



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN
GLOBULAR DE SANGRE ENTERA USANDO
LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA PULSADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

P R E S E N T A :

MARCO POLO COLÍN GARCÍA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ARGELIA PÉREZ PACHECO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020



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.

1. Datos del alumno

Colín
García
Marco Polo
dreizehn@ciencias.unam.mx

55 3215 8420
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Física
308072565

2. Datos de la tutora

Dra.
Argelia
Pérez
Pacheco
argeliapp@ciencias.unam.mx

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Rosalba
Castañeda
Guzmán
rosalba.castaneda@icat.unam.mx

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Rosa María
Quispe
Siccha
rosa.quispe@gmail.com

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Gerardo
Gutiérrez
Juárez
ggutj@fisica.ugto.mx

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Ernesto
Marín
Moares
emarin63@yahoo.es

7. Datos del trabajo escrito

Velocidad de Sedimentación
Globular de Sangre Entera
usando la Técnica Fotoacústica
Pulsada

92 p

2020

Agradecimientos

Dra. **Argelia Pérez Pacheco**, le agradezco y aprecio por aceptarme y concederme la oportunidad de ser su aprendiz, por permitirme conocer los distintos e interesantes campos del conocimiento en los que trabaja tan emotivamente. Muchas gracias por enseñarme, asesorarme, guiarme, corregirme y sobre todo por dedicarme de la manera más amable su tiempo durante la realización de este trabajo. Gracias por ser mi maestra, siempre me sentiré en deuda con usted.

También agradezco al resto del equipo de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico por haber puesto a mi disposición los medios para llevar a cabo esta tesis, en especial al Dr. Adolfo Pérez García quien estuvo dispuesto a orientarme atentamente en el desarrollo e interpretación del análisis estadístico, así también a la Dra. Rosa María Quispe Siccha y el Dr. Roberto Márquez Islas quienes me ayudaron en ocasiones con sus valiosos comentarios. Y sin dejar de lado a la futura física Flor del Carmen Cortés Ortégón, que más que mi compañera fue una amiga con quien realicé la totalidad de las mediciones de esta tesis. Finalmente, fue un privilegio tener como sinodales a personas tan reconocidas en el campo de la Fotoacústica, quienes me aportaron excelentes comentarios en la última etapa de este proceso, les agradezco mucho Dr. Gerardo Gutiérrez Juárez, Dr. Ernesto Marín Moares, Dra. Rosa María Quispe Siccha y Dra. Rosalba Castañeda Guzmán. Gracias a todos ustedes he dado un paso más en la comprensión general de este trabajo.

Además, agradezco al Banco de Sangre y al Laboratorio de Hematología Especializada del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" por cooperar y proporcionar sin inconveniente las muestras de sangre suficientes para la realización de este estudio de investigación.

Resumen

En este trabajo se propone un método alternativo para una de las pruebas de laboratorio clínico frecuentemente solicitada para diagnóstico médico, la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG). En este estudio piloto se obtienen las velocidades de sedimentación eritrocitaria a través de dos métodos ejecutados simultáneamente: Método Visual (MV) y Método Fotoacústico (MF), para cuatro grupos de sangre entera humana, clasificada como: Sana, Anemia Hemolítica y Dislipidemia de grado 3 + y 4 +. Los grupos fueron clasificados de acuerdo con la valoración clínica y en el caso de las dislipidemias según lo valorado por el observador.

En el Método Visual, nombrado así en este trabajo (donde se midió el tiempo transcurrido y la distancia recorrida por la interfaz plasma-eritrocito durante su descenso dentro de una celda) se analizó estadísticamente la VSG para cada grupo, encontrando diferencias significativas entre ellos. En el Método Fotoacústico, se emplea la Técnica Fotoacústica (TFA) pulsada, para obtener la VSG a través del análisis de la amplitud de las señales eléctricas correspondientes a un monitoreo de la sangre en función del tiempo de sedimentación eritrocitaria. Esto se realizó utilizando un láser pulsado Nd-YAG con una longitud de onda de 532 nm y un sensor piezoeléctrico PVDF. A través del Método Fotoacústico se obtuvieron las curvas relacionadas con este fenómeno (curvas sigmoideas características de cada grupo de sangre), así como también los tiempos asociados a las tres etapas de la sedimentación eritrocitaria: 1) fase de agregación, 2) fase de precipitación y 3) fase de empaquetamiento.

El método propuesto permite distinguir diferencias entre un mismo grupo de pacientes debido al tamaño, forma y distribución de los eritrocitos, así como discriminar si la VSG es un parámetro relevante o no en las dislipidemias. Este trabajo busca contribuir en el área clínica para el estudio de la sangre usando técnicas alternativas que permitan diseñar en un futuro dispositivos para el diagnóstico médico claro y oportuno.

Contenido

Agradecimientos.....	I
Resumen	II
Contenido.....	III
Lista de acrónimos.....	VI
Introducción	1
1. Técnica Fotoacústica (TFA)	4
1.1. Revisión Histórica de la TFA.....	4
1.2. Efecto Fotoacústico.....	7
1.3. Técnica Fotoacústica.....	7
1.3.1. Detección de Ondas Fotoacústicas.....	9
1.3.2. Mecanismos de generación de la Señal Fotoacústica.....	10
1.3.3. TFA Pulsada.....	11
1.4. Aplicaciones de la TFA.....	13
1.4.1. Procesamiento de imágenes.....	13
1.4.2. Distribución de fármacos en la piel.....	15
1.4.3. Detección de contaminantes.....	15
1.5. Ventajas de la TFA.....	16
2. Sangre: componentes, funciones y trastornos	17
2.1. Sangre.....	17
2.2. Componentes de la Sangre entera.....	17
2.2.1. Plasma sanguíneo.....	18
2.2.2. Elementos corpusculares.....	19
2.2.2.1. Eritrocitos.....	19
2.2.2.2. Leucocitos.....	22
2.2.2.3. Plaquetas.....	22
2.3. Funciones de la Sangre.....	22
2.4. Trastornos de la Sangre.....	23
2.4.1. Anemia.....	24
2.4.2. Dislipidemia.....	25

3. Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)	26
3.1. Revisión Histórica de la prueba VSG.....	26
3.2. Velocidad de Sedimentación Globular	27
3.2.1. Fenómeno de Rouleaux.....	28
3.2.2. Fases de la VSG.....	30
3.3. Métodos manuales para la prueba VSG	31
3.3.1. Método de Westergren.....	31
3.3.2. Método de Wintrobe	32
3.3.3. Valores normales de referencia de la VSG.....	33
3.4. Factores que alteran la VSG.....	33
3.5. Limitaciones de la prueba VSG.....	34
3.6. Ley de Stokes.....	36
3.6.1. Sedimentación de eritrocitos sin agregación.....	39
3.6.2. Sedimentación de eritrocitos con agregación.....	40
4. Metodología	42
4.1. Equipo básico	42
4.1.1. Láser Pulsado Nd-YAG	42
4.1.2. Osciloscopio digital.....	43
4.1.3. Sensor piezoeléctrico PVDF.....	43
4.1.4. Fotodiodo	45
4.1.5. Celda de cuarzo	46
4.2. Muestras: Preparación.....	46
4.3. Arreglo experimental	48
4.4. Procedimiento General	49
5. Resultados y Análisis	52
5.1. VSG con Método Visual (MV).....	52
5.1.1. Tabla de Datos	52
5.1.2. Datos descriptivos MV.....	54
5.1.3. Prueba de normalidad.....	54
5.1.4. ANOVA de un factor.....	56
5.2. VSG con Método Fotoacústico (MF).....	59
5.2.1. Espectros de Absorción.....	59

5.2.2. Señal Fotoacústica de Sangre entera.....	61
5.2.3. Monitoreo de Sedimentación eritrocitaria con MF.....	62
5.2.4. Curvas características por grupo de sangre.....	65
5.2.5. Fases de la VSG con MF	70
Conclusiones	76
Trabajo Futuro.....	78
Anexos.....	79
A. Velocidad del sonido en Sangre entera.....	79
B. Estimación de VSG basada en Ley de Stokes	81
C. Correlación de la VSG con MV y MF	84
Referencias.....	88

Lista de acrónimos

FA: Fotoacústica

GB: Glóbulos blancos o leucocitos

GR: Glóbulos rojos o eritrocitos

HGM: Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

ICSH: Comité Internacional de Estandarización en Hematología

LHE: Laboratorio de Hematología Especializada

MV: Método Visual

MF: Método Fotoacústico

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

TFA: Técnica Fotoacústica

UIDT: Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico

VCM: Volumen Corpuscular Medio

VSG: Velocidad de Sedimentación Globular

Introducción

En su afán por descubrir nuevas formas de transmitir el sonido, Alexander Graham Bell se encontró con el *efecto fotoacústico*. Él notó que al iluminar una muestra con radiación modulada en una cámara cerrada, era posible detectar ondas de sonido. Sin embargo, en aquella época este descubrimiento no tomó mayor importancia debido a que no se disponía de fuentes luminosas monocromáticas intensas, ni detectores apropiados, y mucho menos del marco teórico por medio del cual relacionar el fenómeno físico a propiedades involucradas de la materia [1]. El gran resurgimiento se dio hasta la década de 1970, cuando Rosencwaig y Gersho desarrollaron una teoría para explicar este fenómeno físico a partir de la solución de las ecuaciones diferenciales de difusión de calor en los diferentes medios involucrados, denominado modelo de Rosencwaig-Gersho [2].

El efecto fotoacústico es la base de la *Técnica Fotoacústica* (TFA), y consiste básicamente en la absorción de la radiación luminosa pulsada o modulada que incide sobre una muestra. Ésta incidencia de luz genera un aumento de temperatura en la muestra siguiendo la frecuencia de modulación de la luz, la cual se expande y contrae con esa periodicidad, produciendo ondas acústicas o de presión que se propagan hasta ser detectadas por un sensor de vibración [3]. De manera literal, se puede decir que escuchando la luz se pueden medir diferentes propiedades ópticas y térmicas de los materiales, por lo que la TFA tiene una gran cantidad de aplicaciones en el campo de la medicina, y actualmente está experimentando un crecimiento explosivo en áreas de investigación que abarcan desde los campos del cáncer, enfermedades cardiovasculares, neuroimagen, oftalmología, inmunología, diabetes, obesidad, tráfico celular, hasta otras varias funciones biológicas [4].

