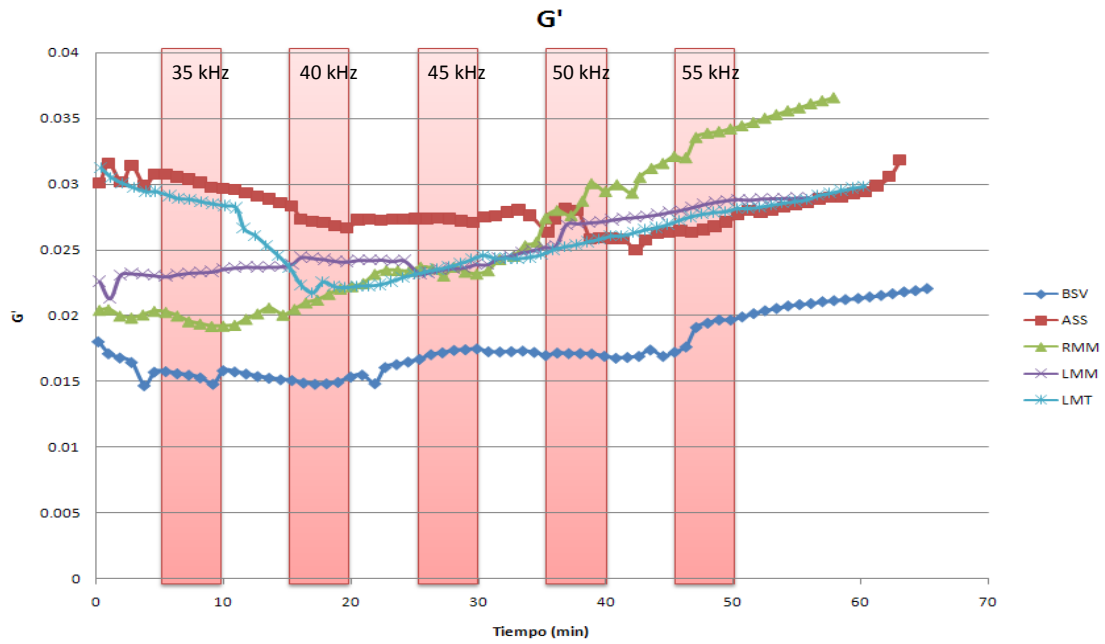


Figura 5.6.-Modulo elástico vs tiempo.

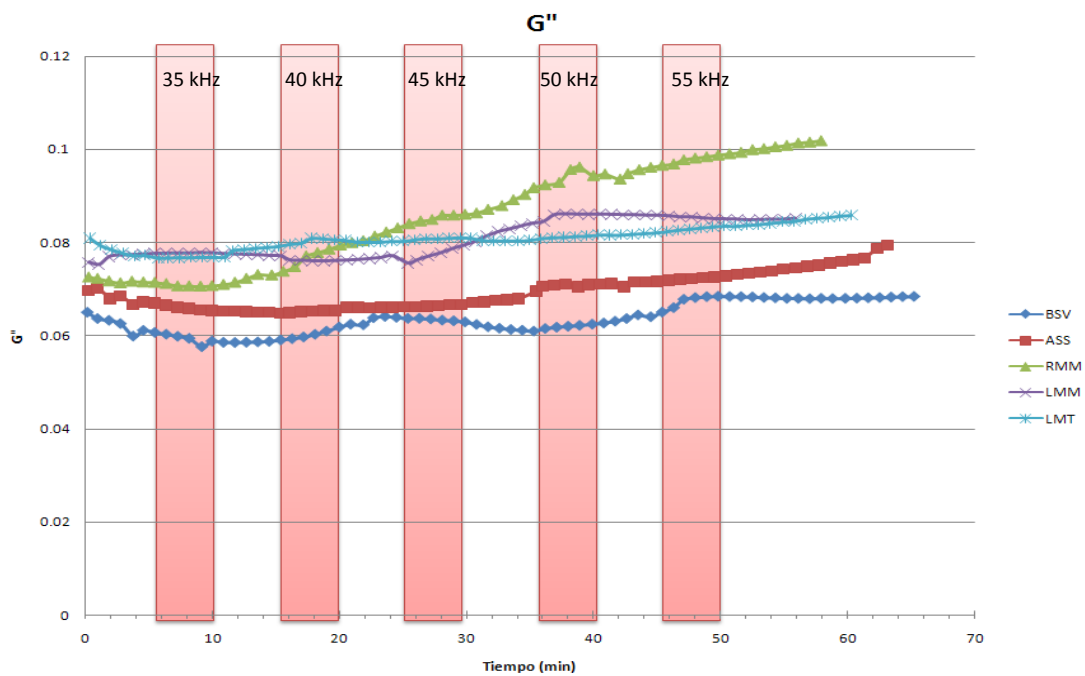


Figura 5.7.- Módulo viscoso vs tiempo.

