



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**



**“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE UN
FLUIDO BIOLÓGICO (SANGRE DE RATA) CON
DIFERENTES NIVELES DE COLESTEROL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

MARIANA ORTEGA CERÓN

ASESOR: DR. LUIS MEDINA TORRES.

CO-ASESOR: DR. FAUSTO CALDERAS GARCÍA.

México, D.F. 2014.



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Victoria Cerón y Juan Manuel Ortega, sé que han sido varios sacrificios para lograr que esto sucediera y sin su apoyo esto no hubiera sido posible. Gracias por su cariño, enseñanzas y también por uno que otro regalo.

A mi hermana Pamela Ortega quien ha confiado siempre en mí y que ha sido un ejemplo a seguir.

A mi hermano Victor Ortega para demostrarle que cuando uno se propone a hacer las cosas las puede lograr siempre y cuando le pongas el interés necesario, esfuerzo y dedicación.

A Suky que llegó tan inesperadamente a cambiarnos la vida a la familia completa.

A los seis lo quiero mucho son y serán lo que me impulse día con día. Estoy muy contenta y orgullosa de ser parte de esta familia.

A mi abuelita Isabel Nila quien me ha cuidado, consentido y educado, claro que siempre muy a su manera. Gracias y por favor dúrame mucho más.

A Erik García por ser quien ha caminado de la mano conmigo durante este trayecto, con tropezones, baches y caídas, de los cuales hemos aprendido y hemos podido salir adelante.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que me han brindado la oportunidad y satisfacción de aprender dentro de sus aulas.

Al Instituto de Investigación en Materiales, la Facultad de Química y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que me abrieron sus puertas y me brindaron el apoyo y material necesario para realizar este trabajo.

Al Dr. Luis Medina, por haberme permitido ser parte de este proyecto. Gracias por su paciencia y por compartir su conocimiento conmigo.

Al Dr. Fausto Calderas, por ser a quien contacte para poder ser parte de este proyecto y no dudar en que podría hacer un buen trabajo.

Al Dr. Octavio Manero, gracias por sus comentarios de mi trabajo fueron muy valiosos para la culminación del mismo.

Al M. C. Leonardo Moreno, por compartir la información y sus conocimientos, así como alentarme cuando las cosas se ponían complicadas.

Al M.C. Rubén Santiago, por su paciencia, ayuda, consejos, sugerencias, ánimos y sobre todo por compartir tus conocimientos.

Al Q.F.B Pedro Salas, por permitirme aprender un poco más, se me cebo trabajar bajo tu tutela y aun así siempre tuviste la disposición para ayudarme.

Al M.V.Z. Lizbeth, por esa gran disposición de apoyarme.

A Mariely, ya que fue quien me ayudo a sacar la sangre de las ratas, sin su ayuda la realización de este proyecto hubiera demorado un poco más.

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, que me han brindado su apoyo de una u otra manera y cariño, simplemente gracias por estar.

A mis compañeros y amigos con los que tuve la oportunidad de convivir y crecer dentro y fuera de las aulas de la FES, muchas gracias por haberme dejado vivir gratas experiencias a su lado.

RESUMEN

La sangre es un fluido biológico de estructura compleja, en sí, contiene en la fracción soluble: colesterol total, triglicéridos y proteínas; la concentración de estas sustancias modifica el comportamiento mecánico al flujo en la sangre. En este trabajo se evaluó el efecto en el comportamiento reológico que tiene el colesterol total en la sangre de rata de una cepa Wistar en un estudio “*in vitro*”. Para el cual se dispuso de 21 ratas macho que fueron divididas en tres grupos de siete ratas cada uno, estas tuvieron una dieta que consistió en alimento con diferentes niveles de grasa: el “Blanco” con 3%, el “Medio” con 4.5% y el “Alto” con 6.5% a este última se le adiciono grasa vegetal mixta. De cada grupo se obtuvo una “muestra representativa” de sangre por vía intraocular periódicamente con un espacio de 15 días entre cada toma de muestra; a las cuales se les realizaron pruebas tanto bioquímicas como hemorreológicas; estas últimas fueron pruebas oscilatorias baja amplitud de deformación y de corte simple en estado estacionario. Al realizar dichas pruebas hemorreológicas, se encontró en las pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación que el módulo viscoso predomina sobre el módulo elástico ($G'' > G'$) y en las pruebas de corte simple la sangre tiene un comportamiento adelgazante al flujo ($n < 1$). Los resultados presentan que el grupo “Alto” tiene un comportamiento pseudo-sólido, y con esfuerzo de cedencia al día 30 posterior al inicio de la dieta. Sin embargo la sangre con mayor nivel de colesterol no siempre tiende a ser la que mayor viscoelasticidad presenta, lo anterior, se debe entre otros factores al porcentaje de hematocrito. Por ello se realizó un análisis del mismo de las muestras tomadas durante la fase experimental; donde se obtuvo que la sangre de ratas con mayor nivel de colesterol es la que menor porcentaje de hematocrito presenta, y a menor nivel de colesterol mayor concentración de células presentes. Lo anterior posiblemente se deba al estrés oxidativo y al metabolismo de las ratas, cabe aclarar que el metabolismo de las ratas no es similar al de los seres humanos. Finalmente, se realizaron diluciones de sangre de 20, 40, 60, 80 y 100, dependientes de la concentración de hematocrito con la sangre de rata del grupo “Medio”, y a estas se les realizaron las pruebas hemorreológicas, con las cuales se elaboraron curvas maestras de superposición tiempo-concentración, observando una fuerte dependencia con el contenido de hematocrito presente en la sangre.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ÍNDICE.....	ii
ÍNDICE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
INTRODUCCION	viii
1 MARCO TEORICO.....	1
1.1 Reología.....	1
1.1.1 Clasificación de los fluidos.....	2
1.1.2 Viscoelasticidad.....	4
1.1.3 Métodos reométricos.....	7
1.1.4 Aplicaciones	8
1.2 Hemorreología	9
1.3 Fluido biológico (Sangre)	10
1.3.1 Eritrocito (glóbulos rojos)	10
1.3.2 Hematocrito.....	11
1.4 Colesterol.....	11
1.5 Rata Wistar.....	12
2 HIPÓTESIS.....	13
3 OBJETIVOS.....	13
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	14
4.1 Materiales.....	14
4.2 Métodos.....	15
4.2.1 Dieta de Rata Wistar.....	15
4.2.2 Obtención de la sangre.....	15
4.2.3 Determinación del nivel de colesterol.....	15
4.2.4 Determinación del hematocrito.....	16
4.2.5 Caracterización reológica de la sangre de rata.....	16
4.2.6 Obtención de las curvas maestras de sangre de rata dependiente del hematocrito.....	17

5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1	Pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación.....	20
5.2	Pruebas de corte simple en estado estacionario.	29
5.3	Análisis del hematocrito.	36
5.4	Curvas maestras	41
6	CONCLUSIONES.	43
7	BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Clasificación de Fluidos.</i> ^[7]	2
<i>Figura 1.2 Clasificación de los fluidos dependiente del comportamiento al corte; siguiendo el modelo de la ley de la potencia.</i> ^[19]	4
<i>Figura 1.3. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida en el dominio de la frecuencia</i> ^[5]	6
<i>Figura 1.4. Reómetro con geometría de cilindros concéntricos</i>	8
<i>Figura 5.1. Peso promedio (g), nivel de colesterol (mg/dL) vs Tiempo de duración de la dieta (días).</i>	19
<i>Figura 5.2. Tejido adiposo de las ratas de grupo "Blanco" y "Alto" al término de la fase experimental</i>	20
<i>Figura 5.3. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 15 días posteriores al inicio de la dieta</i>	22
<i>Figura 5.4. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 30 días posteriores al inicio de la dieta</i>	23
<i>Figura 5.5. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 45 días posteriores al inicio de la dieta</i>	24
<i>Figura 5.6. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 60 días posteriores al inicio de la dieta</i>	25
<i>Figura 5.7. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 75 días posteriores al inicio de la dieta</i>	26
<i>Figura 5.8. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 105 días posteriores al inicio de la dieta.</i>	27
<i>Figura 5.9. Módulo elástico G' (Pa) a ω_{fija} 1 rad/s vs tiempo de duración de la dieta (días)</i>	28
<i>Figura 5.10. Acumulación adiposo renal de una de las ratas del grupo "Alto"</i>	28
<i>Figura 5.11. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 15 días posteriores al inicio de la dieta</i>	29
<i>Figura 5.12. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 30 días posteriores al inicio de la dieta.</i>	30
<i>Figura 5.13. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 45 días posteriores al inicio de la dieta</i>	31
<i>Figura 5.14. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 60 días posteriores al inicio de la dieta</i>	31
<i>Figura 5.15. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 75 días posteriores al inicio de la dieta</i>	32
<i>Figura 5.16. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 105 días posteriores al inicio de la dieta</i>	33
<i>Figura 5.17. Esfuerzo de corte (Pa) a rapidez de deformación fija ($1 s^{-1}$) vs tiempo de duración de la dieta (días).</i>	34

<i>Figura 5.18. Nivel de Colesterol (mg/dL), Esfuerzo de corte (Pa) a una rapidez de deformación fija ($1s^{-1}$) vs Tiempo de duración de la dieta (días)</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5.19. G', G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) de diluciones con diferente hematocrito (20, 40, 60, 80 y 100%) a nivel de colesterol constante de 38.6mg/dL.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5.20. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) de diluciones con diferente de hematocrito. (20, 40, 60, 80 y 100) y nivel de colesterol constante de 38.6mg/dL.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5.21. Hematocrito (%) vs Tiempo de duración de la dieta (días).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 5.22. Nivel de colesterol (mg/dL), Hematocrito, Ht (%) vs tiempo de duración de la dieta (días).....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5.23. Nivel de colesterol (mg/dL), esfuerzo de corte fijo ($1 s^{-1}$) vs tiempo de duración de la dieta (días).....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5.24. Curvas maestras de la sangre de ratas Wistar, Viscosidad (Pa*s), Viscosidad compleja (Pa*s) vs rapidez de deformación (s^{-1}) frecuencia angular (rad/s); dependientes de la concentración de hematocrito a colesterol constante (38.6 mg/dL). Tomando como referencia el hematocrito de 40%.....</i>	<i>42</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1. Modelos de flujo, donde: τ, es el esfuerzo cortante (Pa), η es la viscosidad aparente (Pa*s), γ es la rapidez de corte (s^{-1}), k constante de viscosidad ($m^2 s^{-2}$)</i>	<i>2</i>
<i>Tabla 5.1. Nivel de colesterol (mg/dL) y peso promedio (g) durante el tiempo de duración de la dieta</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 5.2. Concentración de hematocito (%) durante el tiempo de duración de la dieta de los tres diferentes grupos.....</i>	<i>38</i>

INTRODUCCIÓN

La mayoría de grasas que se ingieren mediante la alimentación son los llamados triglicéridos y en menor cuantía, el colesterol y los fosfolípidos. El colesterol es una sustancia que se puede encontrar en todo el cuerpo. Es de gran importancia el consumo de estas grasas para el correcto funcionamiento de los órganos, producción de membranas celulares, esto siempre y cuando su consumo sea moderado ya que el consumo excesivo de grasas, sobre todo saturadas podría incidir en padecimientos de diversas enfermedades.

El colesterol y otras grasas son transportados en la corriente sanguínea en forma de partículas esféricas llamadas lipoproteínas. Las dos más conocidas son las lipoproteínas de baja densidad (*por sus siglas en inglés LDL*) y las lipoproteínas de alta densidad (*por sus siglas en inglés HDL*)^[1]. La importancia de éstas, radica en su asociación con el colesterol en sangre y en estrecha relación con la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El colesterol proveniente de las LDL se distribuye desde el hígado, llega a todos los tejidos, y se deposita en la pared arterial; su presencia se asocia al padecimiento de enfermedades ateroscleróticas y cardiovasculares. Por otro lado, las HDL, transportan el colesterol sobrante desde la pared arterial y desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado para eliminarlo o reutilizarlo.

Muchas personas en el mundo se han convencido gracias a las campañas publicitarias que la clave para eliminar las enfermedades coronarias del corazón y la aterosclerosis, se solucionan con reducir los niveles altos de colesterol usando fármacos que ayudan a disminuir la cantidad de colesterol, y en consumo de productos bajos en grasas saturadas. Estas campañas traen grandes beneficios para las industrias y a las manufactureras de productos bajos en grasa. Por ejemplo Pfizer con el medicamento que coadyuva a disminuir el colesterol (Lipitor®), tuvo una ganancia en ventas de \$ 10.9 billones de dólares tan solo en el 2004^[2].

En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012) ^[3], los padecimientos crónicos en los adolescentes un 1.8% de esta población presentó un diagnóstico de hipertensión arterial que alcanzo hasta 4% entre mujeres de 16 a 19 años, y

en adultos de 20 años en adelante la prevalencia de hipertensión arterial se ha mantenido prácticamente sin cambios entre 2006 y al 2012. Los malos hábitos de alimentación así como el estrés y el poco tiempo que se dispone para la alimentación, aunado al ritmo de vida tan acelerado que se tiene actualmente en la sociedad, propicia que la gente en lugar de hacer una buena elección de la dieta solo se fije en saciar su hambre y en que su precio sea accesible; dando como resultado el aumento de enfermedades crónico-degenerativas, tales como la obesidad e hipercolesterolemia (altas concentraciones de colesterol en la sangre), tal padecimiento genera enormes repercusiones en la fisiología del sistema cardiovascular. Por lo general, la población evita realizarse exámenes periódicos para una oportuna detección y prevención de este tipo de enfermedades, ya sea por falta de tiempo o por no haber recursos suficientes para poder acceder a la medicina preventiva, es por ello que en este trabajo se plantea coadyuvar en el estudio de fluidos biológicos con un gen similar al del ser humano, con el objetivo de inferir en tiempo real el nivel de colesterol, utilizando un método reológico y de manera sencilla determinar si estos sistemas tienen niveles de colesterol elevado (hipercolesterolemia), y en un futuro inmediato replicar la misma metodología con seres humanos.

1 MARCO TEORICO

1.1 Reología

La reología es la ciencia de la deformación y del flujo de la materia, es decir estudia la forma en que los materiales responden al aplicarles cierta fuerza o tensión. Todos los materiales tienen propiedades reológicas, ya que varían en función de la temperatura, presión, composición, tiempo y la manera en que sean perturbados ^[4]. La reología se aplica en los fluidos Newtonianos, pero sobre todo en los fluidos No Newtonianos; los fluidos viscosos se rigen por la ley de Newton ($\tau = \eta \frac{du}{dy}$) la cual enuncia que el esfuerzo es proporcional a la velocidad de deformación e independiente de la deformación; por otro lado la elasticidad está regida por la ley de Hooke ($\sigma = G\gamma$) en donde el esfuerzo es proporcional a la deformación e independiente a la velocidad de deformación.

Un parámetro utilizado para caracterizar o clasificar las sustancias de acuerdo a su comportamiento elástico/viscoso/viscoelástico es el número de Deborah, parámetro introducido por el Dr. Reiner, uno de los fundadores de la reología. Éste número se define como:

$$De = \frac{\lambda}{t} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, t es un tiempo característico del proceso de deformación al que se ve sometido una determinada sustancia y λ es un tiempo de relajación característico de dicha sustancia; el tiempo de relajación es infinito para un sólido de Hooke y cero para un fluido Newtoniano. Si el número de Deborah es muy pequeño ($De \rightarrow 0$) el material se comportará como un fluido porque la escala de observación es lo suficientemente amplia para examinar. En el otro extremo del intervalo, si el número de Deborah es muy grande ($De \rightarrow \infty$) el tiempo de observación se reduce al mínimo sin posibilidad de percibir algún cambio y el material tendrá el comportamiento de un sólido.

En reología hay muchos modelos que son aplicables a diversos tipos de fluidos, cada uno describe un comportamiento particular y es expresado con una ecuación en función de la respuesta mecánica y la deformación aplicada. Los más utilizados son:

Modelo	Expresión
Newtoniano	$\tau = \eta\dot{\gamma}$
Ley de la potencia	$\tau = K\dot{\gamma}^{n-1}$
Bingham	$\tau = \eta\dot{\gamma} + \tau_0$
Cross	$\eta = \eta_0 + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + K_1\dot{\gamma}^\eta}$

Tabla 1.1. Modelos de flujo, donde: τ , es el esfuerzo cortante (Pa), η es la viscosidad aparente (Pa*s), $\dot{\gamma}$ es la rapidez de corte (s^{-1}), k constante de viscosidad (m^2s^{-2})

1.1.1 Clasificación de los fluidos

El coeficiente de viscosidad dinámica η de un líquido Newtoniano es independiente de la tasa de corte. Muchos líquidos presentan un comportamiento viscoso que se aparta del descrito para los fluidos Newtonianos, y se denominan en conjunto No Newtonianos, aquellos en que el valor de η varía de manera más o menos compleja con la tasa de corte $\dot{\gamma}$ o con el tiempo, como se muestra en la Figura 1.1.