La TFA pulsada tiene ciertas ventajas sobre otras técnicas, ya que detecta ondas de presión, particularmente ultrasonido, que sufre menor dispersión y atenuación en comparación con la luz. Puede ser aplicada al estudio de muestras biológicas, material opaco, sustancias líquidas o gaseosas, soluciones con concentraciones bajas o demasiado elevadas de soluto. En el caso de una muestra espesa y muy opaca como la sangre entera, es ventajoso utilizar la TFA pulsada, pues para su estudio no se requiere el uso de energía ionizante, y además no se modifica a la muestra por los efectos

térmicos, lo cual es de suma importancia para no causar daño a las células sanguíneas.

La *sangre entera* es un *fluido corporal* líquido más denso y viscoso que el agua. Dada su composición y funciones es característica de cada persona. Se compone principalmente del *plasma sanguíneo*, que es un medio acuoso que contiene sustancias disueltas, y los *elementos corpusculares*, compuestos por células y fragmentos celulares. En porcentaje, la sangre entera está constituida aproximadamente en un 45 % por elementos corpusculares y en un 55 % por plasma sanguíneo. Por lo general, más del 99 % de los elementos corpusculares son células conocidas como eritrocitos, y menos del 1 % del volumen sanguíneo total corresponde a los leucocitos y plaquetas [5]. Las enfermedades hematológicas son producidas por alteración genética, falta de algún mineral o vitamina en la alimentación o baja producción de anticuerpos. Debido a esto existen diferentes pruebas para el estudio de la sangre, lo cual es importante y necesario para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades.

La *Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)* es una prueba frecuentemente solicitada al laboratorio clínico para diagnóstico médico, que mide la sedimentación de los eritrocitos en el plasma de la sangre entera anticoagulada durante un periodo de tiempo, y se determina a partir de un método estandarizado sencillo utilizando un equipo simple. Sin embargo, no es una prueba específica que pueda ser usada para detectar un amplio rango de enfermedades, debido a que hasta el momento aún no se esclarecen la totalidad de los factores que intervienen en su mecanismo, ya que se da como resultado de una compleja interrelación de varios factores. Los más importantes están relacionados con las propiedades de los eritrocitos, las propiedades del plasma, factores técnicos y sus múltiples interacciones y variaciones fisiológicas [6]. De ahí la importancia de proponer otras técnicas que permitan obtener mayor información o servir como complemento de las técnicas tradicionales.

El trabajo actual es una aplicación directa de la TFA pulsada con el potencial para despertar el interés de médicos e investigadores del área médica. Se trata de una técnica alternativa de posible diagnóstico que arroja información complementaria a través de un método no invasivo, no ionizante y que requiere de una preparación mínima de la muestra a estudiar. En el

Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (HGM) se dispone del equipo necesario y se tiene la oportunidad para llevar a cabo investigación con muestras biológicas (sangre entera) provenientes de pacientes y donadores. En este trabajo específicamente se estudiaron muestras de sangre entera proporcionadas por el Banco de Sangre y el Laboratorio de Hematología Especializada (LHE), las cuales fueron transportadas y analizadas en el laboratorio de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) perteneciente al mismo HGM.

Esta Tesis está conformada del modo siguiente: el primer capítulo describe de forma general a la Técnica Fotoacústica. El segundo capítulo señala las características de la muestra a trabajar (sangre entera humana), con la finalidad de entender su composición y factores que pudieran intervenir con la VSG. El tercer capítulo se enfoca en el tema central de la tesis, la VSG, por lo que se describe específicamente el fenómeno físico de la sedimentación a través de un modelo que parte de la Ley de Stokes, además de la teoría respectiva sobre diagnóstico médico relacionado a esta prueba de laboratorio clínico. El cuarto capítulo es de metodología, en él se describe cada elemento utilizado en el arreglo experimental, la forma en que se manejaron las muestras y el procedimiento general de los dos métodos utilizados: Método Visual y Método FA. El quinto capítulo muestra los resultados y el análisis para cada uno de los dos métodos.

1. Técnica Fotoacústica (TFA)

En este capítulo se describen brevemente antecedentes relevantes en la historia del desarrollo de la *espectroscopía fotoacústica*, se describe el efecto fotoacústico, la Técnica Fotoacústica (TFA), se presentan algunas aplicaciones en el área médica y las ventajas de llevar a cabo la misma técnica para el estudio específico de muestras de sangre entera.

1.1.Revisión Histórica de la TFA

El principio de la *fotoacústica* (FA) se ha presentado en la historia de la Ciencia desde que *Alexander Graham Bell*¹ observó el efecto físico de generación de ondas sonoras al aplicar radiación luminosa intermitente en los materiales. Este efecto, conocido como *efecto fotoacústico* fue descubierto en el año 1880 por el mismo A. G. Bell mientras trabajaba en el *fonógrafo* (**Figura 1**) en colaboración con Charles Sumner Tainter, un fabricante de instrumentos ópticos. Para A. G. Bell el fonógrafo fue su invento más importante, un instrumento mucho más revolucionario que el teléfono y con el cual logró transmitir mensajes de voz a unas decenas de metros de manera inalámbrica, tan solo utilizando la radiación solar como portadora de información [3].

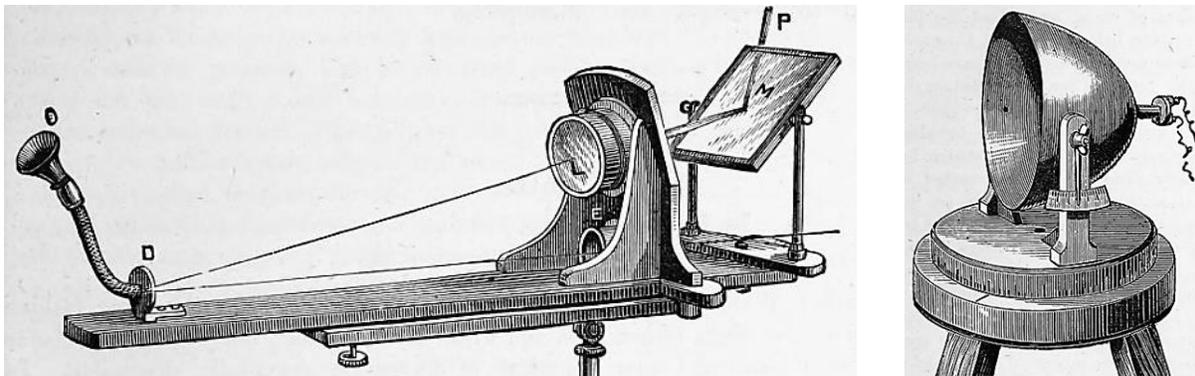


Figura 1. El fonógrafo, invento de A. G. Bell con el que realizó experimentos y consecuentemente descubrió el efecto fotoacústico, consistía básicamente de una parte emisora de señales moduladas (izquierda) y una parte receptora de señales moduladas (derecha). En la parte emisora se hacía incidir un haz de luz solar en un espejo que reflejaba la luz

¹ *Alexander Graham Bell* (1847-1922), fue un científico británico y naturalizado estadounidense que contribuyó ampliamente al desarrollo de las telecomunicaciones.

a un segundo espejo que vibraba en respuesta a la voz emitida directamente por quien hablaba, así cuando la luz se proyectaba sobre el segundo espejo, las vibraciones de la voz se superponían con el haz de luz reflejado, produciéndose así una señal modulada en forma de luz. En la parte receptora la señal modulada proveniente del espejo oscilante se dirigía hacia un reflector parabólico, en cuyo foco se encontraba una celda de selenio (*Se*), el cual al ser un material fotosensible y además fotovoltaico le permitía convertir la energía lumínica en una corriente eléctrica, y posteriormente a través de un circuito telefónico transformarla en una señal audible [7].

A. G. Bell se encontró con el efecto fotoacústico, un resultado de gran relevancia en la actualidad, cuando se dio cuenta que el selenio y otros sólidos emiten sonido al ser iluminados con luz modulada, todo esto mientras realizaba experimentos con el fotófono [4]. Posteriormente, utilizando un *espectrófono* (**Figura 2**) también notó que la intensidad de este sonido emitido depende de la longitud de onda de la luz incidente, concluyendo que el efecto fotoacústico se debía a un proceso de absorción óptica.

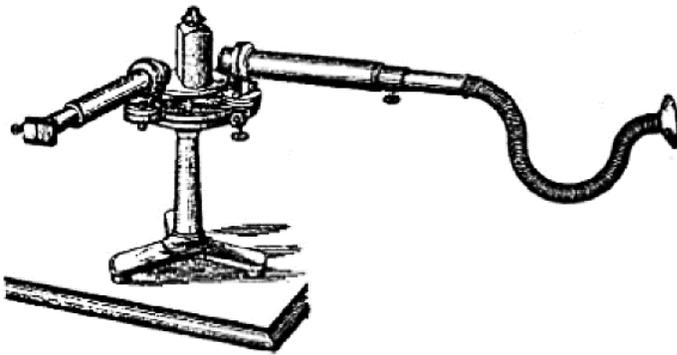


Figura 2. Espectrófono. La luz blanca entra por el tubo izquierdo donde un sistema de lentes la dirigen a un prisma colocado en el centro del dispositivo, la luz se separa en diferentes longitudes de onda para luego incidir sobre un sólido situado en la entrada del tubo derecho donde se produce el efecto fotoacústico, el sonido generado se propaga por el tubo de escucha [3].

Durante sus demostraciones del fotófono en sus viajes a reuniones y presentaciones, deleitó a distinguidos científicos e ingenieros de la época que se interesaron por este invento, dentro de ellos Wilhelm Konrad Röntgen el descubridor de los rayos X, quien además notó tiempo más tarde que el efecto fotoacústico también se presenta por la absorción de la luz en gases. A través de estas investigaciones iniciales se determinó que el efecto podía ser utilizado para obtener información espectral de las muestras [4].

Aunque el efecto fotoacústico ganó el interés de varios investigadores, permaneció como curiosidad científica por muchos años, principalmente porque los experimentos eran difíciles de cuantificar, hasta que debido al

desarrollo de fuentes luminosas monocromáticas intensas como los *láseres*², el desarrollo de sistemas sensibles de detección, adquisición y procesamiento de datos, así como también un marco teórico por medio del cual relacionar las propiedades del material a investigar con el fenómeno físico, entonces se comenzaron a desarrollar las primeras aplicaciones prácticas.