Se esperaba que la onda mecánica ocasionada por el ultrasonido perturbara la sangre de tal manera que el colesterol aglomerado en la muestra se desagregara, logrando que los módulos tuvieran una tendencia a disminuir, entonces las muestras con mayor contenido de colesterol presentarían este efecto más marcado. Sin embargo, analizando las gráficas, se aprecia que las muestras que presentan mayor contenido de colesterol tienden a tener un comportamiento más estable. Esto puede deberse a que, según lo reportado en la literatura, el colesterol promueve la agregación de células ya que ayuda a la formación de puentes entre membranas logrando la formación de estructuras más difíciles de perturbar. Además, de que a mayor cantidad de colesterol, la sangre tiende a volverse más viscosa y elástica.

Se aprecia un aumento en ambos módulos, lo que implica que en la muestra de sangre se están formando estructuras de mayor tamaño, es decir, que entre más colesterol contenga la muestra, habrá una mayor cantidad de agregación. O bien, que la manera en la que se está aplicando el ultrasonido está logrando que se orienten las estructuras no a la dirección del flujo sino perpendicularmente, teniendo un efecto contrario al esperado.

La superficie de los eritrocitos tiene cargas eléctricas negativas debidas a los carboxilos del ácido siálico (NANA) de la membrana. Si los eritrocitos están en suspensión en un medio que contiene iones libres, los cationes forman una envoltura de cargas positivas alrededor de estos, convirtiéndolos en partículas cargadas de electricidad del mismo signo, haciendo que experimenten una fuerza de repulsión entre ellos. Siendo así, la molécula de colesterol al interponerse entre los eritrocitos logrará disminuir la fuerza de repulsión entre ellos haciendo que las estructuras transitorias adquieran mayor resistencia ante la perturbación mecánica causada por el ultrasonido.

Es importante mencionar que la agregación que se indica durante este trabajo es una agregación transitoria, es decir, que las estructuras que se están formando son de muy corta duración.

La Figura 5.8 muestra una prueba de flujo cortante simple en estado estacionario, en la que se observa la evolución de la viscosidad frente al tiempo. La viscosidad de la sangre es ligeramente mayor que la del agua (10^{-3}

Pa-s) pero a pesar de ello sigue siendo baja, por esta razón el equipo es limitado para detectar la viscosidad de la sangre dado que ésta se encuentra en el límite inferior de sensibilidad, encontrándose que el comportamiento de la viscosidad con respecto al tiempo no es constante.

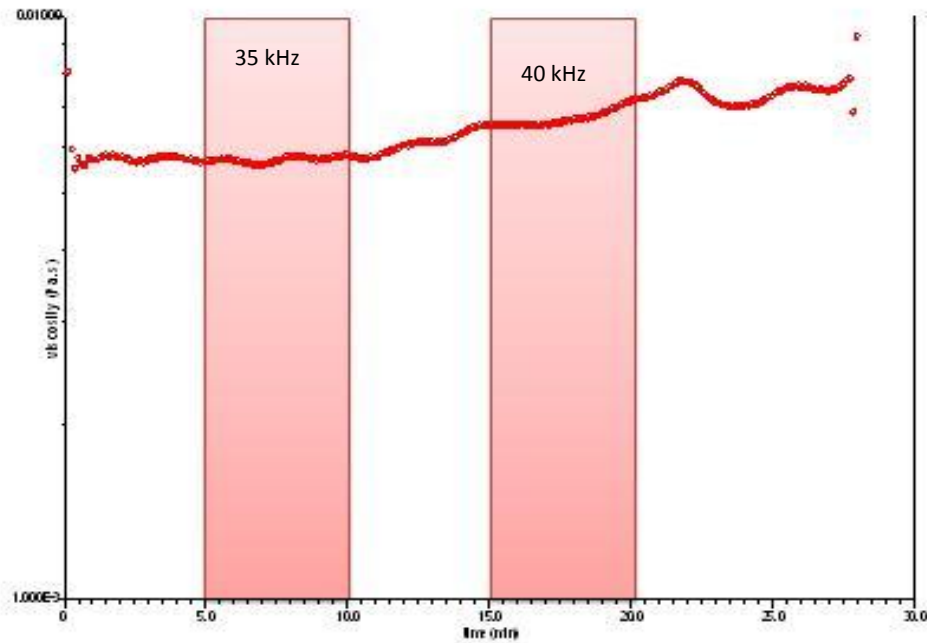


Figura 5.8.- Flujo cortante simple en estado estacionario a una rapidez de deformación de 30 s^{-1} .