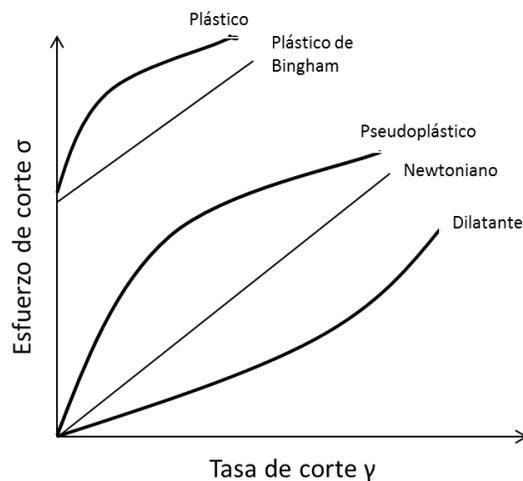


Figura 1.1. Clasificación de Fluidos. [7]

Es decir, se denomina plástico al líquido que requiere un cierto esfuerzo mínimo antes de comenzar a fluir; es decir que $\dot{\gamma}$ es cero por debajo de ese valor umbral. Un plástico de Bingham muestra asimismo un esfuerzo de corte umbral, pero una vez que comienza a fluir $\dot{\gamma}$ aumenta linealmente con σ , como lo haría un líquido newtoniano. Un líquido pseudo-plástico carece de un valor umbral de σ , al igual que un líquido newtoniano, pero

su coeficiente de viscosidad aumenta con la tasa de corte. Un líquido dilatante también carece de valor umbral de σ , pero a la inversa del caso anterior, η crece a medida que aumenta σ .

El comportamiento que tienen los fluidos No Newtonianos con respecto al tiempo cuando son sometidos a una tasa de corte constante se denominan:

- Reopéctico a un líquido cuya viscosidad aumenta con el tiempo cuando es sometido a una tasa de corte constante.
- Tixotrópico al líquido cuya viscosidad aparente disminuye con el tiempo al ser sometido a una tasa de corte constante.

Otra clasificación de los fluidos son los fluidos viscoelásticos, estos se clasifican por poseer en mayor o menor grado características elásticas y viscosas simultáneamente, cualquier fluido biológico tiene este comportamiento. La ecuación matemática que relaciona las propiedades de este tipo de fluidos es la ecuación de Maxwell:

$$\dot{\tau} + \frac{\tau}{\lambda} = m \dot{\gamma}$$

Ecuación 2

Para la ecuación de Maxwell, τ es el esfuerzo cortante aplicado al fluido, λ es el tiempo de relajación, $\dot{\tau}$ es el gradiente del esfuerzo cortante, m se refiere a la viscosidad del fluido y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación.

Los fluidos viscoelásticos se deforman instantáneamente por acción de una fuerza. En el momento inicial el material en cuestión fluye regido por un modelo reológico, de modo que la tensión se relaja al momento de que el material llegue 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.

En particular el modelo de la ley de la Potencia, clasifica a los fluidos Newtonianos donde la viscosidad η es constante ($n=1$). Y para los fluidos no Newtonianos se tiene que cuando $n < 1$, se dice que el fluido es adelgazante al corte, es decir que la viscosidad va

disminuyendo conforme la rapidez de corte aumenta. Finalmente si $n > 1$, se dice que el fluido es espesante al corte. (Figura 1.2).

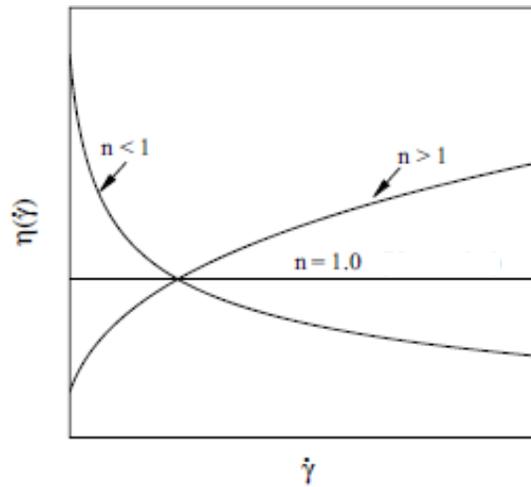


Figura 1.2 Clasificación de los fluidos dependiente del comportamiento al corte; siguiendo el modelo de la ley de la potencia.^[19]

1.1.2 Viscoelasticidad

Este concepto es el más abordado en el campo de la reología y describe el comportamiento de muchos materiales. Los efectos viscoelásticos son observables solamente en fluidos no-Newtonianos. En general este concepto hace referencia a la superposición de los efectos de disipación de energía (efectos viscosos) y de los efectos de almacenamiento de energía (efectos elásticos). La viscoelasticidad lineal es aplicada cuando la deformación encontrada por los materiales es suficientemente pequeña, para que el material no modifique su estado de equilibrio, una característica del comportamiento lineal es que las propiedades reológicas medidas son independientes de la magnitud de la deformación o el esfuerzo aplicado, y las relaciones entre el esfuerzo, la deformación y su dependencia con el tiempo son descritos generalmente por ecuaciones constitutivas o ecuaciones reológicas de estado. Los fluidos viscoelásticos se caracterizan por presentar a la vez tanto propiedades viscosas como elásticas. Esta mezcla de propiedades puede ser debida a la existencia en el líquido de moléculas muy largas y flexibles o también a la presencia de partículas líquidas o sólidos dispersos. El comportamiento viscoelástico es inherente a todas las dispersiones de biopolímeros, sistemas multifase y estructuras de

tejidos biológicos. Muchos de los fluidos biológicos poseen esta naturaleza. El comportamiento viscoelástico es particularmente relevante en situaciones de movimiento inconstante, esto es, cuando los esfuerzos o deformaciones están cambiando con el tiempo. Por lo que la respuesta dinámica de los materiales viscoelásticos puede ser utilizada para obtener información de aspectos estructurales de un sistema a nivel molecular o predecir el comportamiento a una escala macroscópica ^[5].

Uno de los modelos que describe el comportamiento viscoelástico es el de *Maxwell*. A partir de este modelo se pueden obtener funciones que representen los módulos de almacenamiento y disipación (G' y G''), resultando las siguientes ecuaciones:

$$G' = \eta_0 \frac{\lambda \omega^2}{1 + (\lambda \omega)^2} = G \frac{(\lambda \omega)^2}{1 + (\lambda \omega)^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$G'' = \eta_0 \frac{\omega}{1 + (\lambda \omega)^2} = G \frac{\lambda \omega}{1 + (\lambda \omega)^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, tenemos que:

G = Módulo de rigidez

G' = Módulo de almacenamiento

G'' = Módulo de pérdida

η_0 = Viscosidad a bajas velocidades de cizalla simple

λ = tiempo de relajación de esfuerzos

ω = Frecuencia de oscilación

En la viscoelasticidad lineal las funciones materiales de los módulos de almacenamiento, G' y de pérdida, G'' ; el primero indica 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 ($\delta=0$); 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 (δ) tendrá un valor intermedio entre 0° y 90° [5].

Para la mayoría de los materiales biológicos con pesos moleculares altos (por encima del peso molecular crítico PM_c , el cual se define como el peso molecular en donde se empiezan a observar interacciones entre cadenas) se han identificado cuatro zonas viscoelásticas: vítrea, transición, meseta o plástica, y terminal o de flujo (ver Figura 1.3). Donde, la zona terminal está representada a bajas frecuencias y tiene como características generales pendientes de 1 para G'' y 2 para G' en escala logarítmica: la zona de Terminal sigue a la zona de meseta y empieza por un máximo en G' (ω) denominado $G''_{m\acute{a}x}$, y se presenta en una frecuencia ω_m ; luego G'' pasa por un mínimo para volver a aumentar, en esta zona G' permanece relativamente constante y se denomina como módulo de meseta (G_n^0); en la zona de transición G'' vuelve a ser mayor que G' , y por último, en el inicio de la zona vítrea vuelven a cruzarse G' y G'' , siendo G'' menor que G' , la cual se vuelve casi constante [5].

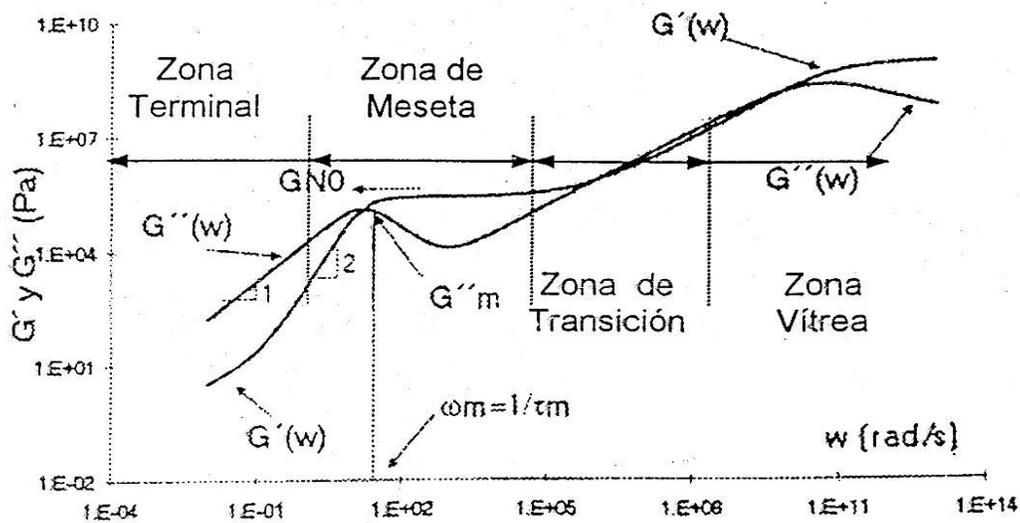


Figura 1.3. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida en el dominio de la frecuencia [5]

Con lo descrito anteriormente, se puede observar en los espectros dos tiempos de relajamiento: en la región de transición, para tiempos de relajación cortos; y en la terminal, para tiempos de relajación largos. En la zona de transición las propiedades viscoelásticas están dominadas por reacomodos de segmentos moleculares, los cuales son lo suficientemente cortos para no depender tanto de entrecruzamientos con otras cadenas biomoleculares, como del peso molecular de dichas cadenas celulares. En cambio, en la zona terminal y de meseta las propiedades son dominadas por diferentes factores que imponen al sistema restricciones topológicas, como es la presencia de una red de entrecruzamientos, las cuales impiden de manera significativa movimientos, configuraciones de largo alcance. Por lo tanto, en el estudio de estos procesos de relajación más lentos se deben considerar tanto el peso molecular como la distribución del peso molecular de las cadenas del sistema.

1.1.3 Métodos reométricos

Los tres métodos reométricos más utilizados para la medición de las propiedades de los fluidos complejos son: el de cilindros concéntricos, de cono y plato y el capilar. La viscosidad y las funciones lineales viscoelásticas del material pueden ser determinadas en cualquiera de los tres reómetros.

La geometría de cilindros concéntricos hace la prueba al fluido que está entre los dos cilindros concéntricos con un radio interior y exterior diferente, se aplica un torque para hacer rotar los cilindros generando un rango de rotación relativa entre el cilindro interior y exterior. Para la obtención de medidas cuantitativas de las propiedades del material, se asume que el fluido es simétrico al eje y puramente circunferencial con efectos finales insignificantes.



Figura 1.4. Reómetro con geometría de cilindros concéntricos

La geometría de cono y platos utilizado para determinar el coeficiente de corte normal de algunos fluidos. La medición del torque aplicado y el rango de rotación son usados para obtener las propiedades de los materiales, asumiendo que los efectos de inercia son insignificantes y la superficie libre es esférica.

En el sistema capilar, los fluidos a prueba caen por gravedad, compresión de gas o gracias a un pistón, frecuentemente son utilizados para medir la viscosidad linear y las propiedades viscoelásticas de los líquidos.

1.1.4 Aplicaciones

La reología es relevante en diversas áreas de estudio, tales como: geología y minería (Cristescu, 1989), tecnología del cemento (Tattersall and Banfill, 1983), mecánica de suelos (Haghighi et al. 1987; Vyalov, 1986), procesamiento de plásticos (Dealy and Wissburn, 1990), flujo de pintura y dispersión de pigmentos (Patton, 1964), sangre (Dintefass, 1985), cosméticos y artículos de tocador (Laba, 1993b), entre otras.

1.2 Hemorreología

El iniciador del estudio hemorreológico fue J.L.M Poiseuille (1797-1841) que estudio el flujo de la sangre a través de los tubos capilares. La reología de la sangre o hemorreología, es la disciplina que estudia las características de la sangre como fluido. Dichas propiedades son complejas, ya que lidia con el fluido, la deformación y los elementos que la forman.

El comportamiento no Newtoniano de la sangre está dado por tres aspectos del comportamiento del eritrocito: su habilidad para aglomerarse y ramificarse en una microestructura tridimensional a bajos esfuerzos de corte, su deformabilidad y la tendencia a alinearse al campo de flujo a esfuerzos de corte altos.^[6]

Los factores hemorreológicos juegan un rol importante en la localización y detección de enfermedades vasculares. Así como simulaciones matemáticas como numéricas del flujo de la sangre en el sistema cardiovascular pueden automáticamente contribuir a mejorar los diagnósticos y a la planificación terapéutica. Los procedimientos que sigue la mecánica de fluidos se usan para predecir como un fluido se comporta en respuesta a ciertas fuerzas, involucran tres pasos:

1. La consideración de todas las fuerzas se ejercen sobre un volumen infinitesimal de fluido. Esto está hecho para el uso físico conocido como conservación de *momentum* y esto da como resultado ecuaciones que relacionan las fuerzas ejercidas y el gradiente de velocidad.
2. Introducción de ecuaciones reológicas (constitutivas) específicas para cada tipo de fluido. Estas ecuaciones indican cómo el líquido responde a las fuerzas, y relacionan las fuerzas de los gradientes de velocidad resultante. Las ecuaciones reológicas contienen características específicas del fluido (Por ejemplo; la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte).
3. La sustitución de las ecuaciones reológicas dentro de las ecuaciones de conservación de *momentum*, y la integración de las diferenciales resultantes para obtener las relaciones macroscópicas, como las tasas de flujo y los gradientes de presión.

El estudio de las propiedades reológicas de sistema biológicos tiene gran interés desde el punto de vista termomecánico, ya que estas propiedades influyen durante el proceso de colesterol presente en la sangre; por otro lado, la causa física de dichas propiedades está en las múltiples conformaciones que pueden adoptar las macromoléculas y en la interacción entre ellas, las cuales generan una amplia gama de comportamientos funcionales de gran interés en patologías o posible aplicaciones en bioingeniería.

1.3 Fluido biológico (Sangre)

La sangre es un fluido que consta de dos partes esenciales; el plasma que es su fase fluida y elementos celulares que es su fase sólida. Los elementos celulares están comprendidos por: glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos). La fracción porcentual de cada volumen de sangre ocupada por los eritrocitos se denomina hematocrito.^[7]

La sangre se moviliza dentro de los vasos sanguíneos desde el corazón hacia los tejidos (por las arterias) y viceversa (por las venas). La pared de los vasos sanguíneos forma el límite del sistema sanguíneo.

La función esencial de la sangre es transportar oxígeno y nutrientes a todos los tejidos, removiendo desechos y defendiendo al cuerpo contra infecciones a través de los anticuerpos. La circulación de la sangre en el sistema cardiovascular no solo depende de la fuerza con la que late el corazón ni de la arquitectura o las propiedades mecánicas del sistema vascular, influye también de las propiedades mismas de la sangre.