La década de 1970 es mencionada como la del resurgimiento del efecto fotoacústico, sin embargo, las primeras aplicaciones se deben a los trabajos del soviético Viengerov en 1938 [8], pues efectuó los primeros análisis espectroscópicos en gases utilizando una variante de esta técnica (la generación de ondas sonoras a través del proceso de calentamiento y expansión-compresión del gas, en lugar del proceso de absorción de la luz en un gas). Sus trabajos basados en los estudios de Röntgen y Tyndall en gases no fueron significativos debido a la aún ausencia de láseres, pero sobre todo al hecho de haber realizado sus publicaciones en un idioma poco accesible en aquella época [3].

Después del desarrollo del láser en 1960, Kerr y Atwood en 1968 fueron los primeros en analizar gases usando láseres de emisión continua y pulsada, así como también micrófonos para la detección acústica [9]. En 1969, Hu estudió teóricamente la fuente acústica que surge cuando la luz se enfoca en líquidos con pulsos de láser largos [10], y en 1978, Sigrist y Kneubühl lo hicieron con pulsos de láser cortos [11].

Las primeras investigaciones en el área biomédica, sobre la generación de ondas acústicas por absorción de pulsos de láser cortos, se llevaron a cabo por L. Amar en 1964 en los ojos de un conejo

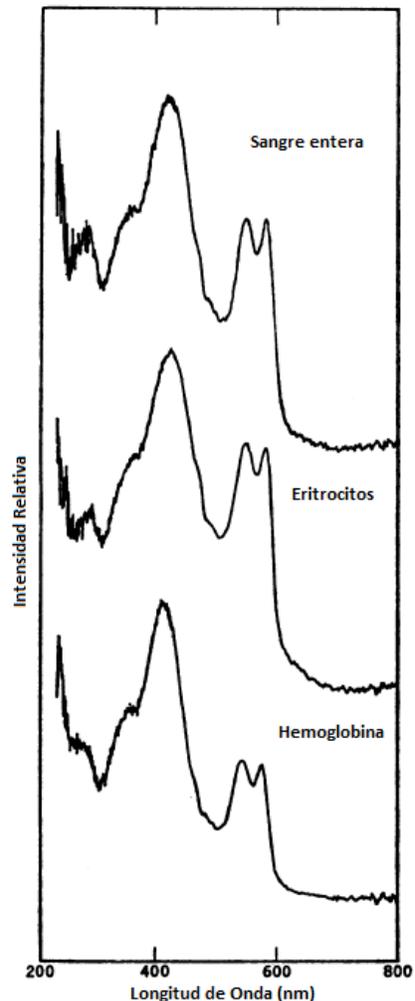


Figura 3. Espectros fotoacústicos de extendidos o frotis de sangre entera, eritrocitos y hemoglobina [14].

² El primer láser fue uno de rubí, construido por Theodore Harold Maiman y funcionó por primera vez en mayo del año 1960.

in vivo [12], y posteriormente se realizaron estudios en muestras de ojo humano *ex vivo* [13]. Además, A. Rosencwaig demostró en 1973, a través de experimentos, numerosas aplicaciones prometedoras de la técnica, incluido el estudio de materiales biológicos como los *citocromos*³ y la hemoglobina [14]. En la **Figura 3**, se muestran los espectros fotoacústicos correspondientes a extendidos o frotis de sangre entera, eritrocitos y hemoglobina.

La teoría más aceptada para explicar el efecto fotoacústico fue enunciada en 1976 por A. Rosencwaig y su colaborador A. Gersho, quienes desarrollaron el denominado *modelo de Rosencwaig-Gersho* para explicar el fenómeno fotoacústico en sólidos a partir de la solución de las ecuaciones diferenciales de difusión de calor [2].

1.2.Efecto Fotoacústico

El *efecto fotoacústico* es la generación de ondas de sonido debidas a la absorción de la radiación electromagnética en un material. Una condición para que se de este efecto, es que la fuente de iluminación sea de forma periódica (modulada) o de destello (pulsada). Además, la descripción de este efecto fotoacústico involucra tres diferentes tipos de ondas, que son las electromagnéticas, térmicas y acústicas, siendo así, un efecto que requiere de la comprensión de conocimientos de diferentes áreas de la Física para llevar a cabo su aplicación [3].

1.3.Técnica Fotoacústica

La Técnica Fotoacústica (TFA), actualmente forma parte del gran arsenal de herramientas para el estudio de la materia en el área médica, ya que al tener como base el *efecto fotoacústico* se pueden encontrar gran cantidad de aplicaciones, incluyendo aspectos relacionados con material biológico que procede del cuerpo humano.

³ Los *citocromos* son proteínas que realizan una función vital en el transporte de energía química en las células vivas, juegan un papel esencial en la respiración celular.

La TFA pertenece al grupo de las técnicas experimentales conocidas como fototérmicas [4].

En estas técnicas, se hace incidir energía luminosa de forma modulada o pulsada sobre la muestra a investigar, la cual puede encontrarse en estado sólido, líquido o gaseoso. Los fundamentos del efecto fotoacústico en muestras líquidas y sólidas son similares empleando una fuente de luz modulada o pulsada. Sin embargo, los efectos físicos que se observan son sustancialmente diferentes para los dos casos [15].

Cuando el láser es sintonizado en la longitud de onda apropiada, las moléculas de la región iluminada absorben su energía, siendo parte de esta energía absorbida y parcialmente transformada en calor. Debido a que el haz de luz es interrumpido periódicamente la absorción ocurre solamente en los intervalos de tiempo en que el haz se deja pasar, en esos momentos las moléculas pasan a un nivel de excitación, retornando al nivel inicial cada vez que el haz es interrumpido, y cediendo el exceso de energía a moléculas vecinas mediante colisiones, transformando así la energía luminosa en energía de movimiento térmico y generando calor. La temperatura de la muestra varía con la misma frecuencia que lo hace la radiación incidente, induciendo cambios en los parámetros del material, y/o el medio en el que se encuentra inmerso. La manera en que se detectan estas variaciones, las cuales son debidas a la incidencia de la radiación luminosa intermitente, es la base de los diferentes esquemas experimentales, ver **Figura 4**.

En particular, en la TFA pulsada, las variaciones de temperatura son acompañadas por cambios de presión o vibraciones que generan ondas acústicas en la muestra, que generalmente están en el rango del *ultrasonido*⁴,

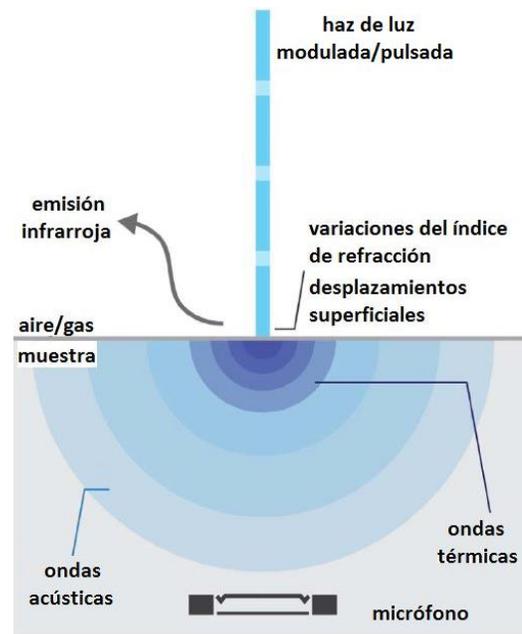


Figura 4. Fenómenos fototérmicos debidos a la incidencia de radiación luminosa intermitente sobre una muestra, la forma de detección de estas variaciones es la base de los diferentes esquemas experimentales [4].

⁴ El *ultrasonido* es una onda sonora cuya frecuencia supera la capacidad de audición del oído humano, aproximadamente 20,000 Hz.

y las cuales pueden ser detectadas de manera directa o indirecta usando sensores piezoeléctricos [3].

1.3.1. Detección de Ondas Fotoacústicas

En general, en la TFA, a las ondas acústicas generadas a partir del efecto fotoacústico se les designa como *ondas fotoacústicas*, y su detección puede realizarse de manera directa o indirecta:

Detección directa. Este método de detección es utilizado en este trabajo para el estudio de una muestra líquida contenida en un recipiente o celda transparente. El detector se encuentra acoplado directamente a la celda, por lo que las ondas acústicas generadas se propagan casi en su totalidad a través de la misma muestra, y no se transportan a través de un medio gaseoso o interfaz adicional entre la muestra y el detector, como en el caso del método de detección indirecta.

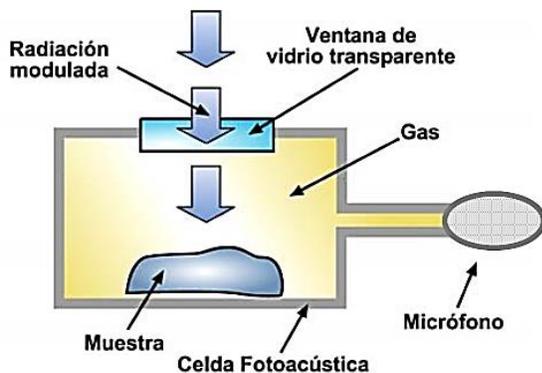


Figura 5. Celda fotoacústica para detección indirecta de ondas acústicas como resultado de la absorción de radiación luminosa modulada [3].

Detección indirecta. La muestra del material a investigar es colocada en el interior de una cámara cerrada o *celda fotoacústica* que contiene aire o algún tipo de gas como acoplamiento. Un ejemplo de este método de detección se muestra en la **Figura 5**. A través de una ventana de vidrio transparente se hace pasar el haz luminoso, y como consecuencia de la absorción de la radiación luminosa modulada, el material se calienta, transmitiéndose así el calor a una capa de gas adyacente a la superficie iluminada de la muestra, entonces esta

capa de gas se calienta periódicamente, expandiéndose y contrayéndose, y actuando como un pistón sobre el resto del gas contenido en la celda fotoacústica. Se genera así una onda acústica o de presión, que es el sonido que puede ser detectado con un micrófono acoplado o colocado también dentro de la misma celda fotoacústica [3].