Las pruebas de corte simple nos dan información acerca de la estabilidad de la estructuración causada por el ultrasonido durante el tiempo que dura la prueba. En este caso la viscosidad es tan baja que en realidad no origina resultado confiable. Las oscilaciones que se muestran en la Figura pueden ser debidas al equipo, o bien a la orientación que están teniendo las estructuras transitorias.

En las Figuras 5.9 y 5.10 son presentadas las fotografías de las muestras antes y después de la experimentación.

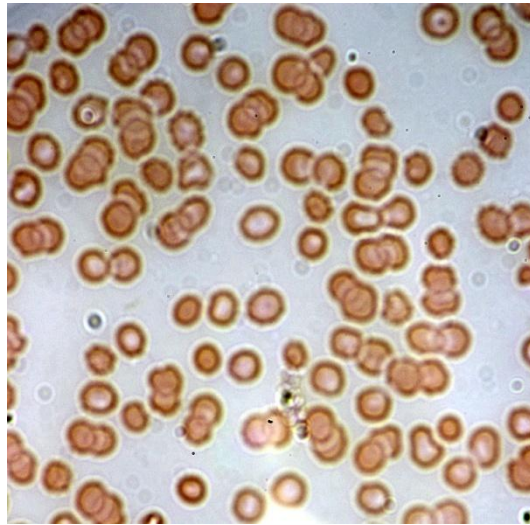


Figura 5.9.- Fotografía de la muestra de sangre antes del procedimiento experimental. Aumento 100X.

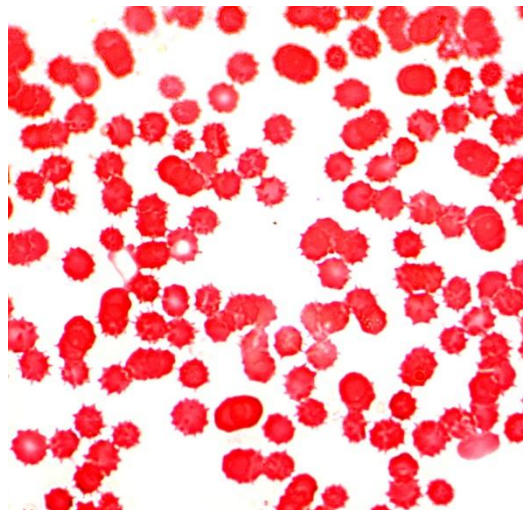


Figura 5.10.- Fotografía de la muestra de sangre después del procedimiento experimental. Aumento 100X.

Antes de la experimentación se pueden observar los eritrocitos como discos circulares homogéneos, de tamaño casi uniforme. Por el contrario, la toma de muestra después de los experimentos muestra eritrocitos con anomalías morfológicas significativas. Los eritrocitos sufren estos cambios

debido a la perturbación causada por el ultrasonido, o bien por el tiempo que la sangre estuvo siendo manipulada. Además, se necesitan futuros estudios para conocer en qué porcentaje se vio afectada la funcionalidad de estos eritrocitos.

Cabe mencionar, que a pesar de que se calculo el hematocrito de estas muestras, no se tomo en cuenta para el análisis de resultados debido a que en trabajos previos se ha demostrado que el hematocrito no tiene relación con los estudios de hemorreología enfocados en colesterol.

IV. CONCLUSIONES

- Se realizó un protocolo de trabajo, estableciendo que la frecuencia donde se empiezan a ver cambios significativos por el uso del ultrasonido es de 35 kHz, donde el tiempo óptimo para hacer la experimentación por periodos de 5 min.
- Se observó que la sangre sufre cambios en ambos módulos (elástico y viscoso) al aplicarle pulsos de ultrasonido. El módulo más afectado es el elástico.
- Las frecuencias de resonancia son las que tienen mayor efecto sobre los valores de G' y G'' .
- Los eritrocitos sufren cambios morfológicos considerables cuando se les somete a pruebas de corte simple con ultrasonido,
- La sangre es un fluido de reología muy compleja, sus propiedades mecánicas cambian tanto por la interacción natural entre las células sanguíneas como por el colesterol presente en la sangre, donde dicho fluido se vuelve más viscoso, disminuye su comportamiento newtoniano, las células se vuelven más deformables y forman estructuras más complejas y difíciles de desagregar. Siendo así que las muestras con mayor cantidad de colesterol son más estables a la perturbación causada por el ultrasonido.

V. PERSPECTIVAS.

El estudio realizado en este trabajo solo es el principio de una gran cantidad de parámetros a obtener en trabajos posteriores como:

- Estudiar la funcionalidad de la sangre después de haberla sometido a pulsos ultrasónicos.
- Realizar pruebas reológicas con sangre humana y pulsos de ultrasonido a diferentes temperaturas.
- Utilizar un aparato generador de ultrasonido de mayor potencia para analizar el efecto en la reología de la sangre.
- Hacer las pruebas en muestras de sangre con colesterol de pacientes que presenten dislipidemias (serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre).
- Efectuar estas pruebas en tipos de sangre de diferentes etnias para determinar el efecto de alimentación, salud, medio ambiente (entre otras) y composición de la sangre.
- Ejecutar estudios "in vivo".