1.3.1 Eritrocito (glóbulos rojos)

Los eritrocitos son muy flexibles, la proteína que se encuentra en el interior es la hemoglobina, da el color rojo a la sangre, están envueltos principalmente de oxígeno y dióxido de carbono que son transportados a lo largo de los pulmones y los órganos del cuerpo. Los eritrocitos de los mamíferos presentan la forma de discos bicóncavos y de perfil se presentan como cuerpos alargados con extremos redondeados. El tamaño en estado

fresco es de 6 a 8 μm . Una propiedad física característica de los eritrocitos es la tendencia a adherirse entre sí, formando columnas en forma de pilas de monedas también denominadas *rouleaux*. Se considera que la causa de esta adhesión sea a la tensión superficial que tiene el eritrocito en su membrana. Otra característica de los eritrocitos son los cambios de forma que sufren por la acción de los factores mecánicos y/o físicos. Esta propiedad se debe a que los eritrocitos son blandos y flexibles, pero una vez que dichos factores dejan de actuar, recuperan su forma primaria.

1.3.2 Hematocrito

El volumen de concentración de eritrocitos (glóbulos rojos) en toda la sangre es llamada hematocrito, este es determinado mediante la centrifugación de la sangre en un tubo capilar y midiendo el volumen ocupado por el conjunto de células que quedan sedimentadas en el fondo.

Bajo condiciones de flujo laminar, la presencia de elementos celulares interfieren en las líneas de flujo y esta es la principal razón por la cual la viscosidad de la sangre es mayor que la del plasma. Existe una relación exponencial entre el valor del hematocrito y la viscosidad de la sangre: a mayores niveles de hematocrito, la viscosidad de la sangre comienza a incrementar sensiblemente a las alteraciones del hematocrito. El aumento de la viscosidad con el hematocrito es mucho menos acentuado en un lecho vascular que en un viscosímetro.

1.4 Colesterol

El colesterol es una molécula relativamente rígida, con una masa molecular 386.65 g/mol, presente normalmente en baja concentración en la matriz lipídica de la membrana del eritrocito, todas las células requieren colesterol para sus actividades de crecimiento, reproducción y mantenimiento. Una mayor concentración de colesterol en la membrana del eritrocito en relación a la concentración de fosfolípidos tiende a disminuir la deformabilidad de los glóbulos rojos.

El colesterol y otras grasas son transportados en la corriente sanguínea en forma de partículas esféricas llamadas lipoproteínas. Las dos más conocidas son las lipoproteínas HDL (High DensityLipoprotein) que son las encargadas de transportar el colesterol desde los tejidos y llevarlo hacia el hígado, por lo cual es llamado colesterol bueno y las LDL (LowDensityLipoprotein) son la forma como se transporta el colesterol en el sistema cardiovascular, mejor conocido como el colesterol malo; ya que estas tienden a adherirse en las paredes de las arterias.

Actualmente el método para determinar el nivel de colesterol en la sangre es por medio de exámenes bioquímicos, para los cuales es necesario acudir a algún laboratorio a realizar dichos análisis. Es por ello que con este trabajo se pretende que con un método mecánico(reología) se pueda inferir de manera pronta, eficaz y precisa, el nivel de colesterol en la sangre de ratas Wistar, con el objetivo de que en un futuro cercano se puedan realizar pruebas con sangre humana, para poder detectar si existen niveles elevados de colesterol en la sangre y así prevenir enfermedades crónico-degenerativas, las cuales tienen una gran incidencia en el país.

1.5 Rata Wistar

Actualmente las ratas Wistar son una de las cepas más populares y utilizadas para la investigación en el laboratorio, por lo que este mamífero sirve como un organismo modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas; es considerado como importante herramienta para la investigación de las condiciones que afectan a los seres humanos que pueden ser simulados en ratas.

La investigación de laboratorio en el modelo animal exige el control estricto de algunas variables que permiten conseguir resultados reproducibles. Estas variables a menudo son la edad, el sexo y el peso corporal, con lo cual se caracteriza a los grupos de trabajo y se garantiza una posible extrapolación de los resultados al modelo humano.^[8]

2 HIPÓTESIS

Si el fluido biológico (sangre de rata) con niveles elevados de colesterol modifica sus propiedades reológicas, esta puede ser analizada en función de los procesos de flujo debido a los mecanismos mecánicos, cinéticos y difusivos.

La sangre contiene células en suspensión que tienden a interactuar entre sí formando estructuras transitorias más complejas, por ende esta tendrá distinto comportamiento dependiendo del nivel de colesterol presente.

3 OBJETIVOS

- Caracterización reométrica de un fluido biológico (sangre de rata Wistar) con diferentes niveles de colesterol; deformación y destrucción de la estructura debido al flujo, a través de distintas pruebas reológicas.
- Interpretación física de las propiedades materiales del sistema (tiempos de relajación, tiempos de restructuración, módulos elásticos y constantes cinéticas) en función del nivel de colesterol total presente en las muestras.
- Establecer una base de datos como referencia para futuras aplicaciones diagnósticas y preventivas en la evaluación de hipercolesterolemia en humanos.

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

Para los estudios bioquímicos y reológicos de la sangre de rata Wistar con diferentes niveles de colesterol, se empleó el siguiente material:

- Reómetro de esfuerzos controlados ARG2 (TA Instruments®) equipado con una geometría de cilindros concéntricos (21.96 mm diámetro del cilindro externo, 20.38 mm diámetro del cilindro interno, 59.50 mm de altura y 500 μm de separación).
- Software de análisis de datos “*TA Rheology Advantage Data Analysis V.5.7.0* (TA Instruments Ltd, Crawley, UK)”.
- Alimento de rata: Nutri-cubos, RodentLaboratoryChow 5001, FormuLabChow 5008, de la marca Purina® y grasa vegetal mixta.
- La sangre usada en este trabajo fue:
 - Sangre de rata con anticoagulante (EDTA^{*}).
 - Sangre sin anticoagulante.
- Fotofotómetro *Daytona “rx”*
- Centrífuga Modelo Unisen 21.
- Vernier

Las muestras de sangre fueron obtenidas con la colaboración de la Unidad de Constatación y analizadas en el departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

*El anticoagulante EDTA para hematología es una solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminitetracético. Las sales de sodio y potasio en este ácido se comportan como poderosos anticoagulantes, ya que inhiben la participación del ión calcio en la cascada de la coagulación de la sangre. No afecta la morfología de las células hemáticas y no modifican la velocidad de sedimentación globular.

4.2 Métodos.

4.2.1 Dieta de Rata Wistar.

Se usaron 21 ratas Wistar, macho; separadas en tres grupos de 7, cada grupo fue alimentado con diferente dieta, regulada por el contenido de grasa en el alimento. A continuación se enlistan los grupos conformados en este estudio y su respectiva dieta:

- Grupo “Blanco”, alimentado con Nutri-cubos con 3% de grasa.
- Grupo “Medio”, alimentado con RodentLaboratoryChow 5001 con 4.5% de grasa.
- Grupo “Alto”, alimentado con FormuLabChow 5008 con 6.5% de grasa, y a este alimento a su vez se le adicionó grasa mixta vegetal (esto con el fin de que hubiesen cambios significativos en el contenido de colesterol en la sangre de las ratas, debido a que estas tienden a metabolizarlo más rápido en comparación con los seres humanos).

El consumo de la comida fue de manera controlada, se evaluó el total de consumo diario al pesar el alimento cada 24 h. El consumo de agua fue *ad libitum*. Esta prueba fue desarrollada en el área de prueba en la Unidad de Constatación de la FMVZ de la UNAM, a una temperatura de 20-22°C con ciclos de luz-oscuridad de 12 h.

4.2.2 Obtención de la sangre

Se extrajo sangre de cada rata (~1 mL) para la obtención del “pull” de sangre de rata de cada uno de los grupos experimentales; esto se realizó de manera periódica con espacio de 15 días entre cada toma de sangre, la extracción fue por vía intraocular. La sangre fue dividida en dos fracciones; una fracción fue almacenada en tubos con anticoagulante (EDTA) y la otra fracción en tubos sin anticoagulante. Para su posterior análisis.

4.2.3 Determinación del nivel de colesterol

Este análisis bioquímico para la determinación de colesterol total, se llevó a cabo con la fracción de sangre que no contenía anticoagulante, las determinaciones se realizaron

mediante un fotofotómetro de la marca “Daytonarx” a una temperatura de 37 °C, en la Unidad de Patología de la FMVZ de la UNAM.

4.2.4 Determinación del hematocrito

El hematocrito se evaluó con las muestras de sangre de rata con EDTA de los diferentes grupos obtenidas en el tiempo de duración de la dieta, una fracción de estas muestras fueron colocadas en tubos capilares haciéndolos subir por efecto de capilaridad, los cuales fueron tapados en la parte inferior del tubo con plastilina, posteriormente se centrifugaron por 5 min. a 4000 rpm. Una vez centrifugadas las muestras fueron medidas con un vernier y se determinó el hematocrito contenido en la sangre.

4.2.5 Caracterización reológica de la sangre de rata

A cada una de las muestras de sangre de rata con EDTA obtenidas en el tiempo de duración de la dieta se colocaron aproximadamente 5mL en el reómetro de esfuerzos controlados “ARG2 (TA Instruments®)” equipado con una geometría de cilindros concéntricos y se realizaron las pruebas hemorreológicas.

Las pruebas realizadas fueron:

- ***Pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación***

Se realizó un barrido de deformación (0-100%) como variable impuesta a diferentes frecuencias (1, 10 y 100 Hz), y se reportaron los módulos mecánicos (G' y G'') como variable de respuesta para la determinación de la zona de viscoelasticidad lineal. Determinado el porcentaje de deformación en el cual se presenta dicha zona lineal, se realizó un barrido de frecuencia de 1 hasta 300 rad/s, siguiendo la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de las muestras. Las evaluaciones se hicieron a una temperatura fija de 37 °C.

- ***Pruebas de corte simple en estado estacionario***

Esta prueba se realizó en una ventana de observación de flujo de corte simple de 0.1 a 300 s⁻¹. A temperatura fija de 37 °C.

4.2.6 Obtención de las curvas maestras de sangre de rata dependiente del hematocrito

Para la obtención de 45 mL de sangre de rata por vía intracardiaca, se sacrificó al grupo “Medio”. Posteriormente se centrifugó toda la sangre para la separación en dos fases (plasma y células), una vez separada, se hicieron cinco diluciones (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) dependientes del hematocrito. Con ello se hicieron pruebas hemorreológicas de corte simple en estado estacionario y de baja amplitud de deformación. Con los resultados hemorreológicos se elaboraron las curvas maestras tomando como referencia una concentración de 40% de hematocrito en el software de Análisis de datos “*TA Rheology Advantage Data Analysis V.5.7.0* (TA Instruments Ltd, Crawley, UK)”.

NOTA: la metodología de las hemorreologías de las muestras obtenidas durante la fase experimental y las de la curva maestra fueron realizadas al menos por duplicado, para que se comprobase que este método mecánico es reproducible y fiable para el análisis de este fluido biológico (sangre de rata).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los datos obtenidos al realizar los estudios bioquímicos de la sangre de rata Wistar se observó que en un periodo de un mes de alimentación controlada, esta presenta variaciones importantes en los niveles de colesterol; es decir, tiene un incremento máximo y posteriormente una disminución y un incremento de manera sinusoidal sin llegar al máximo inicial, sin seguir un patrón determinado (ver tabla 5.1), por lo cual, no tiene una tendencia a aumentar sostenidamente como sucede con los seres humanos, que al consumir gran cantidad de grasa (sobre todo saturadas) comienzan a presentar altos niveles de colesterol en la sangre^[9]. Tal comportamiento no concuerda con los resultados reportados por Paredes, et. al., (2009)^[10] quienes reportan que durante el primer mes posterior al inicio de la dieta hay un aumento progresivo en el nivel de colesterol hasta llegar a un nivel máximo de este, y al paso de los días hay una disminución sostenida hasta el término de la dieta. Estos resultados se pueden atribuir a que la tasa metabólica en los mamíferos aumenta en la medida que disminuye el peso y el tamaño. Se ha estimado que en una semana, una rata consume alrededor de seis veces su peso corporal para cubrir sus necesidades energéticas, mientras que el humano consume sólo una tercera parte de su peso^[11], esto se ve reflejado en los resultados obtenidos.

Tiempo (días)	grupo “Blanco”		grupo “Medio”		grupo “Alto”	
	a(mg/dL)	b(g)	a (mg/dL)	b (g)	a (mg/dL)	b (g)
0	N.D.	364	N.D.	368	N.D.	386
15	46.01	381	44.07	411	51.33	446
30	40.22	397	35.57	396	49.87	445
45	49.88	397	42.92	402	37.12	475
60	57.62	378	67.67	414	66.90	496
75	51.04	398	47.95	437	58.78	517
105	61.10	433	56.46	477	70.38	533

a: Concentración de colesterol (mg/dL).

b: Peso promedio (g).

N.D. No determinado.

Tabla 5.1. Nivel de colesterol (mg/dL) y peso promedio (g) durante el tiempo de duración de la dieta

En la Figura 5.1, se aprecia la evolución de la concentración de colesterol total y el peso de las ratas en un lapso de 105 días. Con respecto al peso inicial (día 0) de los tres grupos experimentales es importante hacer notar que el grupo “Blanco” y “Medio” son similares, a

diferencia del grupo “Alto”. A lo largo del tiempo de estudio, el peso de los animales aumentó proporcionalmente, salvo en el grupo “Medio” el cual a los 30 días posteriores del inicio de la dieta tuvo un pequeño decremento, para volver a incrementar a los 15 días posteriores de estudio. Este efecto se atribuye al comportamiento metabólico de las ratas y también que al tener un único sitio de alimentación, la competencia entre las ratas por alimentarse promueve que no todas ellas ingieran la misma cantidad de alimento y se presente una diferencia en peso considerable.

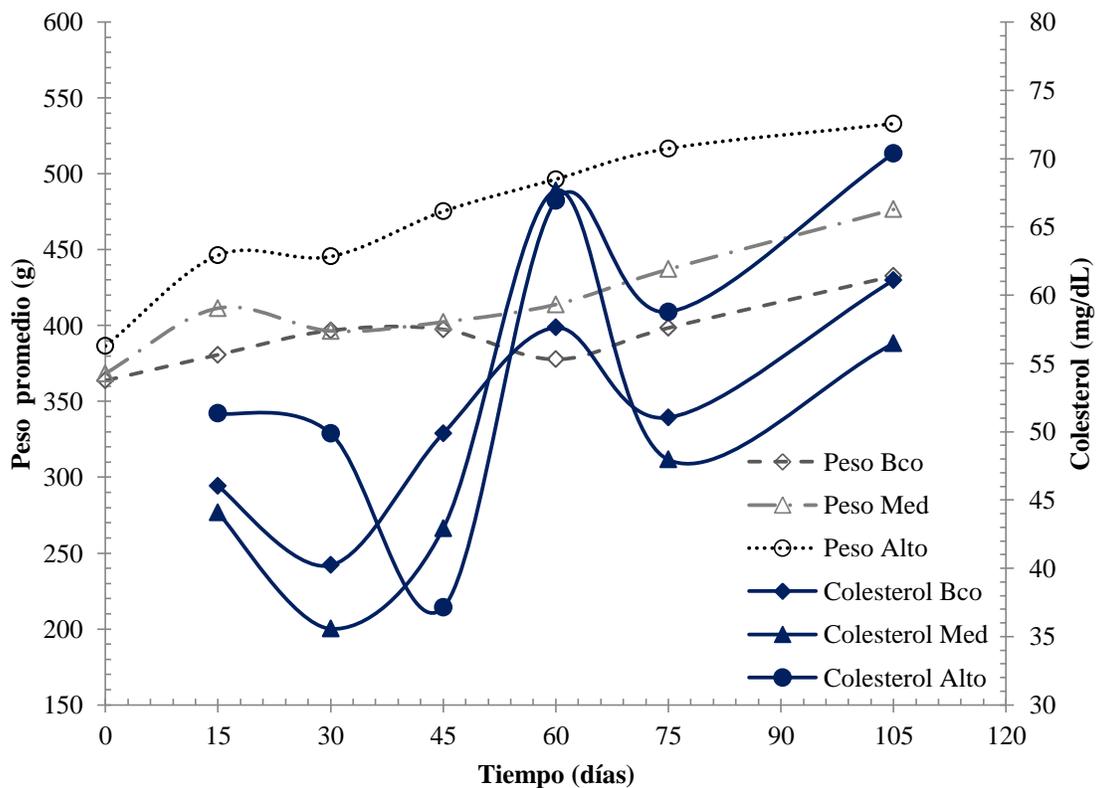


Figura 5.1. Peso promedio (g), nivel de colesterol (mg/dL) vs Tiempo de duración de la dieta (días)

Por otro lado, la concentración de colesterol total en la sangre de rata no presenta una tendencia lineal con respecto al tiempo. A los 15 días posteriores al inicio de la dieta, se observó una diferencia considerable entre los niveles de colesterol total entre los tres grupos, y a los 15 días posteriores de estudio, se observa un decremento, así al día 45 del estudio, la concentración de colesterol total para los tres grupos comienza a aumentar significativamente hasta el día 60, para presentar de nuevo un decremento asociado a un mecanismo de defensa ya que se forma almacenamiento en tejido adiposo (Figura 5.2).