1.3.2. Mecanismos de generación de la Señal Fotoacústica

Las ondas fotoacústicas que son detectadas por el sensor piezoeléctrico, y que son representadas como señales eléctricas por el instrumento de medición, en este trabajo son referidas como *señales fotoacústicas*. La generación de estas señales consta de tres procesos esenciales [3]:

1) *Absorción de radiación luminosa*. Este mecanismo depende de las propiedades ópticas del medio absorbente, como el coeficiente de absorción, la reflectancia y la transmitancia óptica. Esto hace que la señal FA dependa de dichos parámetros y que ellos puedan ser medidos. En particular, su dependencia de la longitud de onda de la radiación hace posible aplicaciones espectroscópicas.

2) *Transformación de energía electromagnética en calor*. El incremento de temperatura en la región iluminada por un haz pulsado, se produce por decaimientos no radiativos. Además, depende de la eficiencia cuántica del proceso (cociente entre la cantidad de calor generado y la energía absorbida) y del tipo del material.

3) *Propagación de ondas térmicas o de presión*. El incremento de temperatura se relaja, desde la región iluminada hacia los alrededores, ya sea por medio de difusión de calor (ondas térmicas), o por una expansión termoelástica (ondas de presión). Este proceso depende del tipo de excitación.

a) Para el caso de la *excitación modulada*. El calor que se genera en una muestra absorbente después de la absorción de luz, se difunde desde la zona de absorción hacia el medio circundante. El calentamiento periódico debido a la luz modulada conduce a la formación de *ondas térmicas* que se propagan en el medio. La detección de estas ondas puede realizarse a través de una celda fotoacústica, ver **Figura 5**, en donde el calor que se difunde desde la muestra a esta celda cerrada, conduce a la expansión térmica del volumen de gas encerrado, lo cual puede detectarse con un micrófono [15]. Este proceso depende de cuatro propiedades térmicas fundamentalmente: difusividad térmica α , conductividad k , efusividad térmica ε y capacidad calorífica

específica C (producto de la densidad y el calor específico) que se relacionan entre sí mediante las ecuaciones:

$$\alpha = k/C \quad ; \quad \varepsilon = (kC)^{1/2}$$

b) Para el caso de la *excitación pulsada*. La *expansión termoelástica* en la zona iluminada por un pulso láser corto, origina una *onda de presión* de banda ancha, que se propaga desde ésta zona a través del medio con la respectiva velocidad del sonido [15]. Para que el mecanismo de expansión termoelástica sea el dominante respecto a la difusión de calor, se deben cumplir dos condiciones [16]: 1) La duración del pulso láser debe ser menor que el tiempo de difusión térmica fuera de la zona iluminada. Por lo tanto, el calor viajará una distancia menor a la distancia característica de difusión, y la energía se concentrará en la región irradiada, asegurando que la onda de presión generada proviene de la misma región. Si esto se cumple, se dice que el sistema está en el régimen de *confinamiento térmico*. 2) La duración del pulso láser debe ser menor al tiempo en que la expansión viaja a través de la región iluminada. Así, cuando el siguiente pulso incida sobre la muestra absorbente, ésta ya habrá regresado a su estado de equilibrio. Si esto se cumple, se dice que el sistema está en el régimen de *confinamiento de expansión*. El régimen termoelástico se da cuando se cumplen ambas condiciones, y es de interés en los ensayos no destructivos porque no se modifica a la muestra.

1.3.3. TFA Pulsada

En este trabajo se lleva a cabo la TFA pulsada, es decir, se emplea una fuente de excitación pulsada para la generación de las ondas acústicas, las cuales se encuentran en el rango del ultrasonido, y son detectadas de manera directa usando un sensor piezoeléctrico. El proceso fundamental para la generación de estas señales fotoacústicas se representa en el diagrama de la **Figura 6** [15].

La excitación pulsada se obtiene usando láseres pulsados, cuya frecuencia de repetición del pulso es de unos pocos ciclos por segundo (Hz), lo que resulta en periodos muy cortos de iluminación intensa por cada pulso,

seguido de periodos largos de oscuridad, hasta que incide el siguiente pulso. De hecho, el *ciclo de trabajo*⁵ (Duty Cycle) de la excitación pulsada es relativamente corto en comparación con la excitación modulada.

De acuerdo con la **Figura 6**, cuando la muestra absorbente es iluminada localmente en un tiempo muy corto, es decir, por un pulso de radiación láser (con una determinada longitud de onda y energía), entonces el mecanismo presente y más común es la *expansión termoelástica*. Donde el aumento de temperatura de la zona iluminada también ocurre en un tiempo muy corto, tal que no se permite que la temperatura del sistema se incremente más allá de la zona iluminada (confinamiento térmico). Esto ocasiona que esta misma zona se expanda (confinamiento de expansión) y se produzca un cambio de presión localizado, el cual se propaga por todo el sistema muestra-alrededores. Posteriormente, esta onda de presión, que generalmente se encuentran en el rango del ultrasonido, es detectada por un sensor piezoeléctrico (micrófono), y una vez que la señal eléctrica correspondiente es observada en el osciloscopio, ésta es designada como una señal fotoacústica.

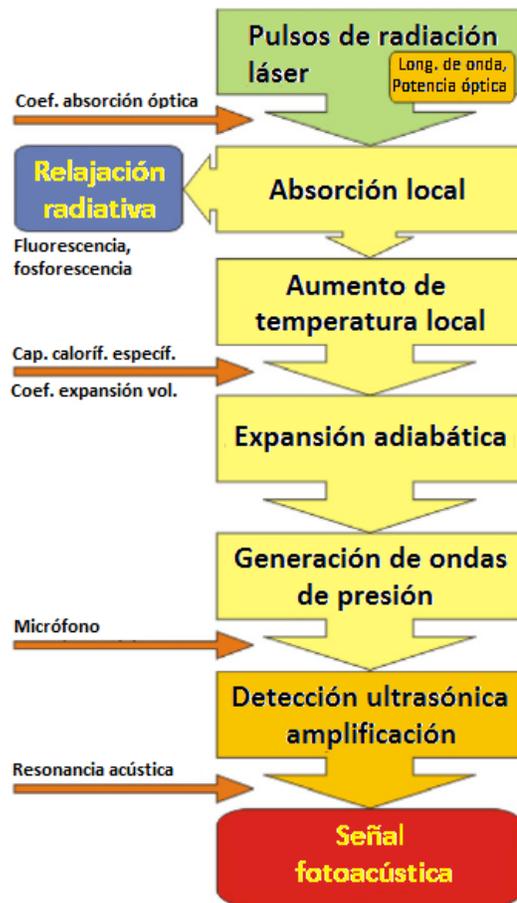


Figura 6. Diagrama que representa el proceso fundamental para la generación de la señal fotoacústica mediante la TFA pulsada [15].

Es debido a esto que la excitación pulsada produce una expansión térmica rápida y adiabática en la muestra, es decir, se deposita la energía en un tiempo muy corto, y no se produce sobrecalentamiento en la muestra porque hay un largo tiempo entre los pulsos, permitiendo un enfriamiento

⁵ El *ciclo de trabajo* es un parámetro que expresa el tiempo de activación, su valor se encuentra comprendido entre el 0 y 1, y se define como $D_{cycle} = t_{on}/T$ donde t_{on} es la duración o anchura del pulso y T es el periodo del pulso. Para este caso se tiene un láser con una frecuencia de repetición del pulso de 10 Hz y una anchura del pulso de 5 ns, por lo que se tiene un ciclo de trabajo de 5×10^{-8} .

eficiente (tiempo de relajación térmica), y como consecuencia, los daños a causa de los efectos térmicos en la muestra pueden ser despreciables.

Dependiendo de las características de absorción óptica de la muestra, la elección de la energía, la frecuencia de repetición y la duración o anchura del pulso, así como la longitud de onda, se da lugar a una gran cantidad de aplicaciones de la TFA pulsada en diferentes áreas de la investigación.

1.4. Aplicaciones de la TFA

En la actualidad, la TFA tiene múltiples aplicaciones en distintos campos de investigación, incluso en campos como la industria farmacéutica y de alimentos. A través de esta técnica se puede medir en sistemas físicos o biológicos algunas propiedades ópticas, que regulan como es absorbida la luz de diferentes colores, o algunas propiedades térmicas, que describen la causa de que un cuerpo se caliente más o conduzca mejor el calor que otro [3]. En esta sección se presentan ejemplos de aplicaciones que están enfocadas en el área médica, problemas ambientales y de la salud.

1.4.1. Procesamiento de imágenes

Esta es una de las aplicaciones más interesante de la fotoacústica en el área médica, ya que el procesamiento de imágenes es importante para el diagnóstico y la investigación científica, sobre todo cuando se trata de casos clínicos en los que es conveniente causar el mínimo de molestias a los pacientes, además de evitar posibles daños colaterales.

Algunas de las tecnologías actualmente empleadas como método de diagnóstico en el área médica, cuentan ya sea con limitantes técnicas o económicas [1]. En el caso de la Tomografía Axial Computarizada (TAC) se utiliza inconvenientemente radiación ionizante, y es una prueba cuya instalación y mantenimiento es bastante costosa; por otro lado, la imagen por Ultrasonido generalmente tiene un contraste pobre, y las técnicas ópticas puras de la proyección de imagen no son capaces de visualizar con eficacia las estructuras del tejido biológico a una profundidad de varios centímetros debido

a su fuerte dispersión. Es debido a esta problemática que se investiga en nuevas tecnologías de diagnóstico, tal como la *imagenología fotoacústica* que está basada en la obtención de ondas acústicas generadas por la incidencia de un láser para visualizar la estructura interna de los tejidos, de una manera no-invasiva y no-ionizante. Algunas de sus potenciales aplicaciones son la evaluación del cerebro, enfermedades vasculares, anomalías de la piel y la detección temprana de cáncer de próstata y de mama, debido a que el crecimiento tumoral provoca neovascularizaciones. Así también, a partir de los principios básicos de la fotoacústica y de las propiedades ópticas de los tejidos se ha desarrollado una tecnología denominada *tomografía fotoacústica*.