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Escuela Superior de Salud y Ambiente. Sangre: Funciones, características y componentes. hematopoyesis. Coagulación sanguínea. grupos y tipos sanguíneos. Recuperado el miércoles 8 de agosto del 2012 de http://faciasweb.uncoma.edu.ar/academica/materias/morfo/ARCHIVOPD F2/UNIDAD6/4-Unidad6Sangre_Coagulacion.pdf
- [2] Melo, Virginia. (2006) Bioquímica de los procesos metabólicos. Capítulo "Lípidos: estructura y función biológica" Segunda edición. Ed. Reverte. Pp- 128. México
- [3] Freeman M., & Junge, C. (2008). Colesterol. (1 ed.). Barcelona: Paidós.
- [4] Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N., (2010) Fenómenos de Transporte, Editorial Reverté.
- [5] Aspectos básicos de la bioquímica clínica, J Diaz, MT Fernández et al. Capítulo 8, metabolismo de lípidos. Editorial Diaz Santos.
- [6] Manual de Laboratorio de Bioquímica Clínica. Facultad de Química. UNAM. Semestre 2012-2.
- [7] FORESTO, Patricia et al. Evaluación de alteraciones hemorreológicas en pacientes hipertensos. *Medicina (B. Aires)* [online]. 2005, vol.65, n.2 [citado 2013-02-02], pp. 121-125 . Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802005000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1669-9106
- [8] Badimón Juan José , Carlos G. Santos-Gallego y Lina Badimón, (2009) Importance of HDL Cholesterol in Atherothrombosis: How did we get here? Where Are WeGoing, *Journal of Cardiology*.

- [9] Basic Aspects of Hemorheology, Giles R. COKELET and Herbert J. MEISELMAN, Department of Chemical and Biological Engineering, Montana State University, Bozeman.
- [10] García, A. (2006) Hidráulica. Prácticas de Laboratorio. Ed. Universidad Politécnica de Valencia.
- [11] Pineda, C., Bernal, A., Espinosa, R., & , (2009). Principios físicos básicos del ultrasonido. *Rev. Chil. Reumatol.*, 25(2), 60-66.
- [12] Mezger Thomas G. (2006). *The Rheology Handbook*. Hannover, pp. 135-140 ISBN: 9783866308640
- [13] L. Dintenfass, (2010) Viscosity factors in hypertensive and cardiovascular diseases, *Cardiovascular. Medicin.*
- [14] Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP. (2009) Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation* 2009;120:S22–30.
- [15] Moreno L. (2010) Experimentos reológicos y modelado estructural de un fluido biológico (sangre humana), tesis de licenciatura, UNAM. México
- [16] Lerche D., Koch B., Vlastos G. (1993): Flowbehaviour of blood *Rheologie* 105-112. Posad, J.C.
- [17] García Jaime, Barros Juan Fernando, Conceptos básicos de fluidos. Recuperado el 07 de agosto del 2012 de <http://fluidos.eia.edu.co/hidraulica/articulos/conceptosbasicosmfluidos/nonewtonianos/nonewtonianos.html>.
- [18] Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL. (2009) Association between ischemia-modified albumin, lipids

and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clinical Biochemistry* 42(666), 71.

[19] Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biol Med* 2005;39:841–52.

[20] K. Elishkevitz, R. Fusman, M. Koffler, I. Shapira, D. Zeltser, D. Avitzour, N. Arber, S. Berliner and R. Rotstein, (2002) Rheological determinants of red blood cell aggregation in diabetic patients in relation to their metabolic control, *Diabet. Med.* 19, 152–156

[21] Medina Torres Luis, (2005) “Estudio reológico de mucílago de nopal y su efecto sinérgico con otros hidrocoloides de uso alimentario”. Tesis de doctorado, UNAM, Facultad de Química.

[22] Anexo 1. Introducción a la Reología. ITESCAM. Recuperado el 10 de enero del 2013 de www.itescam.edu.mx/principal/.../r53208.DOC

[23] LEVENSON, Jaime y SIMON, Alain. Reología sanguínea y riesgo Cardiovascular. *AVFT* [online]. 2000, vol.19, n.1 [citado 2013-02-02], pp. 05-10. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642000000100002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0798-0264

[24] Serway R., Jewet J. (2004) Física I. Texto basado en cálculo. México: Thomson.

[25] Claudia A. Silva Blanco (2010) Caracterización Reológica de hidrocoloides alimentarios: goma guar, goma trafacanto, metilcelulosa y sus mezclas. Tesis de doctorado. Santiago, Chile.