Posteriormente al día 75 volver a aumentar. Estas variaciones se atribuyen a que el colesterol total se presenta en dos sitios primordialmente, sangre y tejido adiposo; el decremento de colesterol total implica indirectamente un almacenamiento en tejido adiposo, ya que las ratas utilizan sus mecanismos de defensa, buscando asimilar el mayor contenido de colesterol ingerido, y el que ya no pueden asimilar induce a la formación de tejido graso que se va acumulando en el cuerpo de las ratas, impidiendo que el exceso de colesterol se presente en el nivel de colesterol en la sangre^[12]; es por ello que en el tiempo de duración de la dieta si se observaron cambios significativos en el peso de las ratas, ya que tiende a aumentar en todos los grupos, sobre todo se observa una diferencia significativa en el grupo Alto, sin embargo, el exceso de grasas consumidas no se ve con un cambio tan significativo en el estudio bioquímico de las muestras de sangre (Tabla 5.1).



Figura 5.2. Tejido adiposo de las ratas de grupo "Blanco" y "Alto" al término de la fase experimental

5.1 Pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación

Los resultados de los espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación se presentan en las Figuras 5.3-5.8, en donde se observa el comportamiento reológico de la sangre de rata en el tiempo de duración de la dieta desde los 15 hasta los 105 días. En las curvas de las pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación (pruebas no

destructivas) se observa que en todas las muestras de sangre el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'); es decir $G'' > G'$. Esto denota el carácter predominante de la sangre como un fluido más que como un líquido viscoelástico; cabe resaltar que a bajas frecuencias y tiempos largos el grupo “Alto” se observa un comportamiento pseudo-sólido, esto se puede atribuir posiblemente a las interacciones que hay entre las membranas de las células de la sangre y el colesterol presente en la misma. La sangre analizada no presenta coagulación, ya que se usó EDTA; ya que en caso de que la sangre estuviera coagulada, el módulo elástico predominaría sobre el viscoso ($G' > G''$). En las Figuras 5.3-5.8, se observa la evolución de los módulos viscosos y elásticos en función de la frecuencia. La mayoría de fluidos complejos entre ellos la sangre presentan un comportamiento viscoelástico. En la sangre particularmente, es evidente la evolución de las estructuras formadas por sus componentes, dichas estructuras no son estables (tiempos cortos), es decir a la más mínima deformación se destruirían.

En el caso de la Figura 5.3, se observa que ambos módulos (G' y G'') del grupo “Blanco” tienen un comportamiento mecánico al flujo mayor que los otros dos grupos, siguiéndole el grupo “Medio”, y resultando que el grupo “Alto” es el más bajo de todos en su respuesta al flujo oscilatorio. A pesar de que la muestra de sangre del grupo “Alto” tiene un comportamiento viscoelástico menor, a frecuencias bajas tiende a presentar una pendiente (m) más pronunciada esto denota que hay unas interacciones físicas más grandes en las membranas de las células de la sangre y el colesterol.

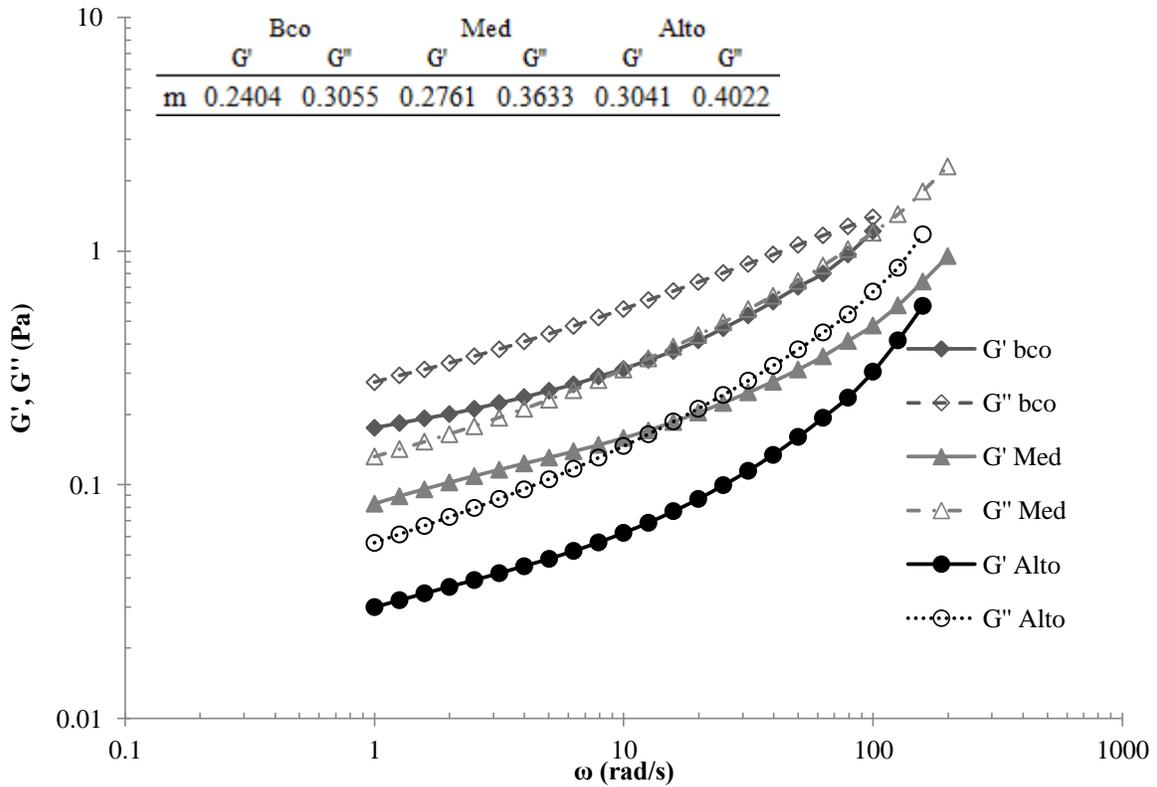


Figura 5.3. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 15 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.4, se observa que los módulos del grupo “Alto” a frecuencias bajas (1-10 rad/s) tiene un comportamiento pseudo-sólido, esto denota que ambos módulos se vuelven casi independientes de la frecuencia angular, principalmente el módulo elástico, ya que la pendiente obtenida es muy cercana a cero; lo anterior es atribuido a que tiene un mayor contenido de elementos celulares sanguíneos y de colesterol, y en consecuencia mayores interacciones físicas; por el contrario el grupo “Medio” y “Blanco” siguen manteniendo un comportamiento viscoelástico dependientes de la frecuencia.

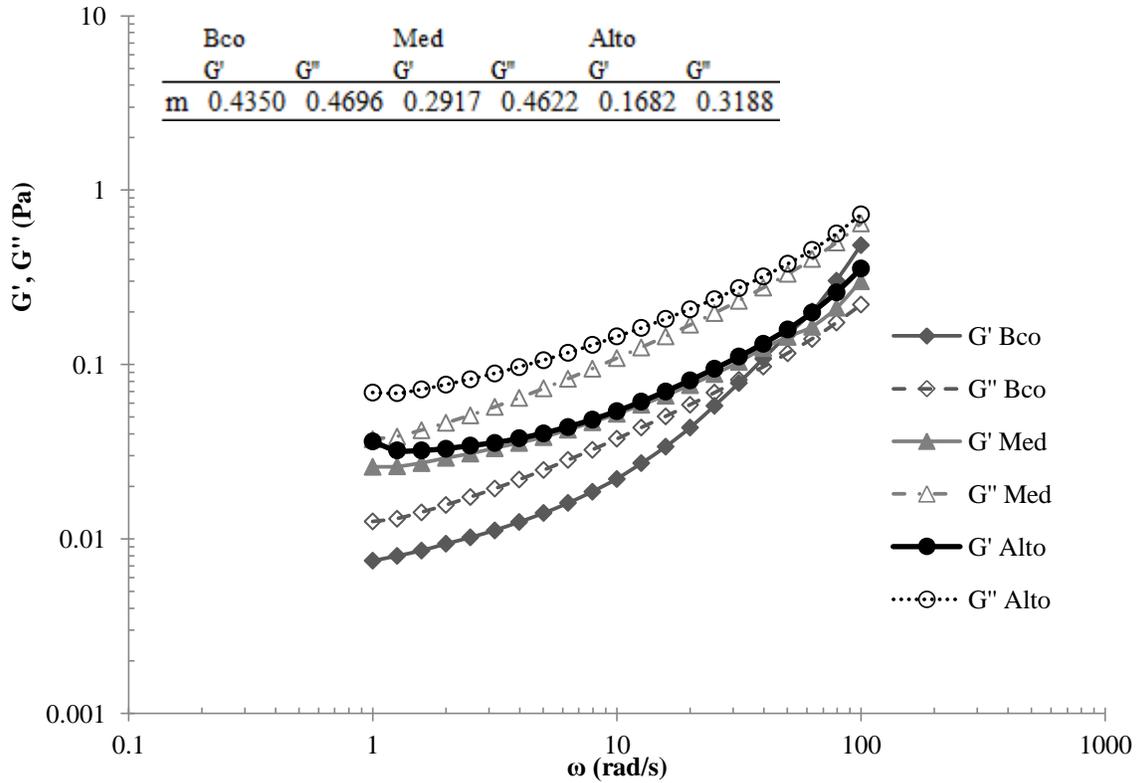


Figura 5.4. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 30 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.5 se observa que los módulos del grupo “Alto” predomina por encima del grupo “Medio” y “Alto”, aunque todos los grupos presentan un comportamiento de viscoelásticidad, solo se alcanzan a apreciar pequeñas diferencias en la pendientes a frecuencias angulares bajas (tiempos largos al flujo).

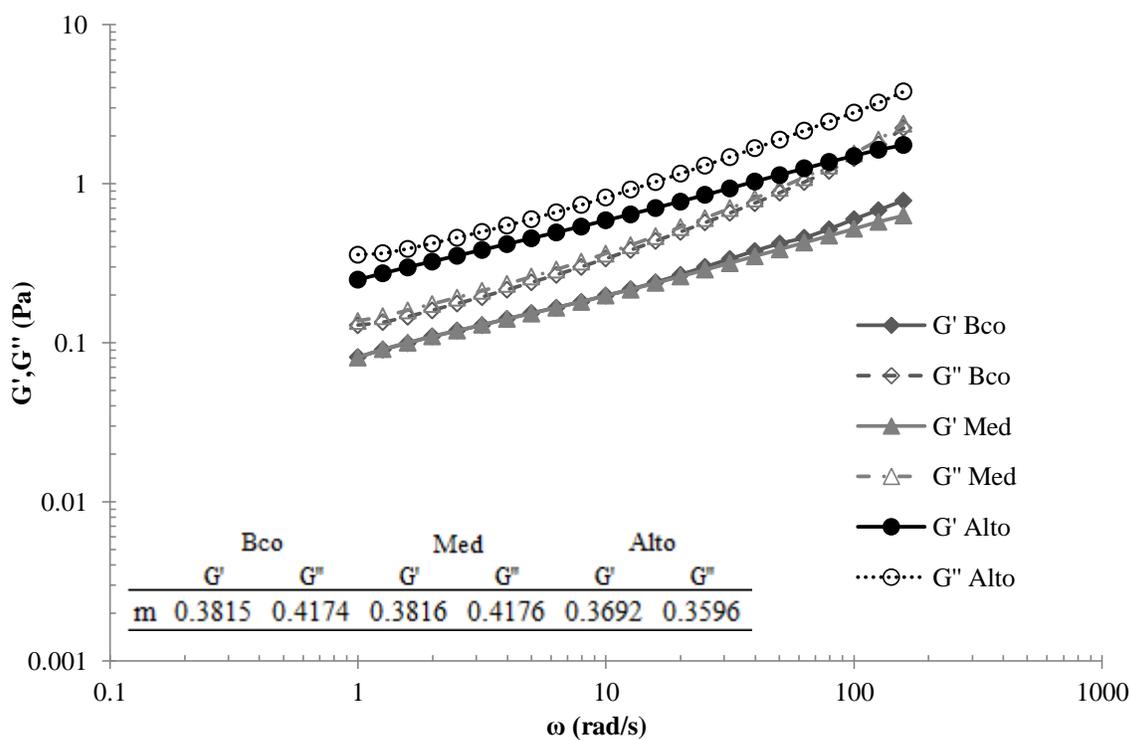


Figura 5.5. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 45 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.6, aunque ambos módulos de los tres grupos tienen un comportamiento muy similar a lo largo del intervalo de frecuencias, el módulo viscoso del grupo “Blanco” tiene una ligera predominancia sobre los otros, así como también ambos módulos de todos los grupos tienden a converger. Esto concuerda con los resultados obtenidos de las pendientes de cada uno de ellos, ya que se demuestra que son muy similares entre sí.

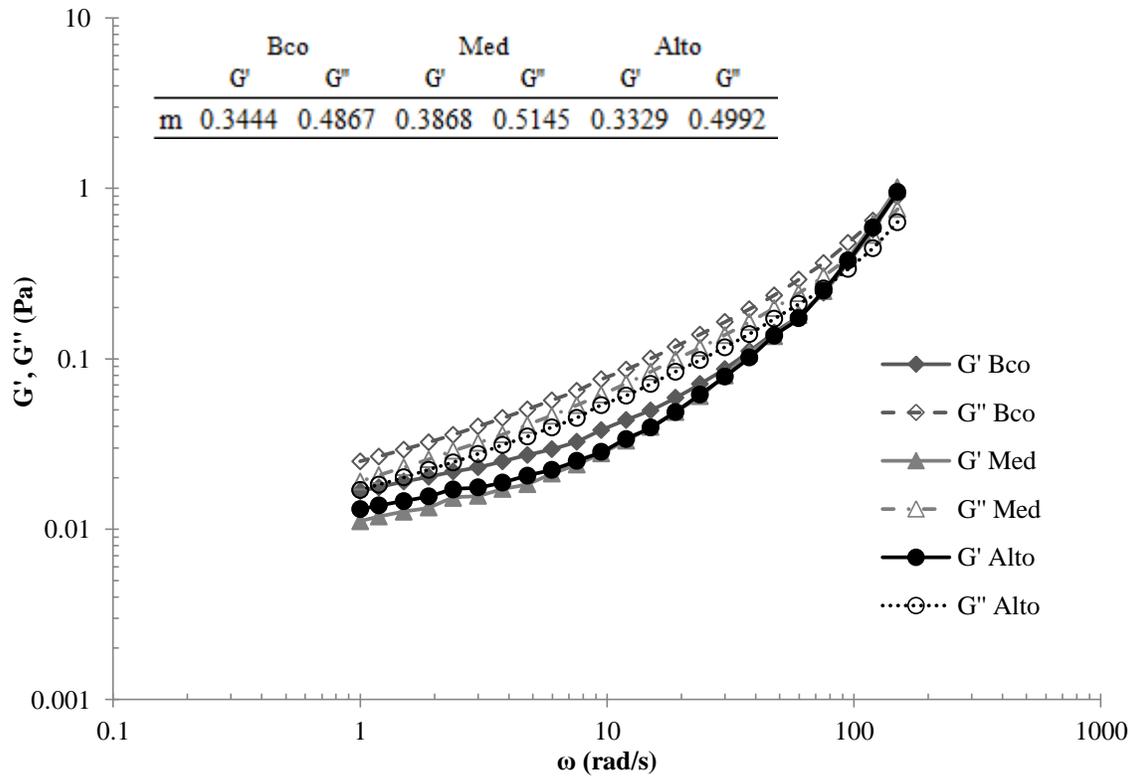


Figura 5.6. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 60 días posteriores al inicio de la dieta

En la figura 5.7, se observa que todos los grupos tienen un comportamiento viscoelástico, predominando el grupo “Alto” sobre los otros dos grupos, esto concuerda con lo reportado por Moreno 2011^[16]. Donde se demuestra que la sangre al contener un mayor nivel de colesterol esta tendrá un comportamiento viscoelástico mayor que la sangre que contenga un menor nivel de colesterol.