La adquisición de las señales se obtiene de acuerdo con un proceso similar al de la **Figura 6**, para lo cual se requiere de un láser pulsado en el rango de radiofrecuencia con el que se emite luz a alta frecuencia para la excitación de la muestra; además se requiere de un equipo para la detección ultrasónica de las ondas mecánicas que se generan cuando la muestra se somete a periodos de calentamiento y enfriamiento debido a la incidencia de luz periódica; y un equipo fotoacústico para la detección de la amplitud de la señal. Posteriormente, estas señales adquiridas se procesan por medio de algoritmos matemáticos para obtener imágenes que pueden ser incluso en tercera dimensión. Los métodos para la reconstrucción de imágenes a partir de la detección de señales acústicas dependen de la aplicación clínica, además están en constante evolución, dado que no es una tarea sencilla [1].

La imagen fotoacústica es considerada como una imagen obtenida a partir de ultrasonido, en la cual el contraste no depende de las propiedades mecánicas y elásticas del tejido, sino de sus propiedades ópticas, en particular de la absorción óptica. En consecuencia, ofrece una imagen con mayor definición que la imagen de ultrasonido, con la capacidad de detectar hemoglobina, lípidos, agua y *cromóforos*⁶ que absorben luz, pero con una mayor trayectoria de penetración que la imagen obtenida ópticamente.

Un claro ejemplo de la aplicación de la fotoacústica dentro del *procesamiento de imágenes* es para conocer el daño tisular en pacientes que han sufrido quemaduras, ya que conocer la extensión y profundidad máxima

⁶ Un *cromóforo* es el conjunto de átomos o parte de una molécula orgánica responsable de la absorción y emisión de radiación electromagnética mediante transición electrónica, lo cual determina el color de la sustancia.

que se ha afectado es una tarea difícil, pues lo que se busca es manipular lo menos posible estructuras que son muy sensibles al dolor, y la determinación visual por si sola es inexacta [1].

1.4.2. Distribución de fármacos en la piel

En ocasiones, es de interés conocer la manera en que se distribuye un fármaco en la piel, el cual puede ser aplicado tópicamente con masajes o a través de ultrasonido (*fonoforesis*⁷), por lo que en estudios *in vivo*, por medio de fotoacústica se puede conocer la eficiencia de su transporte, es decir, la profundidad alcanzada en las capas internas de la piel, y esto se debe a que cambios en la concentración de la difusión del fármaco alteran la distribución de las fuentes de calor, y en combinación con la absorción de la radiación luminosa intermitente conducen a cambios en la señal fotoacústica detectada, la cual es directamente proporcional a la concentración del fármaco aplicado. Los resultados de estos estudios indican que la concentración final obtenida, depende del método para aplicar el fármaco y de las propiedades ópticas e hidratación de la piel de cada sujeto [1].

1.4.3. Detección de contaminantes

Este es uno de los campos donde la TFA es altamente utilizada, ya que es posible detectar elementos o compuestos químicos que, en determinadas concentraciones en el aire atmosférico o en el agua pueden producir efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente. Esto se debe a que gran cantidad de moléculas contaminantes absorben fuertemente la radiación perteneciente a la región infrarroja del espectro electromagnético, y el sonido emitido por ellas es detectado por un micrófono, revelando así su presencia. La señal eléctrica generada por el micrófono, que es proporcional a la concentración de moléculas que absorben la radiación, es analizada por computadora utilizando programas basados en modelos físico-matemáticos, y dado que cada molécula presenta un modo vibracional único reflejado en una firma fototérmica, entonces se puede detectar la concentración de moléculas contaminantes [3].

⁷ La *fonoforesis* es una técnica que emplea ultrasonido para mejorar la penetración de medicamentos de uso tópico, este ultrasonido se transmite en la piel como ondas de presión que empujan a las partículas al interior de organismo.

1.5.Ventajas de la TFA

La fuerza particular de la fotoacústica surge del hecho de que la energía que se detecta no es luz, sino sonido, que generalmente sufre menos dispersión y atenuación en comparación con la luz [4]. A diferencia de la espectroscopía óptica convencional, la TFA puede ser aplicada al estudio de muestras biológicas, material opaco y no solo transparente, sustancias sólidas orgánicas e inorgánicas, líquidas o gaseosas, soluciones con concentraciones bajas o demasiado altas de soluto. No es necesario realizar diluciones. La TFA permite estudiar muestras que se encuentren en forma de polvos o partículas muy pequeñas, como el caso de micro-partículas de grafito [17] y nano-partículas de oro [18] suspendidas en un medio, e incluso el monitoreo de la sedimentación de células de sangre o hemolinfa en tiempo real [19]. Además, se trata de una técnica no-invasiva, no-ionizante y que requiere de una mínima o nula preparación de la muestra de estudio, con algunas variantes de la técnica, es posible realizar estudios directamente en seres vivos [1].

En el estudio e investigación de una muestra biológica líquida, cuyas características pueden presentar una concentración demasiado elevada, espesa y opaca, como lo es la sangre entera, es ventajoso llevar a cabo la TFA pulsada, ya que además de su fácil implementación es una técnica que no modifica a la muestra por los efectos térmicos, y que no requiere el uso de energía ionizante, lo cual es de suma importancia para no producir daño a las células sanguíneas. Además, debido a que es considerablemente elevado el coeficiente de absorción óptico de la hemoglobina, su componente principal, los umbrales de daño por láser para la sangre son relativamente bajos en comparación con los umbrales de otros tejidos [20].

2. Sangre: componentes, funciones y trastornos

En este capítulo se presenta concretamente información en torno a la muestra utilizada en este trabajo, la sangre entera humana. Se describen los componentes más importantes de la sangre, sus funciones y algunas características presentes en trastornos de la sangre de sujetos catalogados con: anemia hemolítica y dislipidemia. Este capítulo es fundamental para la comprensión del fenómeno y posterior interpretación de los resultados sobre el estudio de la VSG que se presenta en el Capítulo 5 "Resultados y Análisis".

2.1. Sangre

La sangre es un *fluido corporal* líquido cuya densidad y viscosidad es mayor que la del agua, al tacto resulta levemente pegajosa. Su temperatura es de 38 °C, alrededor de un grado por encima de la temperatura oral. Tiene un *pH* ligeramente alcalino entre 7.35 – 7.45. Su color varía de acuerdo a su contenido de oxígeno, cuando está saturada es roja brillante y cuando está insaturada es roja oscura. Alcanza cerca del 8 % de la masa corporal total. El volumen sanguíneo en un hombre adulto es de 5 – 6 litros, y en una mujer adulta es de 4 – 5 litros. Dada su composición y funciones, la sangre es característica de cada persona como lo es la piel, los huesos y el cabello [5].

2.2. Componentes de la Sangre entera

La *sangre entera* se compone principalmente de dos elementos: 1) el *plasma sanguíneo*, que es un medio acuoso o matriz extracelular que contiene sustancias disueltas, y 2) los *elementos corpusculares*, compuestos por células y fragmentos celulares [5].

En porcentaje, la sangre entera está constituida aproximadamente en un 45 % por elementos corpusculares y en un 55 % por plasma sanguíneo. Por lo general, más del 99 % de los elementos corpusculares son células conocidas

como eritrocitos (glóbulos rojos), y menos de 1 % del volumen sanguíneo total corresponde a los leucocitos (glóbulos blancos) y las plaquetas.

Normalmente, cuando la sangre está en circulación las células se encuentran disueltas en el plasma, sin embargo, cuando la sangre entera es centrifugada en un tubo de recolección (**Figura 7**) las células eritrocitarias (más densas) descienden al fondo, mientras que los elementos plasmáticos (menos densos) forman una capa sobre ellas. Dado que los leucocitos y plaquetas son menos densos que los eritrocitos, pero más densos que el plasma, entonces se forma una fina capa leuco-plaquetaria entre ambos [5].

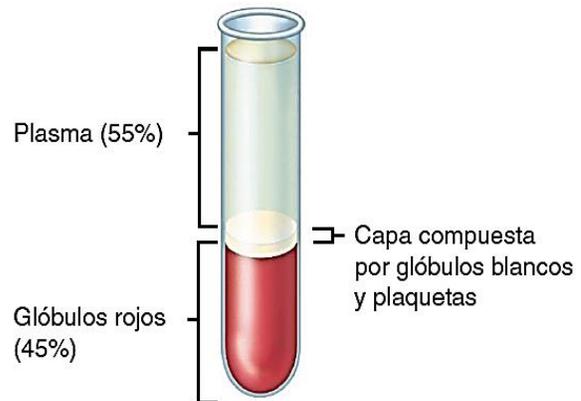


Figura 7. Porcentaje y apariencia de los componentes principales de la sangre entera centrifugada de un adulto sano, en un tubo de recolección [5].

El porcentaje del volumen total de sangre ocupado por los eritrocitos se conoce como *hematocrito*. El rango normal de hematocrito para mujeres adultas es de 38 – 46 %, mientras que para hombres adultos es de 40 – 54 % [5]. En las mujeres, el valor más bajo de hematocrito puede deberse a la excesiva pérdida de sangre durante la menstruación en su etapa reproductiva. En los hombres, la hormona testosterona está presente en mucha mayor concentración que en mujeres, lo cual contribuye a un valor más alto de hematocrito.

2.2.1. Plasma sanguíneo

El *plasma sanguíneo* es un líquido amarillento que está compuesto por alrededor de un 91.5 % de agua, 7 % de proteínas y 1.5 % de otros solutos. Las proteínas principales son las *albúminas* (proteínas más pequeñas y más numerosas), *globulinas* (proteínas grandes) y *fibrinógeno* (proteínas grandes), mientras que los solutos son nutrientes, vitaminas, hormonas, gases respiratorios, electrolitos y productos de desecho. Las proteínas plasmáticas son el principal contribuyente de la viscosidad sanguínea [5].

2.2.2. Elementos corpusculares

Los *elementos corpusculares* de la sangre incluyen tres componentes principales: *eritrocitos*, *leucocitos* y *plaquetas*. Los eritrocitos y leucocitos son células completas, mientras que las plaquetas son fragmentos celulares.