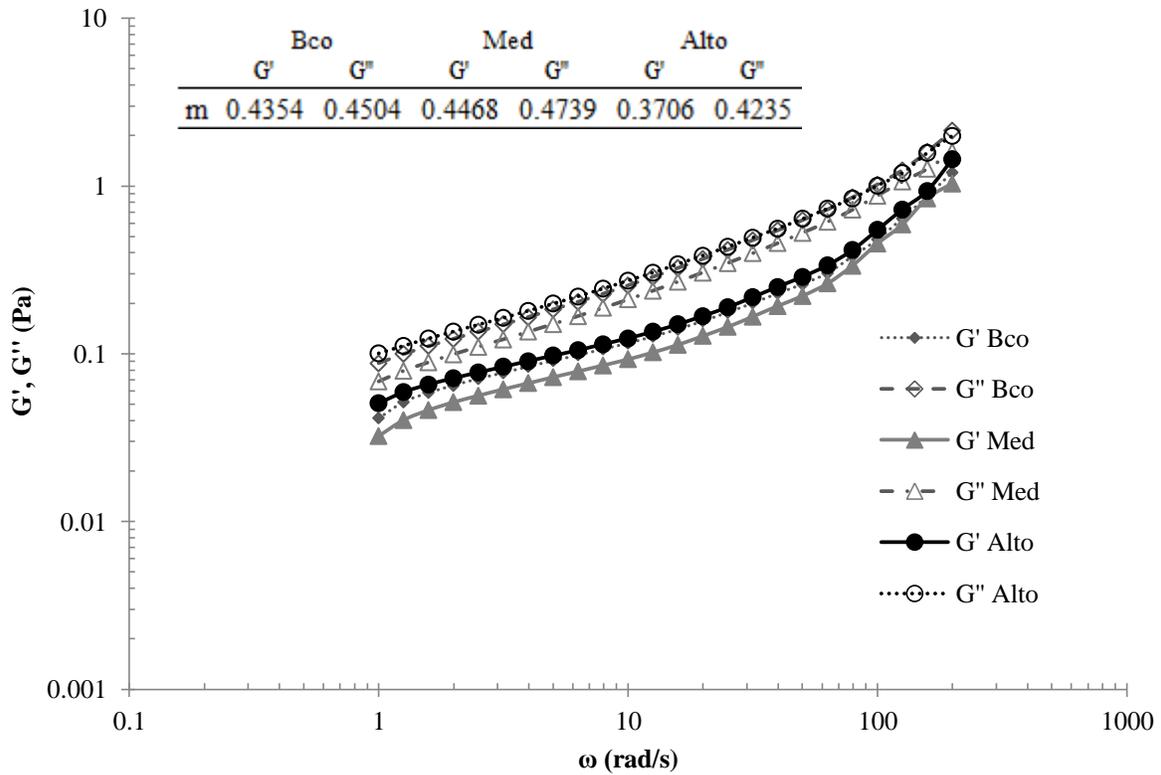


Figura 5.7. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 75 días posteriores al inicio de la dieta

Finalmente en la Figura 5.8, se observa que el comportamiento elástico es muy similar los grupos “Blanco” y “Medio”, siendo el grupo “Alto” el que menor viscoelasticidad presenta; Se puede apreciar que conforme va pasando el tiempo los módulos de todos los grupos tienden a ser cada vez más similares entre sí.

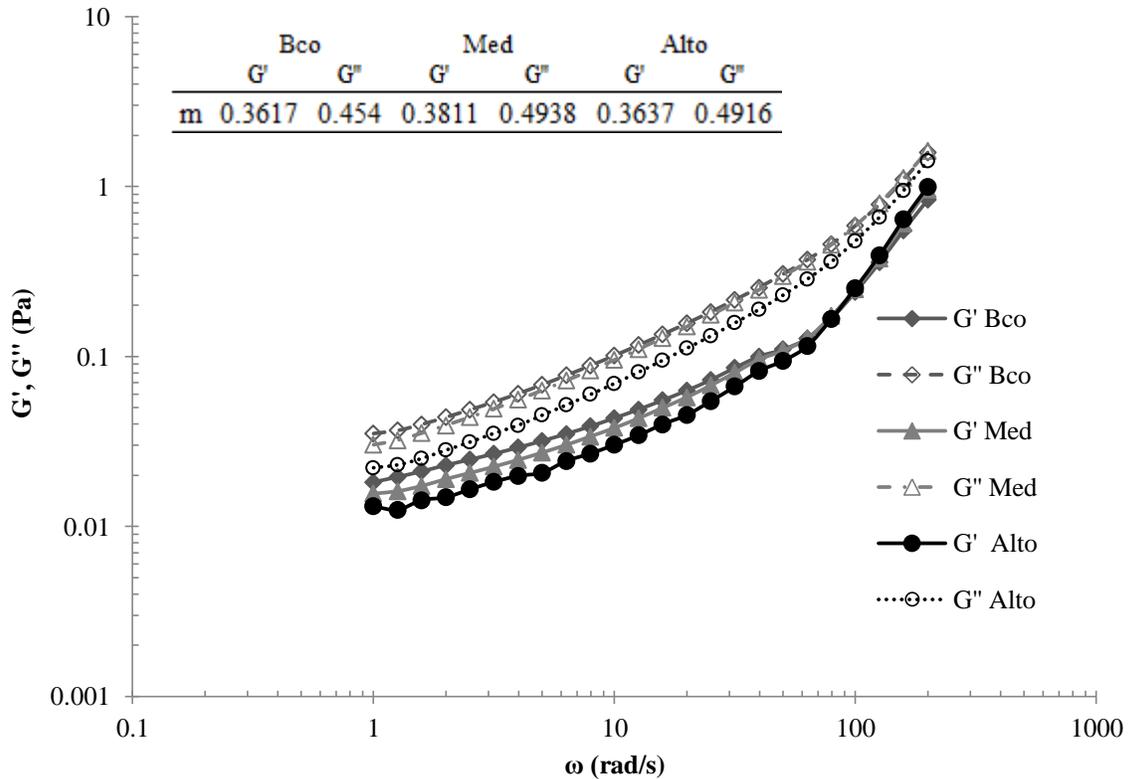


Figura 5.8. G' (Pa) y G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) a los 105 días posteriores al inicio de la dieta.

El comportamiento reológico de la sangre se presenta en la Figura 5.9, donde se muestra la evolución del módulo elástico (G') a una frecuencia constante de 1 rad/s contra el tiempo de duración de la dieta, y se observa que la magnitud del módulo elástico disminuye del día 15 al día 30, posterior al día 30 se presenta un incremento significativo, particularmente el grupo de “Alto” del día 45 y hasta el día 60 se tiene un ligero decremento, para finalmente al día 75 una nueva disminución del módulo elástico (G'). Lo anterior se puede explicar desde el punto de vista del metabolismo de las ratas, ya que se presenta la fase de almacenamiento del colesterol en tejido adiposo, y es por ello que no se observan grandes diferencias en el comportamiento de la sangre. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 5.10 donde se observó que en una de las ratas del grupo “Alto” que hay una acumulación adiposa renal.

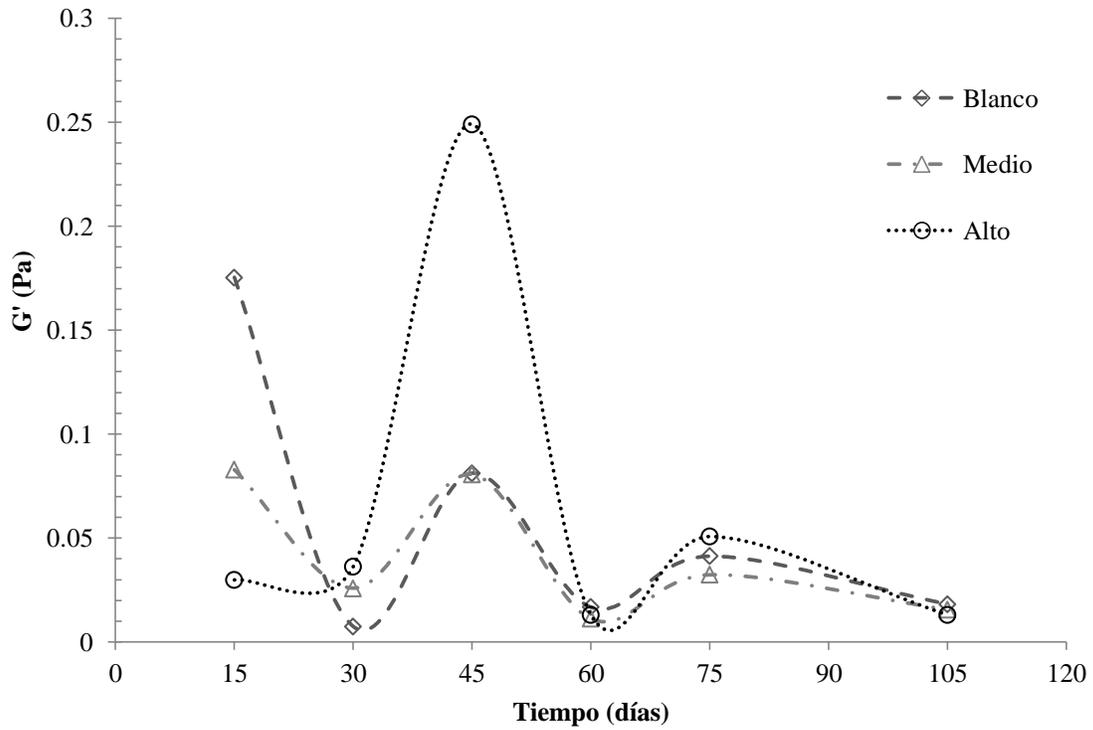


Figura 5.9. Módulo elástico G' (Pa) a $\omega_{fija} 1 \text{ rad/s}$ vs tiempo de duración de la dieta (días)

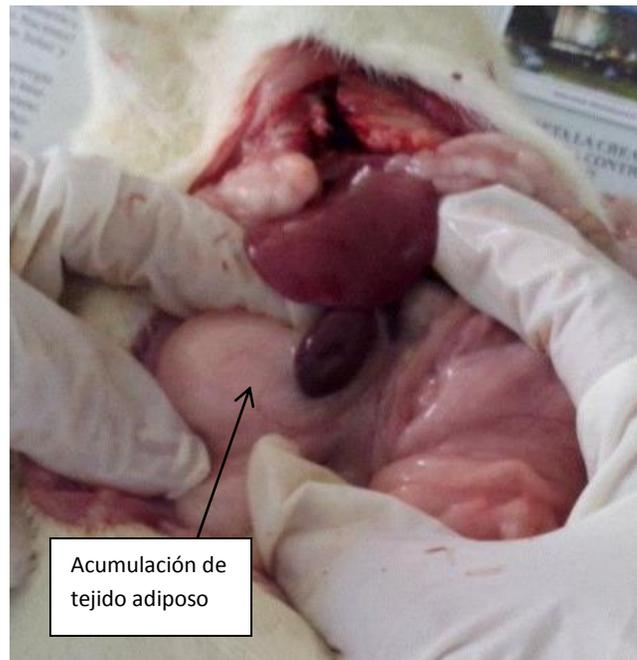


Figura 5.10. Acumulación adiposo renal de una de las ratas del grupo "Alto"

5.2 Pruebas de corte simple en estado estacionario

Las Figuras 5.11-5.15 presentan la evolución del esfuerzo de corte en las pruebas de corte simple en estado estacionario (pruebas destructivas), donde se puede apreciar que todas ellas tienen un comportamiento adelgazante al flujo ($n < 1$). Debido a que las fuerzas que mantienen a las células de la sangre interactuando se van debilitando conforme la rapidez de corte aumenta. En la zona de rapidez de corte bajo, el esfuerzo de corte sea menor que en la zona donde la rapidez de corte es mayor. Es decir, que en algunos casos suele mostrar un esfuerzo de cedencia a baja rapidez de deformación, y el esfuerzo de corte incrementa paulatinamente a medida de que aumenta la rapidez de deformación. Las curvas de flujo al corte simple se ajustan adecuadamente al modelo de la ley de potencia (n y k).

En la Figura 5.11, se observa que el esfuerzo de corte del grupo “Blanco” es mayor que la de los grupos “Medio” y “Alto”; y a su vez se muestran los parámetros reológicos obtenidos de la ley de la potencia (n y k), donde se comprueba el comportamiento adelgazante de la sangre.

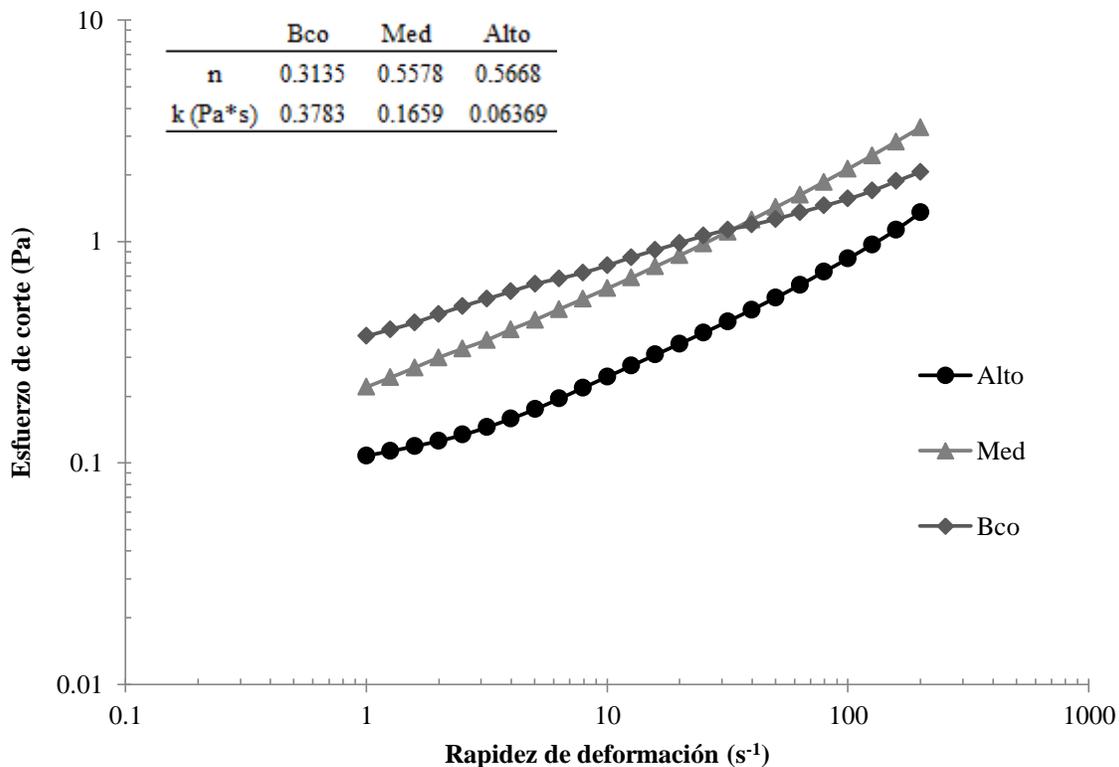


Figura 5.11. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 15 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.12, se observa que el esfuerzo de corte del grupo “Alto” predomina ligeramente sobre los otros grupos, y a una rapidez de deformación de $<10 \text{ s}^{-1}$ se alcanza a apreciar que tiene posiblemente un esfuerzo de cedencia, es decir que a ese esfuerzo aplicado la sangre comienza a tener una menor resistencia al flujo ya que comienzan a alinearse las partículas sólidas (células) contenidas en la sangre.