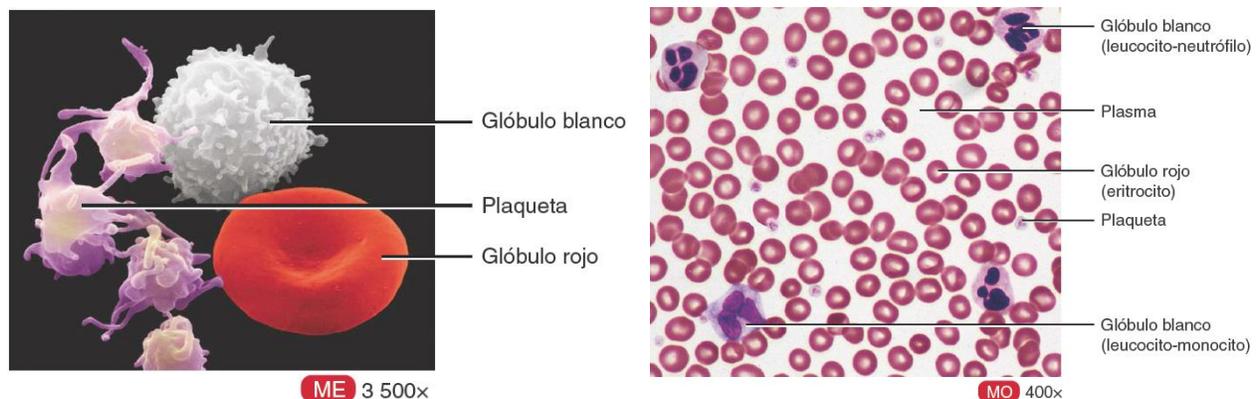


Figura 8. Fotografía tomada con microscopio electrónico (izquierda) y micrografía de frotis sanguíneo (derecha) en donde se observan los elementos corpusculares de la sangre: eritrocitos (glóbulos rojos), leucocitos (glóbulos blancos) y plaquetas [5].

2.2.2.1. Eritrocitos

Los *eritrocitos* o *glóbulos rojos* (GR) son células con forma de discos bicóncavos que carecen de núcleo (**Figura 9 A**). Están presentes en la sangre en una cantidad de 4.8 millones/ μL en una mujer adulta sana y 5.4 millones/ μL en un hombre adulto sano. Su diámetro individual es de 6 – 8 μm aproximadamente y su promedio de vida es de alrededor de 120 días [21]. Los eritrocitos maduros están muy especializados para su función de transporte de oxígeno, tienen una estructura simple, su membrana plasmática es resistente y flexible, por lo que les permite deformarse sin romperse mientras se comprimen en su recorrido por los vasos capilares sanguíneos [5].

2.2.2.1.1. Hemoglobina

Los eritrocitos contienen el pigmento que le da a la sangre su color rojo, la *hemoglobina*, y es la proteína que transporta la mayor parte del oxígeno y

parte del dióxido de carbono en la sangre. Cada eritrocito contiene cerca de 280 millones de moléculas de hemoglobina. Una molécula de hemoglobina consiste en una proteína llamada *globina* compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas (dos alfas y dos betas) y un pigmento no proteico de estructura anular llamado *hemo* que está unido a cada una de las cuatro cadenas (**Figura 9 B**). En el centro de cada anillo hay un ion de hierro Fe^{2+} que puede combinarse con una molécula de oxígeno O_2 (**Figura 9 C**), permitiendo a cada molécula de hemoglobina unirse con cuatro moléculas de oxígeno. El oxígeno de los alvéolos pulmonares entra a los eritrocitos y se combina con el hierro de la hemoglobina, de esta manera el oxígeno es transportado a través del cuerpo [5]. Además, la hemoglobina tiene un espectro de absorción fuerte y característico, ver **Figura 3**, sin embargo, debido a las fuertes propiedades de dispersión de la sangre entera por otras proteínas y material lipídico en el plasma y los eritrocitos, las investigaciones ópticas se realizan empleando hemoglobina extraída que es soluble en agua [14]. El valor normal de hemoglobina en sangre para niños es (14 – 20) g/dL, para mujeres adultas es (12 – 16) g/dL y para hombres adultos es (13.5 – 18) g/dL [5].

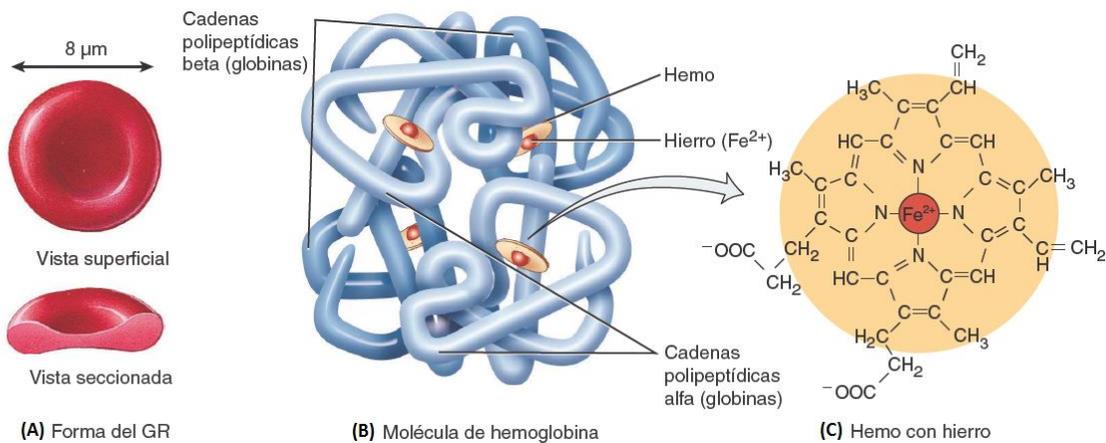


Figura 9. (A) Morfología del eritrocito (GR). **(B)** Molécula de hemoglobina (pigmento que le da a la sangre su color rojo). **(C)** Hemo con ion de hierro en el centro (en rojo) [5].

2.2.2.1.2. Alteraciones eritrocitarias

La observación morfológica de los eritrocitos de una extensión de sangre es parte importante de la exploración para el diagnóstico fundamental de una enfermedad [22]. Algunas alteraciones eritrocitarias [23] como el tamaño, la forma, el color y su distribución, se presentan en la **Tabla 1**.

Alteraciones eritrocitarias		
	Alteración	Descripción
Tamaño	Anisocitosis	Presencia de eritrocitos de diferentes tamaños en una misma muestra.
	Microcitosis	Eritrocitos más pequeños de lo normal. Diámetro < 6 µm
	Macrocitosis	Eritrocitos grandes. Diámetro > 8 µm VCM > 100 fL
	Megalocitosis	Eritrocitos con un diámetro superior a 11 µm.
Forma	Eliptocitosis	Eritrocitos con forma elíptica, con área pálida central y hemoglobina en los extremos.
	Esferocitosis	Eritrocitos generalmente pequeños con forma esferocítica sin área central pálida.
	Esquistocitosis	Fragmentos de eritrocitos de diversas formas, generalmente son microcíticos.
	Drepanocitosis	Eritrocitos falciformes, delgados y largos.
	Poiquilocitosis	Presencia de la variación en la forma de los eritrocitos en una misma muestra.
Color	Hipocromía	Eritrocitos teñidos de color débil. Se presenta en anemias causadas por defecto en la producción de hemoglobina.
Distribución	Rouleaux	Eritrocitos ordenados en pilas de monedas debido a proteínas plasmáticas anormales o en exceso.
	Agregación	Conglomerados irregulares de eritrocitos.

Tabla 1. Alteraciones eritrocitarias clasificadas por su tamaño, forma, color y distribución [21].

2.2.2.1.3. Volumen Corpuscular Medio

El *Volumen Corpuscular Medio* (VCM) se refiere a la media del volumen individual de los eritrocitos. Esta medida es útil para la detección, estudio y clasificación de enfermedades en la sangre, como la anemia. Es uno de los parámetros más estables de la *biometría hemática*⁸, con poca variabilidad en el tiempo, y es obtenido directamente por instrumentos automatizados de citometría hemática, los cuales cuentan, caracterizan y miden el tamaño de las células sanguíneas utilizando frecuentemente el *Método Coulter*⁹.

⁸ La *biometría hemática* o *hemograma* es un estudio importante de laboratorio para diagnóstico básico, en el que se expresan valores de los elementos sanguíneos, tales como cantidad de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, índices eritrocitarios, recuento de leucocitos y plaquetas.

⁹ El *Método Coulter* es usado para contar y medir el tamaño de las células, detectando y midiendo los cambios en la impedancia eléctrica a través de la generación de pulsos eléctricos cuando las células suspendidas en un líquido

El rango normal del VCM para hombres es (87 ± 7) fL y para mujeres es (90 ± 9) fL. De acuerdo con el valor obtenido de este parámetro se puede considerar al eritrocito como normal, microcítico o macrocítico (micro= pequeño, macro= grande, cítico= célula). Además, si existe una variación alta en el tamaño de los eritrocitos se considera como anisocitosis.

2.2.2.2. Leucocitos

Los *leucocitos* o *glóbulos blancos* (GB) son células con núcleo, combaten *patógenos* (microorganismos que causan enfermedad) y sustancias ajenas que entran en el organismo. Los GB se clasifican como *leucocitos granulares*, que incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos; y *leucocitos agranulares*, que incluyen a los linfocitos y monocitos. Están presentes en la sangre en una cantidad de 5 – 10 mil/ μ L, son superados por los eritrocitos en una relación de 700:1. Su diámetro individual es superior que el de los eritrocitos, a excepción de los basófilos y linfocitos que pueden tener un diámetro igual o inferior. Y su promedio de vida de la mayoría es desde pocas horas hasta pocos días.

2.2.2.3. Plaquetas

Las *plaquetas* o *trombocitos* son fragmentos celulares discoides sin núcleo, que contribuyen a frenar la pérdida de sangre en los vasos sanguíneos dañados formando un tapón plaquetario y liberan sustancias químicas que promueven la coagulación sanguínea. Las plaquetas contienen muchas vesículas, pero no núcleos. Están presentes en la sangre en una cantidad de 150 – 400 mil/ μ L. Su diámetro individual es de 2 – 4 μ m aproximadamente, y su promedio de vida es de alrededor de 8 – 10 días [21].

2.3. Funciones de la Sangre

La sangre en circulación tiene tres funciones generales: transporte, regulación y protección [5]:

conductor pasan a través de una pequeña apertura con dos electrodos en cada uno de sus lados. El número de pulsos corresponde al conteo de células y el tamaño del pulso es proporcional al volumen de la célula.

Transporte. La sangre transporta oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo, y dióxido de carbono desde las células hacia los pulmones. Lleva nutrientes desde el canal digestivo hacia las células, y hormonas desde las glándulas endocrinas hacia otras células. Transporta calor y desechos hacia diferentes órganos (pulmones, riñones y piel) para eliminarlos del cuerpo.