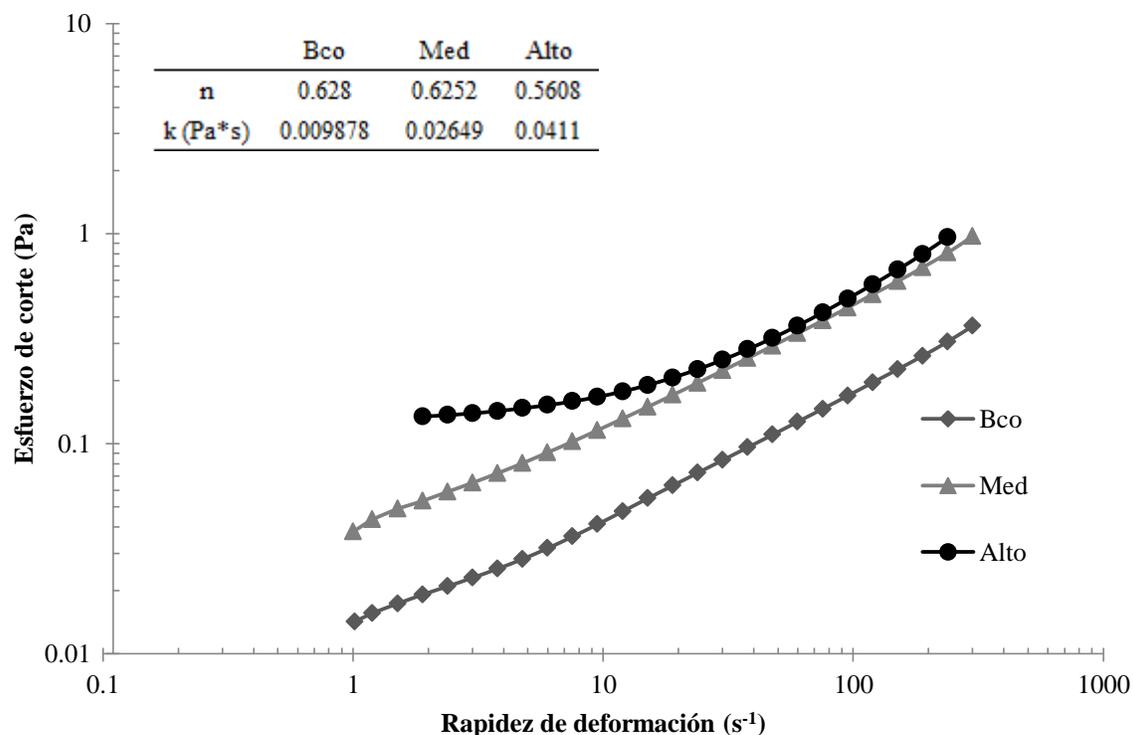


Figura 5.12. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 30 días posteriores al inicio de la dieta.

En la figura 5.13, se observa una gran predominancia del grupo “Alto” ($k >$) respecto al grupo “Blanco” “Medio” en toda la ventana de observación ($1-300 \text{ s}^{-1}$), y los últimos dos tienen un comportamiento muy similar entre sí.

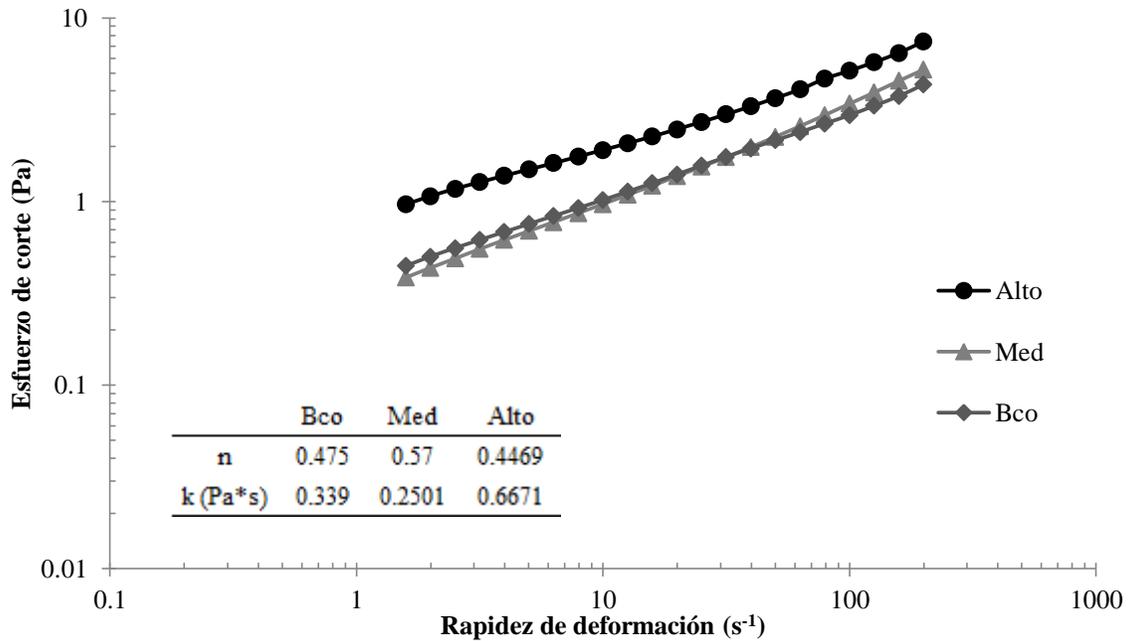


Figura 5.13. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 45 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.14, se observa que los tres grupos tienen un comportamiento similar predominando el comportamiento del grupo “Blanco” sobre el grupo “Medio” y “Alto”. Los parámetros reológicos del modelo de la ley de la potencia son muy semejante entre sí.

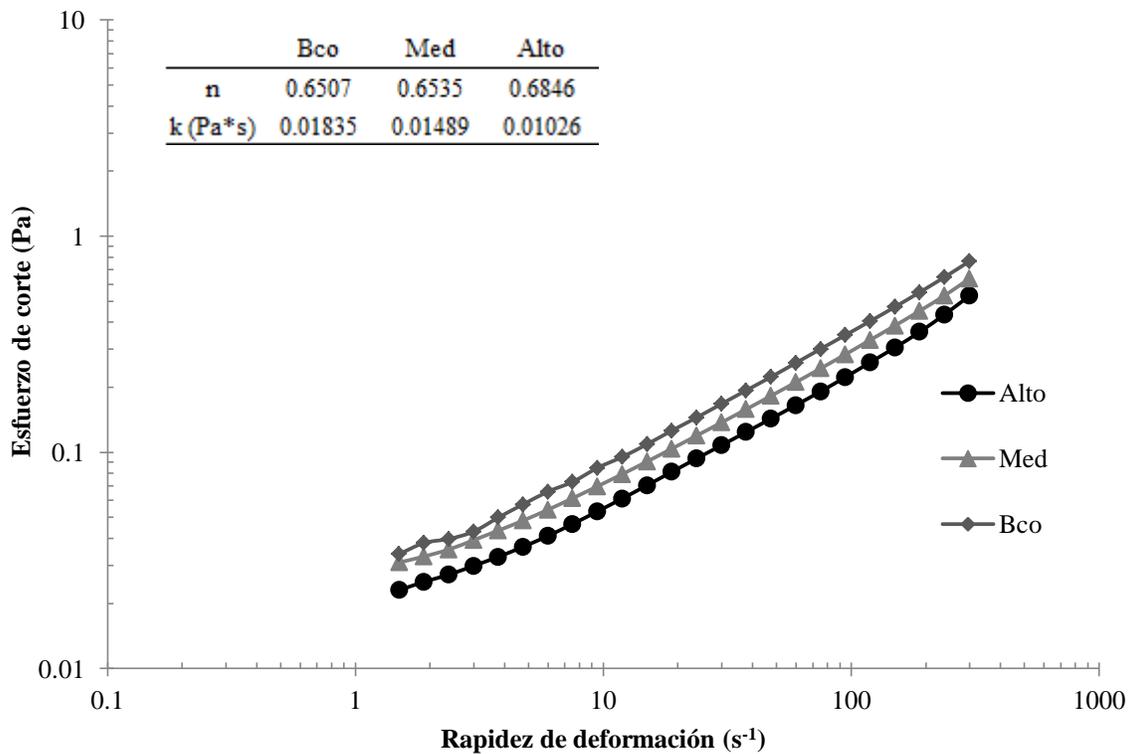


Figura 5.14. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 60 días posteriores al inicio de la dieta

En la Figura 5.15, todos los grupos tienen un comportamiento reológico muy similar, solo encontrando una pequeña diferencia en el grupo “Medio” a baja rapidez de deformación donde presenta un posible esfuerzo de cedencia a los 1 s^{-1} .

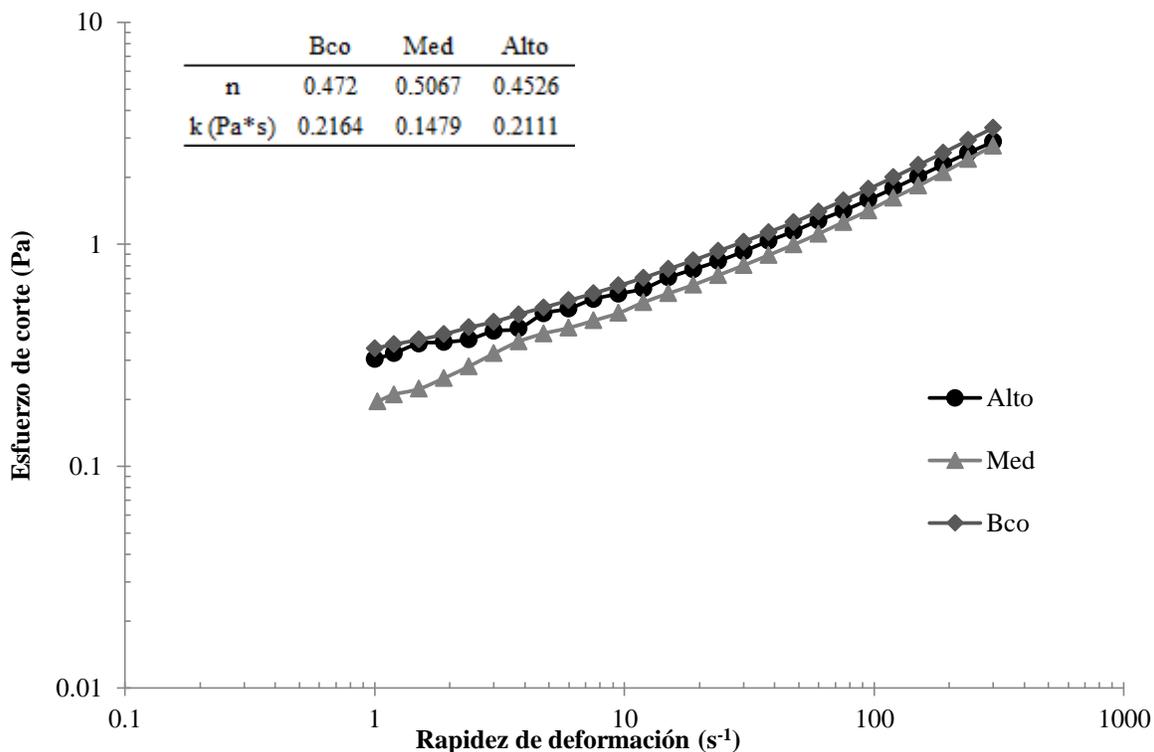


Figura 5.15. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 75 días posteriores al inicio de la dieta

Finalmente, en la Figura 5.16 se observa que el grupo “Medio” y “Blanco” tienen un comportamiento mecánico al flujo similar, y por encima del grupo “Alto”. Similar a lo reportado en las pruebas oscilatorias, que conforme va transcurriendo el tiempo el comportamiento mecánico al flujo de todos los grupos tienden a converger.

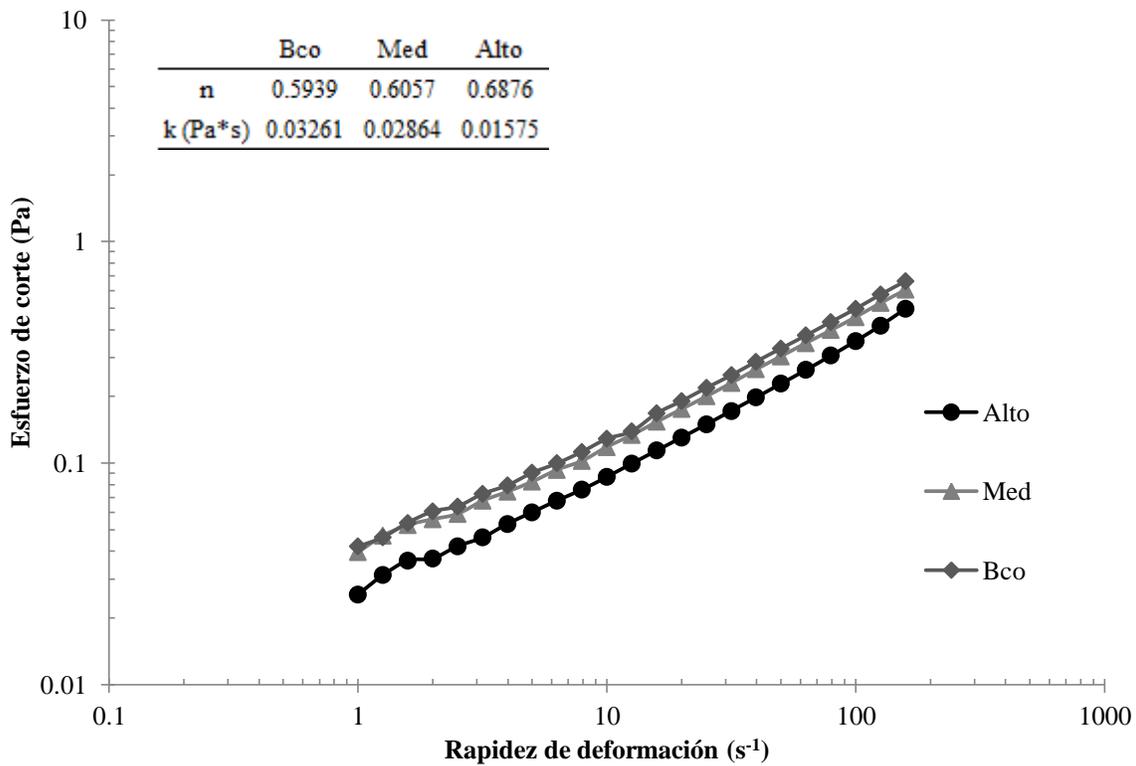


Figura 5.16. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s^{-1}) a los 105 días posteriores al inicio de la dieta

En general, en las figuras anteriormente mencionadas, se puede observar que no existe una gran diferencia entre cada grupo de ratas, y que el grupo “Alto” que ha sido alimentado con la dieta rica en grasa, no siempre tiende a tener los niveles más altos de colesterol ni tampoco tiende a ser el grupo que mayor esfuerzo de corte presenta. Para ser más evidente este efecto y las diferencias entre cada grupo se presenta la Figura 5.17 donde se compara el esfuerzo de corte a una rapidez de deformación constante ($1 s^{-1}$) a lo largo del tiempo de duración de la dieta.