Regulación. La sangre ayuda a conservar y contribuye con la *homeostasis*¹⁰ de los líquidos corporales. Ayuda a regular procesos vitales como el balance entre acidez y alcalinidad (pH), a través de sustancias que convierten en débiles los ácidos o las bases fuertes. Contribuye en el ajuste de la temperatura corporal a través de las propiedades refrigerantes y absorción de calor del agua presente en el plasma sanguíneo, y su flujo variable a través de la piel. La presión osmótica de la sangre influye en el contenido de agua de las células, principalmente por las interacciones entre los iones disueltos y las proteínas.

Protección. La sangre proporciona protección por medio de la coagulación, lo cual previene su pérdida excesiva del sistema circulatorio tras una herida. Los leucocitos de la sangre nos protegen de las enfermedades llevando a cabo la *fagocitosis*¹¹. Algunas otras proteínas sanguíneas, incluidos anticuerpos, interferones y factores del sistema de complemento también contribuyen a protegernos contra enfermedades.

2.4.Trastornos de la Sangre

Los trastornos hematológicos son enfermedades muy diversas que afectan a los eritrocitos o proteínas en la sangre, producidas por alteración genética, falta de algún mineral o vitamina en la alimentación, alteración de algún mecanismo que regule la absorción de nutrientes, o la baja producción de anticuerpos. En este trabajo se estudian dos tipos de trastornos en la sangre: anemia (hemolítica) y dislipidemia.

¹⁰ La *homeostasis* es la capacidad de los organismos para mantener una condición interna de estabilidad, compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

¹¹ La *fagocitosis* es el proceso mediante el cual las células y organismos unicelulares capturan y digieren partículas nocivas o alimento.

2.4.1. Anemia

La *anemia* es un trastorno en el que se presenta una disminución de la concentración de hemoglobina en la sangre, se acompaña invariablemente de un descenso del valor del hematocrito y, casi siempre, del número de eritrocitos. Como consecuencia disminuye la capacidad de transporte del oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo [5]. La anemia constituye una de las causas más frecuentes de consulta clínica. La determinación de la cuenta de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina son pruebas regulares de laboratorio para detectar anemia. Una caída significativa del hematocrito, es decir, una cantidad de eritrocitos inferior a lo normal, es un indicador de anemia. En la práctica clínica se utilizan dos criterios para la clasificación general de las anemias: *criterios morfológicos*, según el tamaño de los eritrocitos (VCM), y *criterios fisiopatológicos*, según la capacidad *eritropoyética*¹² de la médula ósea (concentración de *reticulocitos*¹³) [22].

La *anemia hemolítica* es un tipo de anemia que se presenta cuando el organismo produce anticuerpos que destruyen a sus propios eritrocitos (*hemólisis*¹⁴) con acortamiento de la vida media de los mismos. La membrana de los eritrocitos se lisa prematuramente, consecuentemente la hemoglobina liberada se esparce en el plasma y puede dañar las estructuras de filtración de los riñones [5]. Las anemias hemolíticas se dividen en dos grupos: a) *corpúsculares*, donde la alteración se halla en el mismo eritrocito, puede deberse a alteraciones en la membrana eritrocitaria, de la hemoglobina y de las enzimas; b) *extracorpúsculares*, donde la alteración se halla fuera del eritrocito, pueden ser producidas por anticuerpos, medicamentos, infecciones, tóxicos o agentes físicos [24]. La determinación de un valor alto de reticulocitos es un indicador importante en el diagnóstico de anemias hemolíticas [21]. Además, la presencia de alteraciones en la forma (poiquilocitosis, esferocitosis, esquistocitosis, queratocitosis), tamaño (VCM: anisocitosis, macrocitosis, microcitosis), distribución (agregación) y color (policromasia) de los eritrocitos, descritas en la **Tabla 1**, están directamente relacionadas con este trastorno [23].

¹² La *eritropoyesis* es el proceso de formación de eritrocitos, en los seres humanos se produce en la médula ósea roja de ciertos huesos en adultos.

¹³ Los *reticulocitos* son eritrocitos que no han alcanzado su madurez total, su tamaño suele ser ligeramente mayor que los eritrocitos maduros y normalmente representan alrededor del 1 % en el conteo total de eritrocitos.

¹⁴ La *hemólisis* es el proceso de la destrucción de los eritrocitos de la sangre, lo cual conlleva a la liberación de hemoglobina en el plasma sanguíneo.

2.4.2. Dislipidemia

La *dislipidemia* o *dislipemia*, es un trastorno caracterizado por alteraciones en la concentración de los *lípidos*¹⁵ y *lipoproteínas*¹⁶ en la sangre [25].

En la **Figura 10** se presenta la comparación de una muestra de sangre entera centrifugada de una persona sana y una persona diagnosticada con dislipidemia. En el tubo de la izquierda se observa el plasma normal y sin signos de turbidez (limpio), mientras que en el tubo de la derecha el plasma presenta un aspecto turbio (lechoso).



Figura 10. Aspecto del plasma limpio y sin signos de turbidez de una persona sana (tubo de la izquierda), y del plasma turbio con apariencia lechosa de una persona diagnosticada con dislipidemia 4 + (tubo de la derecha).

La apariencia turbia se debe al exceso de lípidos (colesterol y triglicéridos) y *lipoproteínas*¹⁵ (quilomicrones, *VLDL*, *IDL*, *LDL* y *HDL*) en la sangre. Estas sustancias realizan funciones importantes para mantener la homeostasis, pero un exceso puede aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

El monitoreo de la sangre mediante una química sanguínea o un perfil lipídico son las formas más comunes de diagnosticar estas alteraciones. Sin embargo, de manera subjetiva se puede detectar el nivel de dislipidemia a través de la observación de la turbidez del plasma sanguíneo cuando las muestras de sangre entera se encuentran centrifugadas. Esta clasificación puede ir desde un nivel bajo de dislipidemia (1 +) hasta el nivel más alto de dislipidemia (4 +).

¹⁵ Los *lípidos* son un conjunto de moléculas orgánicas constituidas principalmente por carbono e hidrogeno, son insolubles en el plasma sanguíneo, por lo que circulan en la sangre unidos a proteínas en forma de lipoproteínas.

¹⁶ Las *lipoproteínas* son agregados moleculares esféricos compuestos por proteínas y lípidos, son las principales transportadoras de triglicéridos y colesterol en la sangre. Se clasifican en cinco grupos de acuerdo con su densidad (quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad *VLDL*, lipoproteínas de densidad intermedia *IDL*, lipoproteínas de baja densidad *LDL* y lipoproteínas de alta densidad *HDL*).

3. Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)

En este capítulo se presenta una revisión bibliográfica sobre una prueba frecuentemente solicitada al laboratorio clínico para diagnóstico médico, la *Velocidad de Sedimentación Globular* (VSG) o *eritrosedimentación*. Se estudian las propiedades de los componentes de la sangre entera que intervienen en la VSG. Se describen un par de métodos tradicionales estandarizados para determinar la VSG, así como también sus valores normales de referencia, interpretación y limitaciones de la prueba. Finalmente, se describe el principio físico en que se basa este fenómeno a partir de la *Ley de Stokes*.

3.1.Revisión Histórica de la prueba VSG

De manera breve se dan a conocer algunos de los sucesos de mayor relevancia sobre la historia de la prueba de Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) también conocida en medicina como *eritrosedimentación* [6]:

En 1894, Edmund Biernacki (1866-1911), un médico polaco, publicó el primer artículo en el que se describieron las bases del fenómeno de la eritrosedimentación, para ese entonces se identificó al *fibrinógeno*¹⁷ como un componente importante en el aumento de su velocidad, y su asociación con la anemia.

En 1918, Robin Fahraeus (1888-1968) observó una elevada sedimentación de los eritrocitos en el plasma de una mujer embarazada, en contraste de una mujer que no lo estaba, por lo que pensó que podía ser una prueba simple para detectar la concepción. En 1929, publicó un artículo sobre la estabilidad de la sangre en suspensión, demostrando que la causa principal del aumento de la velocidad de sedimentación se debe a la agregación de los eritrocitos [26]. Fahraeus, se apasionó por el tema y posteriormente publicó

¹⁷ El *fibrinógeno* es una proteína del plasma sanguíneo que participa en la formación de los coágulos de sangre, también es un tipo de marcador tumoral.

su tesis doctoral, siendo este un documento extenso y de gran importancia sobre la eritrosedimentación.

En 1921, Alf Westergren (1881-1968) refinó la técnica para medir la eritrosedimentación, y la prueba se popularizó tal como la había propuesto Biernacki. Señaló la importancia clínica de la velocidad de sedimentación eritrocitaria mostrando la utilidad de la técnica para el diagnóstico y seguimiento de la evolución de pacientes con tuberculosis.

En 1933, Maxwell M. Wintrobe (1901-1986) realizó modificaciones a la metodología de la técnica para medir la eritrosedimentación, pero sus contribuciones no tuvieron mucha aceptación por parte de la comunidad de los laboratorios clínicos.

En 1977, el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH), recomendó la adopción del método de Westergren como referencia para la prueba, recomendación que se mantiene vigente en el documento *Procedimientos para la Prueba de Velocidad de Sedimentación Globular: Estándar Aprobado* [27], publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), ahora llamado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [28].

3.2. Velocidad de Sedimentación Globular

La Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) es una prueba que mide la sedimentación de los eritrocitos en el plasma de la sangre entera anticoagulada durante un periodo de tiempo. Esta prueba es frecuentemente utilizada como *screening*¹⁸ en el laboratorio clínico, y se determina a partir de un método sencillo utilizando un equipo simple. Sin embargo, no es una prueba específica ni se considera una herramienta de diagnóstico independiente, pero puede ser un indicativo de procesos inflamatorios, infecciosos o neoplásicos, y ayudar en el monitoreo de la evolución de ciertas enfermedades [21].

¹⁸ En medicina, *screening* es una prueba aplicada para detectar, orientar, confirmar o excluir el diagnóstico de una enfermedad en sujetos que no presentan síntomas de tal enfermedad.

La eritrosedimentación se describió hace más de un siglo, pero hasta el momento aún no se esclarecen la totalidad de los factores que intervienen en su mecanismo, ya que se da como resultado de una compleja interrelación de varios factores. Los más importantes están relacionados con las propiedades de los eritrocitos, las propiedades del plasma, factores técnicos y sus múltiples interacciones, y variaciones fisiológicas [6].