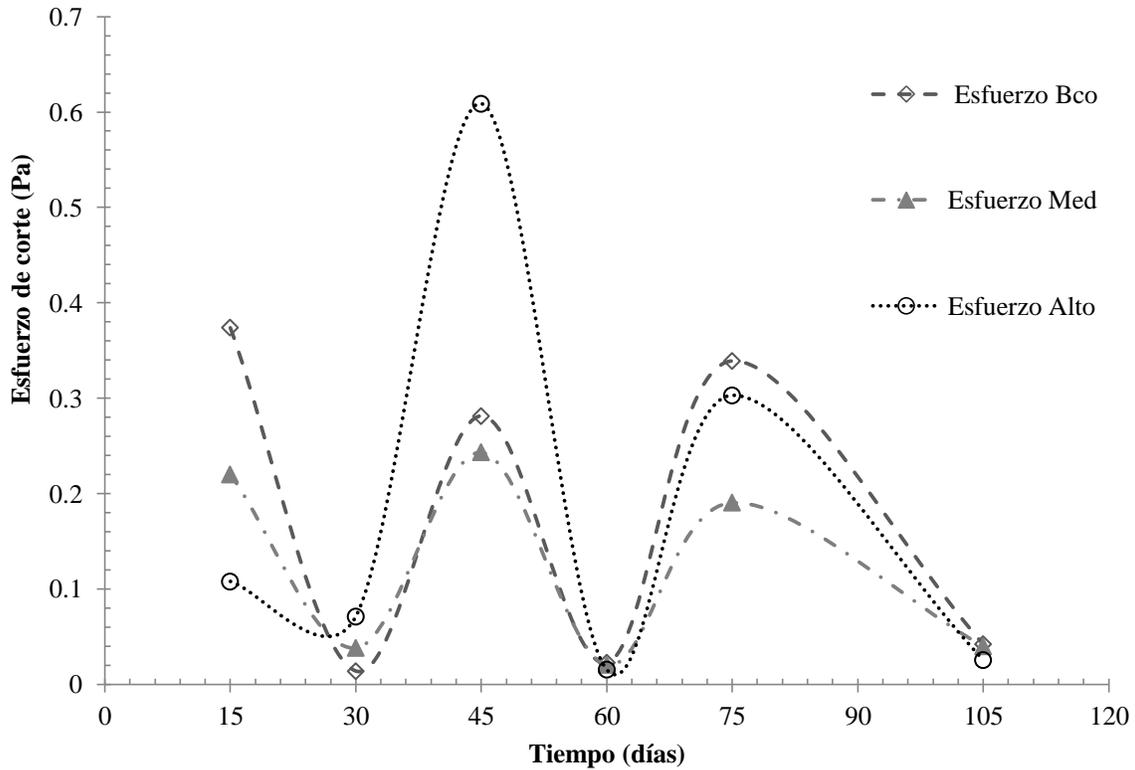


Figura 5.17. Esfuerzo de corte (Pa) a rapidez de deformación fija ($1 s^{-1}$) vs tiempo de duración de la dieta (días)

Al comparar los resultados, el nivel de colesterol de la sangre de rata con el esfuerzo de corte sin considerar el factor del hematocrito, tenemos que: a un valor alto de colesterol corresponde a un esfuerzo de corte más bajo y a un valor de colesterol bajo, corresponde un esfuerzo de corte mayor. Esto se puede ejemplificar en la Figura 5.18, donde a los 45 días posteriores al inicio de la dieta todos los grupos muestran un valor del esfuerzo de corte mayor que en cualquier otro punto; aunque de manera más significativa el grupo “Alto” que tiene un máximo esfuerzo de corte pero que a su vez presenta un nivel de colesterol menor que en cualquier otro punto. De lo anterior se infiere que de manera significativa, las diferencias entre el esfuerzo de corte y el nivel de colesterol tienen una variable que no ha sido determinada hasta el momento para ratas, como lo es el hematocrito.

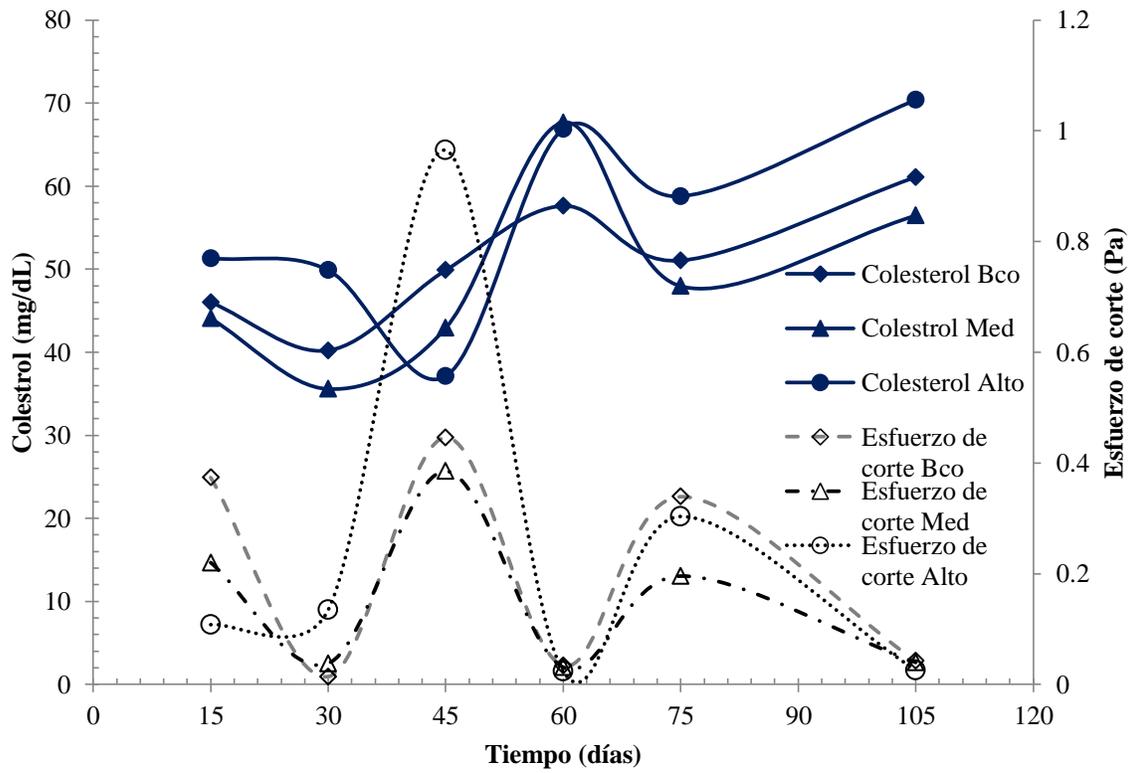


Figura 5.18. Nivel de Colesterol (mg/dL), Esfuerzo de corte (Pa) a una rapidez de deformación fija ($1s^{-1}$) vs Tiempo de duración de la dieta (días)

5.3 Análisis del hematocrito

Debido a lo anterior, se decidió hacer las mismas pruebas reológicas con diluciones de hematocrito de 20, 40, 60, 80 y 100 (%); con un nivel de colesterol constante de 38.6 mg/dL, para determinar la variación existente con respecto al hematocrito y el colesterol. De los resultados obtenidos, se puede afirmar que: en las pruebas de pequeña amplitud de deformación (Figura 5.19) predomina el módulo viscoso (G'') sobre el módulo elástico (G') para todas las diluciones, lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente con el “*pull*” de las muestras de sangre de rata obtenidas durante el tiempo de duración de la dieta, el módulo elástico como el viscoso tienen significativas variaciones dependientes de la concentración de la dilución; a mayor hematocrito los módulos viscoelásticos tienden a tener un valor mayor. Por otro lado, en las pruebas de corte simple en estado estacionario (Figura 5.20) se observa que tiene un comportamiento adelgazante ($n < 1$) y es clara la dependencia que tiene el hematocrito y el esfuerzo de corte de la sangre, esto quiere decir que a mayor hematocrito mayor esfuerzo de corte de la sangre debido al efecto de la concentración de células contenidas en la misma, ya que tienden a adherirse entre sí formando columnas denominadas rouleaux.^[17]

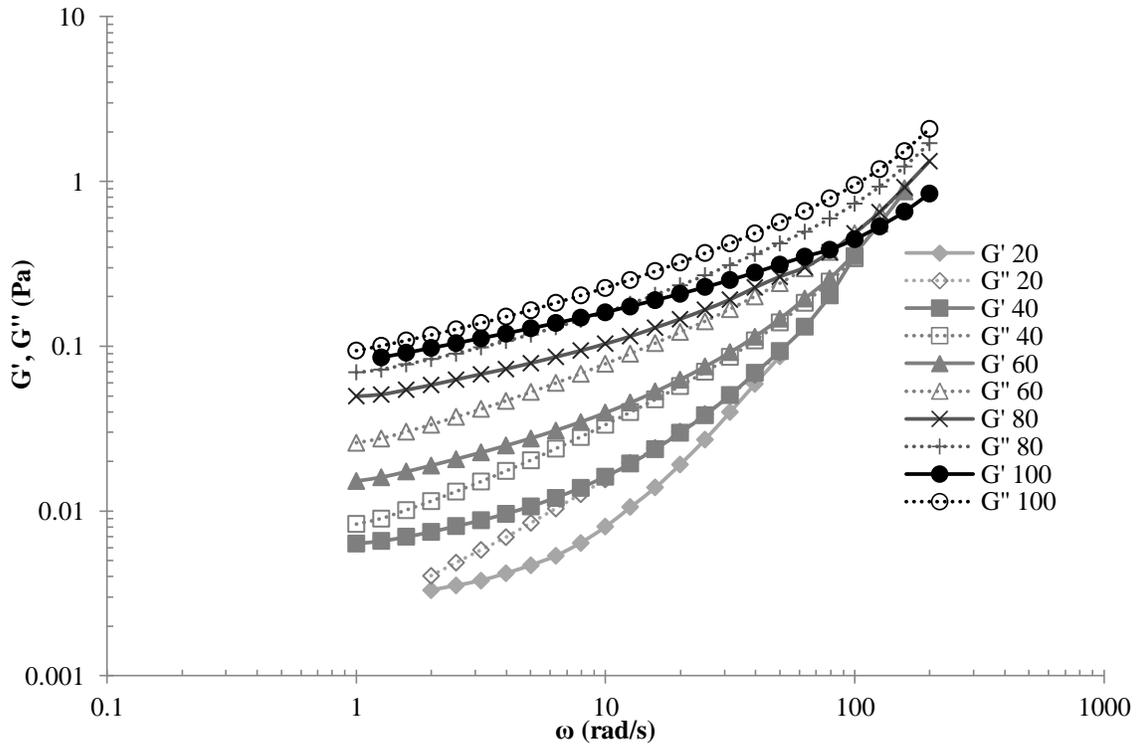


Figura 5.19. G' , G'' (Pa) vs Frecuencia angular ω (rad/s) de diluciones con diferente hematocrito (20, 40, 60, 80 y 100%) a nivel de colesterol constante de 38.6mg/dL.

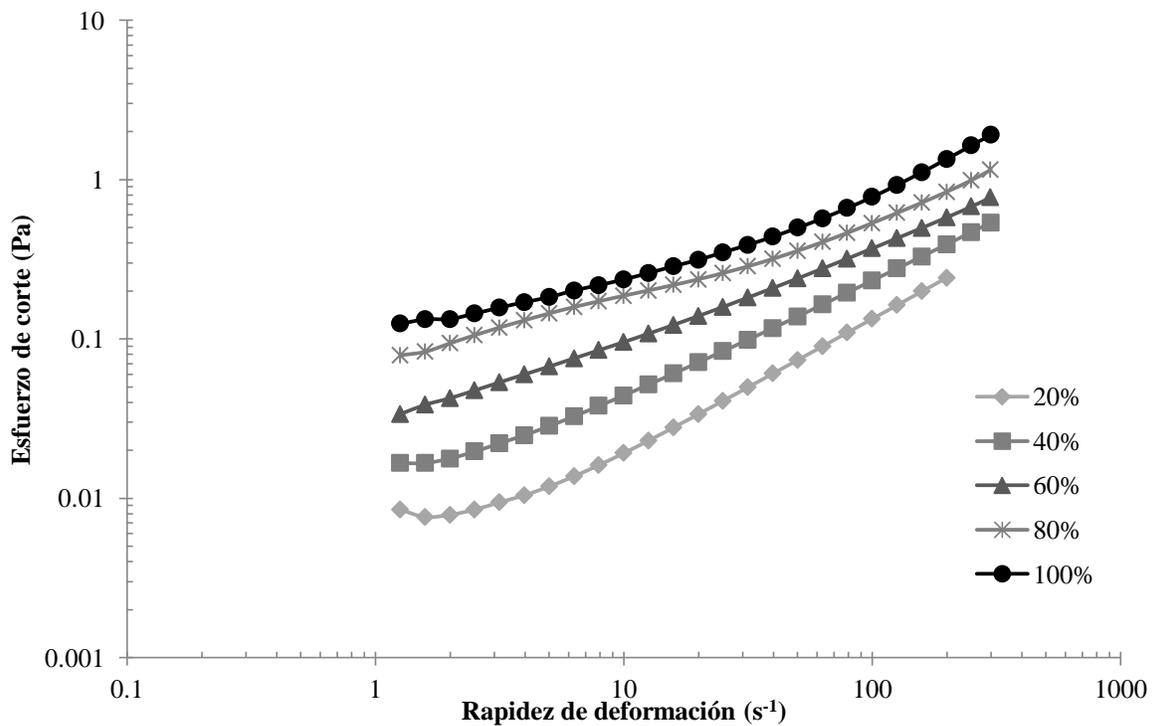


Figura 5.20. Esfuerzo de corte (Pa) vs Rapidez de deformación (s⁻¹) de diluciones con diferente de hematocrito. (20, 40, 60, 80 y 100) y nivel de colesterol constante de 38.6mg/dL

Así pues, se observa que la concentración de las células tiene una dependencia directamente proporcional con los módulos elástico y viscoso, así como con el esfuerzo de corte. Por lo anterior, se decidió analizar las muestras de sangre obtenidas y determinar el hematocrito contenido en cada una de ellas y se obtuvo los siguientes resultados (Tabla 5.2 y Figura 5.21).

Grupo /Tiempo (días)	15	30	45	60	75	105
Blanco	60	53.48	51.42	54.3	67.74	60.41
Medio	53	65.51	51.1	56.8	64.28	58.13
Alto	46.5	53.33	41.46	59.37	61.53	59.09

Tabla 5.2. Concentración de hematocito (%) durante el tiempo de duración de la dieta de los tres diferentes grupos

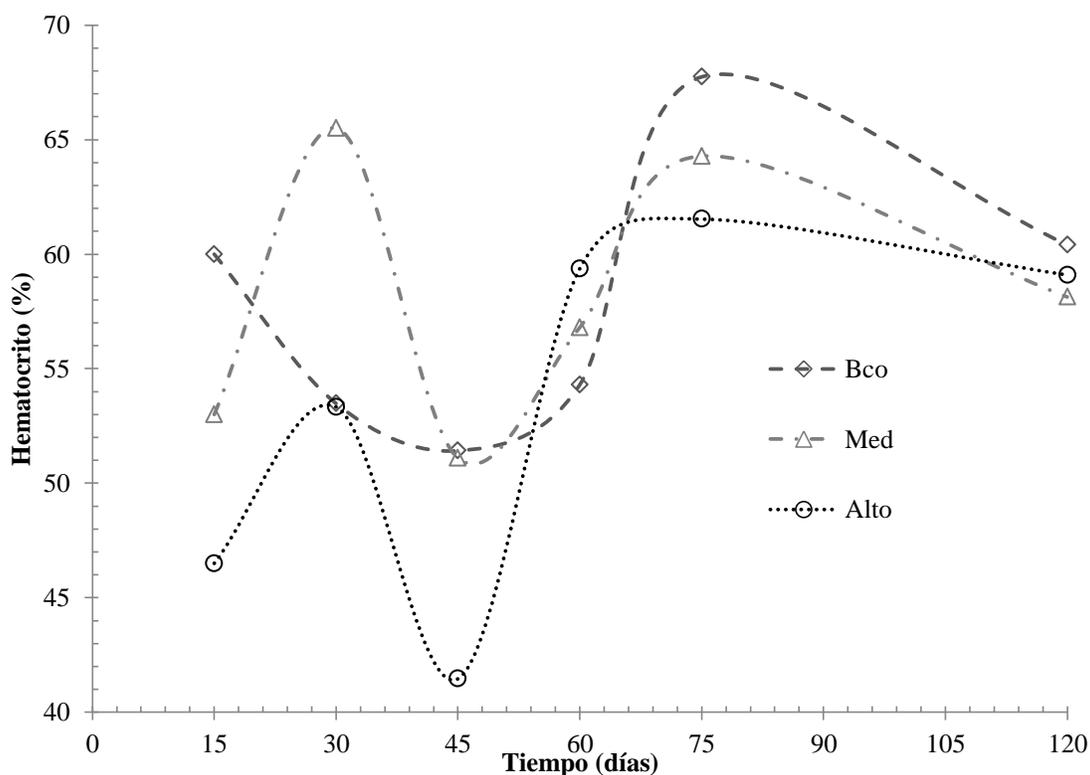


Figura 5.21. Hematocrito (%) vs Tiempo de duración de la dieta (días)

Estos resultados al compararlos con las hemorreologías obtenidas del “pull” de los diferentes grupos de ratas durante el tiempo de duración de la dieta tenemos que, los resultados sin hacer las consideraciones del hematocrito si se ven afectados ya que como se mencionó anteriormente existe una relación directa con el contenido del mismo, al hacer el análisis de hematocrito en las muestras tenemos; que en la mayoría de estas, el grupo

Blanco es quien tiene el mayor porcentaje de hematocrito en la sangre, pero un nivel de colesterol menor. Lo anterior explica porque este grupo es el que presenta los mayores módulos viscoelásticos y valores de viscosidad de corte en casi todas las muestras de sangre analizadas en la fase experimental. Es decir, al día 45 posterior al inicio de la dieta, resulto tener un esfuerzo de corte mayor el grupo “Alto”, con mayor hematocrito y a su vez una cantidad menor de colesterol (Figura 5.22), esto puede ser atribuido como ya se mencionó previamente a el estrés oxidativo de la sangre presente ^[17] ya que los eritrocitos son los encargados de transportar el oxígeno a los tejidos y al haber en la sangre mayor contenido de colesterol incide en el daño de los componentes celulares; por ende esto ocasiona una deformación de las células o bien que propicie a la formación de ateromas, disminuyendo así la cantidad de células presentes en la sangre. También se comparó el porcentaje de hematocrito con el esfuerzo de corte a una rapidez de deformación fija de 1 s^{-1} , donde observamos que si son congruentes nuestros resultados hemorreológicos debido a su dependencia con el hematocrito (Figura 5.23).

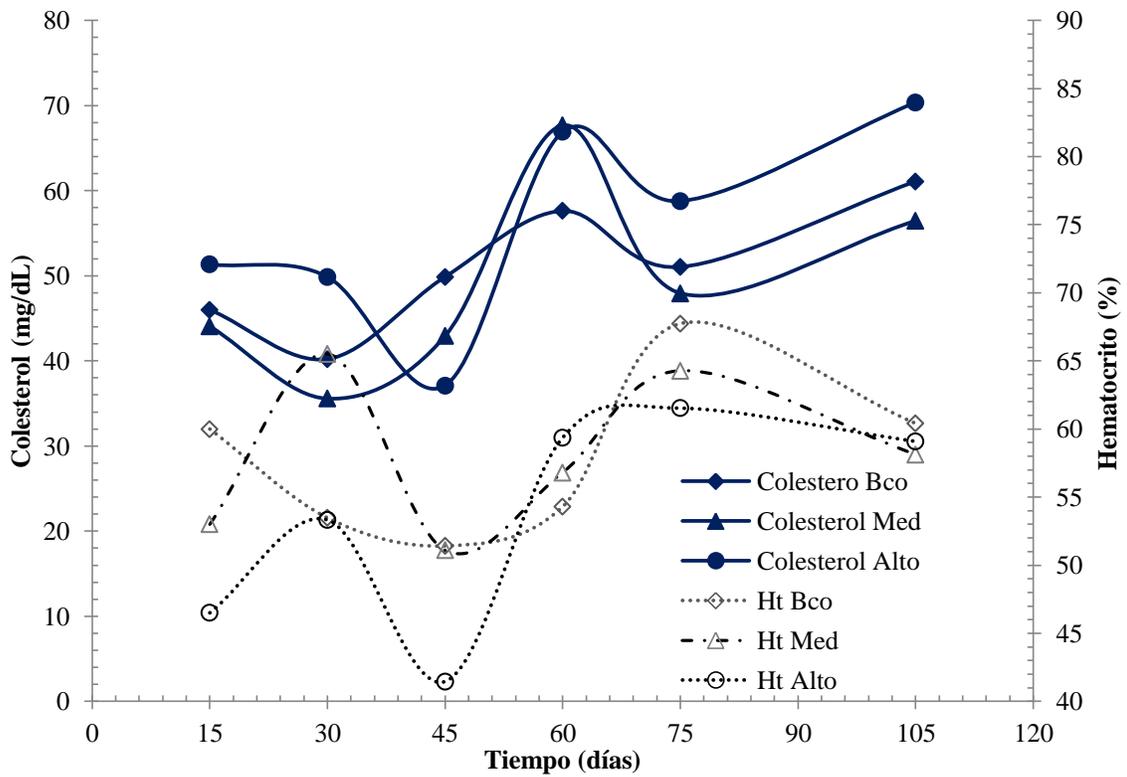


Figura 5.22. Nivel de colesterol (mg/dL), Hematocrito, Ht (%) vs tiempo de duración de la dieta (días)

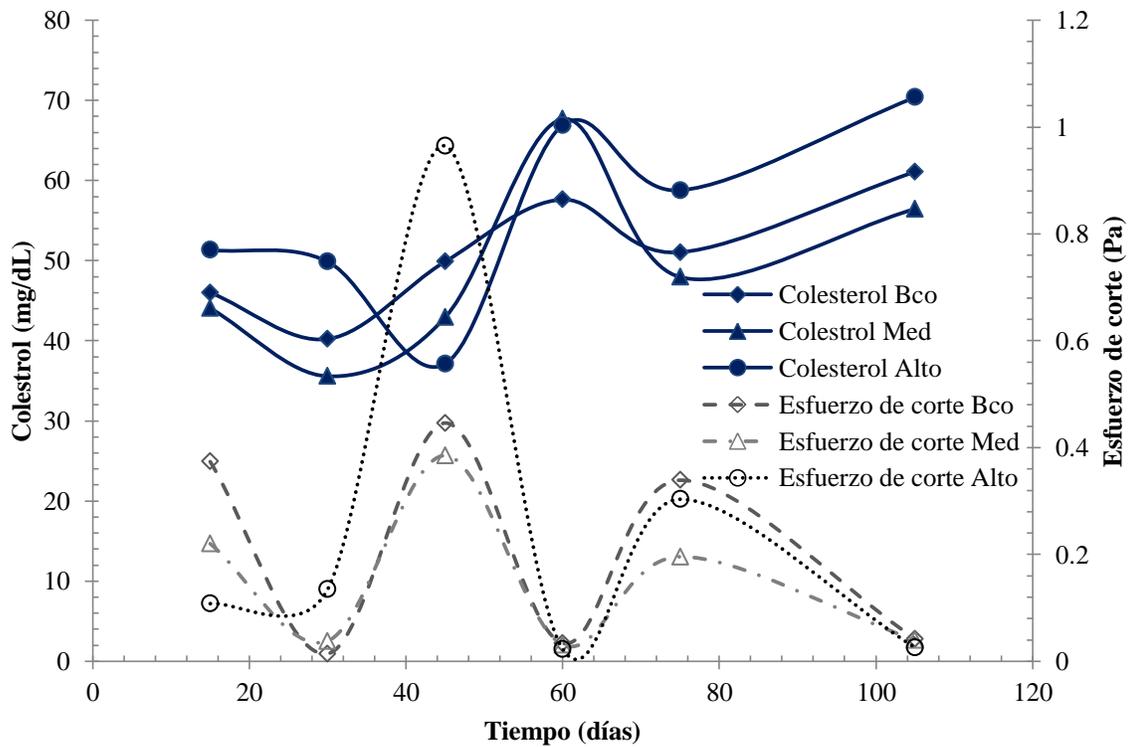
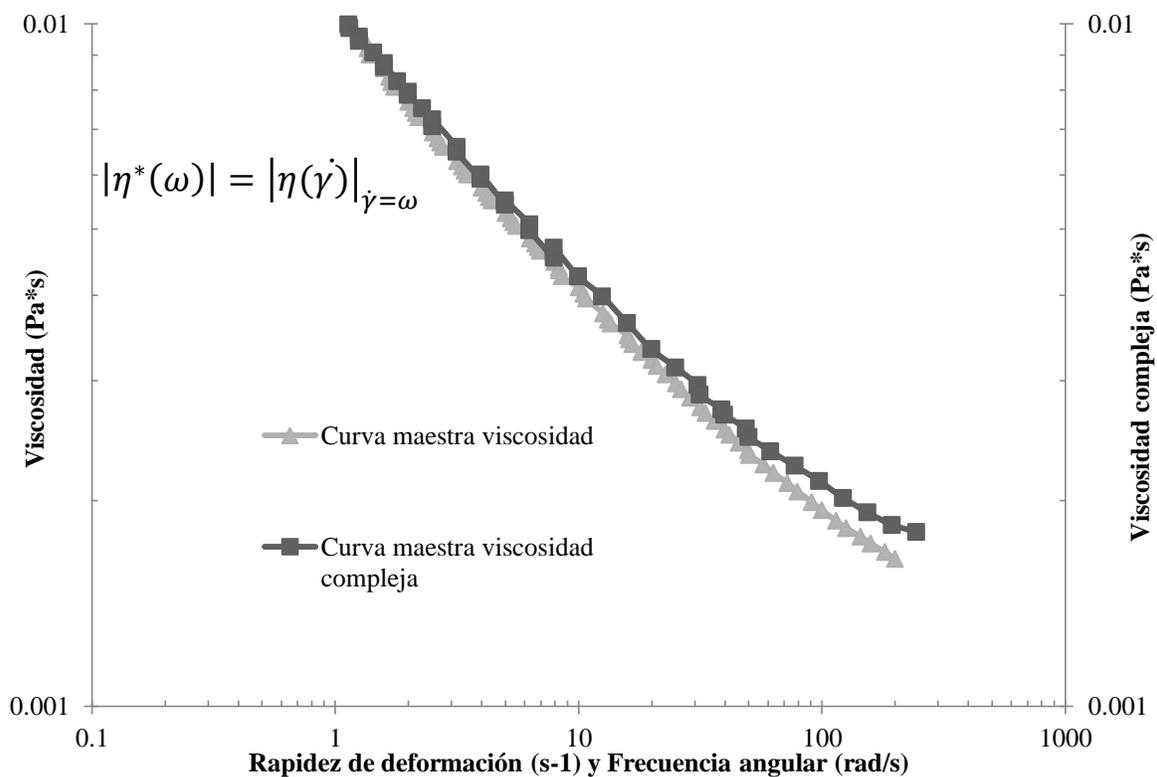


Figura 5.23. Nivel de colesterol (mg/dL), esfuerzo de corte fijo ($1 s^{-1}$) vs tiempo de duración de la dieta (días)

5.4 Curvas maestras (concentración-tiempo)

Finalmente, se aplicó en este tipo de sistemas una doble superposición de concentración-tiempo, realizando curvas maestras de sangre de rata en las pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación y de corte simple en estado estacionario (Figura 5.24). La sangre utilizada de referencia mantiene un nivel de colesterol total constante (38.6 mg/dL), y las variaciones de hematocrito son de 20-100%. En una zona de baja rapidez de deformación, la viscosidad cortante y la viscosidad compleja se empatan. Es decir, la estructura interna del fluido permanece estable; la magnitud de las interacciones transitorias es mayor que el esfuerzo aplicado. A una rapidez de deformación aproximadamente $> 10 \text{ s}^{-1}$, el comportamiento de las curvas comienza a separarse, esto se debe a que se sobre pasa el esfuerzo mínimo en el cual las interacciones son estables. Se hace evidente que la regla de Cox Merz se cumple a bajos flujo. Esta regla establece que la dependencia de la rapidez de deformación de la viscosidad compleja $|\eta^*|$ en estado estable es igual a la dependencia de la frecuencia angular de la viscosidad η .



*Figura 5.24. Curvas maestras de la sangre de ratas Wistar, Viscosidad (Pa*s), Viscosidad compleja (Pa*s) vs rapidez de deformación (s⁻¹) frecuencia angular (rad/s); dependientes de la concentración de hematocrito a colesterol constante (38.6 mg/dL). Tomando como referencia el hematocrito de 40%*

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existen cambios en el nivel de colesterol en la población de estudio, los que pueden estar asociados a:

- 1) El metabolismo de las ratas ya que este es muy acelerado y solo ingieren la cantidad de alimento que requiere el cuerpo para satisfacer sus necesidades.
- 2) La formación de ateromas en distintas partes del cuerpo de las ratas, esto hace que los excesos del nivel de colesterol no se vean reflejados en la cantidad de colesterol presente en la sangre.
- 3) Al estar las ratas en grupo y tener un único sitio de alimentación, existe competencia por el alimento provocando que unas consuman una cantidad mayor que otras, de esto deriva que en el mismo grupo hubiera ratas que tienen un menor o mayor peso que la mayoría de las ratas. Lo anterior influye de manera significativa en los resultados del nivel de colesterol ya que se trabajó con “pulls” de la sangre de rata.

La sangre independientemente de la especie y del nivel de contenido de colesterol es un fluido complejo, de tipo adelgazante al flujo ($n < 1$), con posible esfuerzo de cedencia; así como en todo momento $G'' > G'$, es decir que la sangre presenta propiedades viscosas predominantes sobre las elásticas. Particularmente la sangre de rata del grupo Alto, posee un comportamiento *pseudo-sólido*; el cual puede estar asociado a interacciones fisicoquímicas de las moléculas de colesterol presentes en el medio sanguíneo durante tiempos largos. El comportamiento que se aprecia en las hemorreologías está asociado directamente con la correlación: colesterol total-hematocrito.

Las evaluaciones hemorreológicas y bioquímicas resultan eficaces para establecer patrones de manera cualitativa y cuantitativa de la estructuración sanguínea con diversos niveles de colesterol dentro de este tipo de sistemas biológicos.

Es posible establecer el contenido de hematocrito en la sangre, conforme a las curvas maestras de superposición **tiempo-concentración** desarrolladas en este estudio.

Hay variaciones del comportamiento reológico de la sangre de rata, por lo cual es posible determinar mediante un método mecánico el nivel de colesterol en sangre; Aunque aún es necesario realizar un estudio similar con mamíferos más grandes, que tengan el metabolismo con una mayor similitud a la del humano, este método mecánico ya está preestablecido para humanos tal como lo reporta Moreno 2013, y se podría aplicar en un futuro inmediato.

Este estudio hemorreológico en sistemas biológicos complejos, permite establecer bases para el futuro diseño y aplicación de fármacos en fluidos con características reológicas

idénticas a las de la sangre: Fluidos nutrimentales endovenosos (para problemas digestivos que provocan cáncer), diseño de apósitos, aplicación de nanopartículas cargadas con principios activos a sangre con alto colesterol, etc. Estas enfermedades tienen un gran índice de incidencia en México y el empleo de este método representaría un gran avance para el país en cuanto a medicina preventiva confiere.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Owens, G. H. T. a. D. (2012). LDL as a Cause of Atherosclerosis. The Open Atherosclerosis &Thrombo.
- [2] Colpo, A. (2005). LDL Cholesterol: Bad Cholesterol, or Bad Science? Journal of American Physicians and Surgeons.
- [3] <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf> consultado 9 dic 2013.
- [4] Chávez A.; Noguez N.; Rubio A.; Burgos D.; Reología y sistemas farmacéuticos Asociación Farmacéutica de México A.C.
- [5] Mackosco C. (1993) RHEOLOGY Principles, Measurements and Applications. Wiley-VCH.
- [6] Baskurt O., Hardeman M., Rampling M., Meiselman H.; Handbook of Hemorheology and hemodynamics. Vol. 69.
- [7] Savari, D. F. ETAS Hemodinámica. (2007); Cap. 11 p 113-131.
- [8] Cossio M., Gómez R., Vargas R. (2013) Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de las ratas de machos Wistar. Nutrición Hospitalaria.
- [9] Ortega, R. M. Importancia de las grasas en la alimentación. Departamento de Nutrición: Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid.
- [10] Paredes, et. al.(2009) Efectos de la ingestión de una dieta con alto contenido en grasas en ratas Wistar crónicamente infectadas con Trypanosomacruzi.Kasmera.
- [11] Hill R, Wyse G, Anderson M. (2006) Alimentos, energía y temperatura. Fisiología animal. Ed Madrid: Panamericana editorial; p 106.
- [12] Soler W., Angarit B., Corredor C. (1986) Efecto de la dieta sobre lípidos de la sangre y el hígado en ratas. Salud Uninorte.
- [13] Giles R. Cokelet and Herbert J. Meiselman, (2007) Basic Aspects of Hemorheology. Department of Chemical and Biological Engineering, Montana State University, Bozeman.
- [14] Barnes, H. A. (2000) A hand book of elementary rheology.
- [15] Casafont, L. B.(1977) Comportamiento Reológico de la sangre y plasma humanos.

- [16]Moreno L. (2013) Efecto conjunto del colesterol, triglicéridos y glucosa en comportamiento reológico de la sangre humana. TESIS. Instituto de Investigaciones de Materiales, UNAM.
- [17]Céspedes T., Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado oxidante y la terapia de suplementación. Revista Cubana Cardiol
- [18]Meiselman, O. (2003) Blood Rheology and Hemodynamics. Seminars in Thrombosis and Hemostasis.
- [19]Galdi G., Rannacher R., Robertson A., Turek S. Hemodynamical Flows. Modeling, Analysis and Simulation. Oberwolfach Seminars Vol. 37