3.2.1. Fenómeno de Rouleaux

En la sangre sana, los eritrocitos suspendidos en el plasma forman pocos o ningún agregado de células, por lo que la eritrosedimentación es mínima. La agregación de los eritrocitos en forma de "pilas de monedas" o *fenómeno de Rouleaux*¹⁹, se presenta como resultado de fuerzas electrostáticas. Los eritrocitos normalmente poseen cargas negativas en su superficie, y se mantienen separados debido al rechazo entre cargas del mismo signo. Sin embargo, en situaciones de enfermedad, algunas proteínas plasmáticas están cargadas positivamente y neutralizan las cargas de los eritrocitos, situación que favorece la formación de "pilas de monedas" y en consecuencia el aumento de la eritrosedimentación, ver **Figura 11** [6].

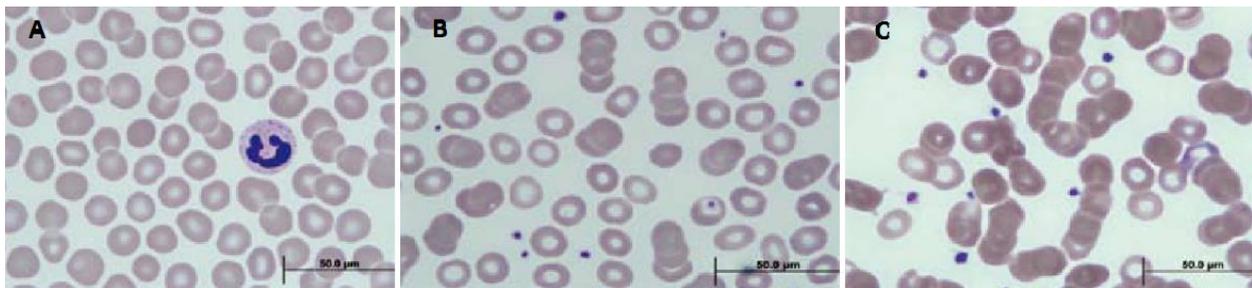


Figura 11. (A) Extendido de sangre donde se observan los eritrocitos distribuidos uniformemente, la VSG es 10 *mm/hora*. (B) Extendido de sangre donde se observa eritrocitos formando pilas de monedas, la VSG es 30 *mm/hora*. (C) Extendido de sangre donde se observan eritrocitos formando pilas de monedas en mayor cantidad, la VSG es 85 *mm/hora* [6].

Las proteínas plasmáticas que intervienen en la eritrosedimentación, conocidas como *reactantes de fase aguda*, son el fibrinógeno, alfa globulina, beta globulina, gamma globulina, y la albúmina. Las proteínas que favorecen

¹⁹ El *fenómeno de Rouleaux* describe una anomalía de los eritrocitos cuando se observan frotis en microscopio, pues los eritrocitos se apilan unos con otros formando agrupaciones cuya forma es parecida a una pila de monedas.

la agregabilidad de las células son el fibrinógeno y las globulinas en altas concentraciones, lo que conlleva a un incremento de la VSG. Este mecanismo por el cual facilitan la agregación de eritrocitos se debe a que disminuyen la fuerza de repulsión que normalmente existe entre los eritrocitos, debida a su carga superficial o *potencial zeta*. La proteína que disminuye la agregabilidad de las células es la albúmina, por lo que retarda la VSG. La proteína C reactiva en concentraciones fisiológicas no afecta la eritrosedimentación.

El potencial zeta es producido por una intensa carga negativa al nivel de la superficie de los eritrocitos, lo cual explica por qué los eritrocitos se mantienen separados. Todas las proteínas y macromoléculas en el plasma disminuyen el potencial zeta, pero el mayor efecto lo ejercen las moléculas asimétricas como el fibrinógeno y las inmunoglobulinas. La intensidad del potencial zeta depende de la composición proteica del plasma y especialmente de la relación entre las concentraciones de fibrinógeno, globulinas y albúmina. Mientras la albúmina tiende a aumentar el potencial zeta, las globulinas y en mayor parte el fibrinógeno tienden a disminuirlo. La disminución del potencial zeta de los eritrocitos tiene como consecuencia una mayor tendencia a que éstos se agrupen formando "pilas de monedas" y se eleve la eritrosedimentación. De acuerdo con este mecanismo, el valor normal de la VSG resulta del equilibrio entre las principales proteínas plasmáticas [21].

La eritrosedimentación depende de la capacidad de los eritrocitos para formar las "pilas de monedas", por lo que también puede afectarse debido a propiedades cualitativas o cuantitativas de los eritrocitos, y a su relación de volumen con el plasma.

En la anemia falciforme, la forma anormal de las células interfiere con la agrupación de eritrocitos, y retarda la sedimentación en situaciones en las que debería estar elevada. Así también, la presencia de anisocitosis marcada produce un aumento en la agregación de diferentes tamaños y la formación de un "velo de eritrocitos" en la columna del plasma. Por otro lado, la anemia característicamente aumenta la VSG [29], debido al desequilibrio entre fuerzas presentes en el plasma y la cantidad de eritrocitos. Además, como se muestra en la **Tabla 1** de la sección "Alteraciones eritrocitarias", si los eritrocitos son grandes como en la macrocitosis, o pequeños como en la microcitosis, la VSG aumenta o disminuye respectivamente dependiendo del tamaño de los eritrocitos [6].

3.2.2. Fases de la VSG

La sedimentación eritrocitaria ocurre básicamente en tres etapas: 1) *Fase de agregación*. Agrupamiento de eritrocitos con formación de agregados en forma de "pilas de monedas". 2) *Fase de precipitación*. Periodo donde los agregados de eritrocitos sedimentan rápidamente a velocidad constante. 3) *Fase de empaquetamiento*. En esta última etapa la velocidad de sedimentación desacelera al mismo tiempo que se acumulan los eritrocitos en el fondo de la columna en donde se realiza la prueba [30].

En la **Figura 12** se muestra gráficamente el comportamiento de la sedimentación eritrocitaria (descenso de la interfaz plasma-eritrocito) en función del tiempo, lo cual resulta en una curva sigmoidea, en la que se presenta la *primera fase* con descenso lento donde la pendiente de la tangente a la curva aumenta gradualmente, seguida de la *segunda fase* con descenso rápido donde la pendiente prácticamente es constante, y finalmente, la *tercera fase* con descenso lento donde la pendiente de la tangente a la curva disminuye gradualmente y se vuelve casi nula al finalizar la sedimentación de los eritrocitos.

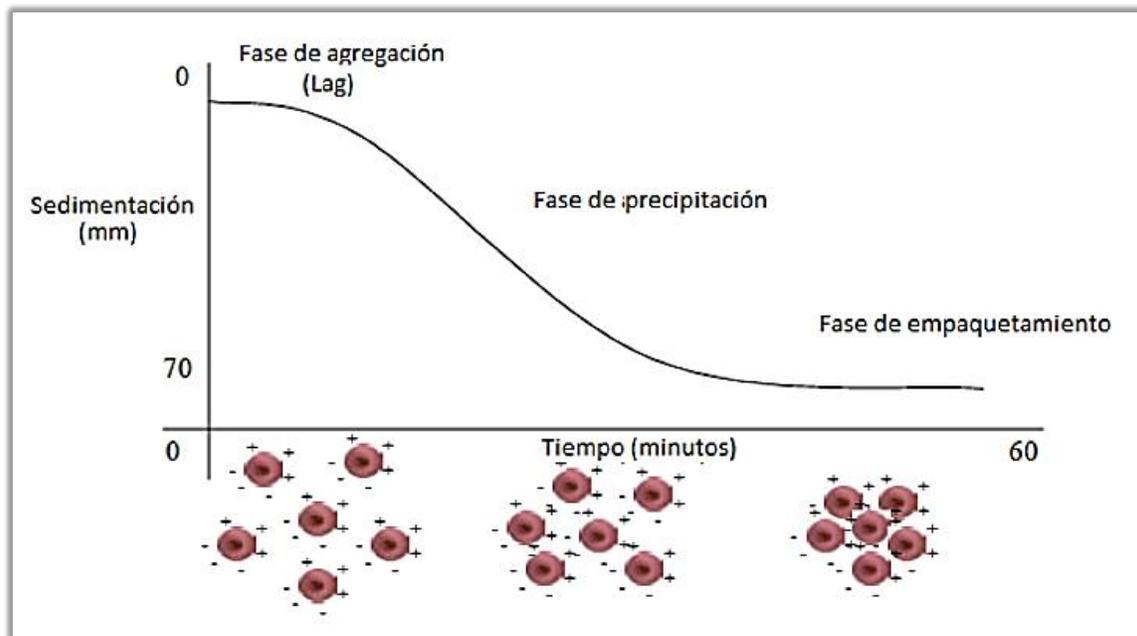


Figura 12. Curva sigmoidea que representa las fases de la sedimentación eritrocitaria, en la parte inferior se observa el efecto de agregación de los eritrocitos en función del tiempo [31].

El resultado de la VSG reportado a los 60 min puede incluir contribuciones variables en las tres fases dependiendo de las condiciones de la muestra de sangre entera [30]. Además, la primera fase de agregación es la más importante, ya que la velocidad de todo el proceso dependerá del tamaño de los agregados. Si los agregados son pequeños entonces la sedimentación será lenta, y si los agregados son grandes entonces la sedimentación será rápida.

3.3. Métodos manuales para la prueba VSG

Para la determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular normalmente se emplean dos procedimientos manuales estandarizados: el *método de Westergren* y el *método de Wintrobe*. Ambos tienen sus propias limitaciones, el método de Westergren es menos sensible a pequeños aumentos de los factores que causan la sedimentación de eritrocitos, mientras que el método de Wintrobe puede dar lecturas bajas incorrectas cuando la VSG de Westergren es elevada. Los dos métodos son altamente sensitivos a la relación plasma-eritrocitos de la muestra [21].

3.3.1. Método de Westergren

El *método de Westergren* es el más utilizado tradicionalmente. Fue propuesto como el método de referencia por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH), por lo que es considerado el estándar de oro para medir la VSG [30]. Este método es poco reproducible y sometido a diversas variables difíciles de controlar, como es la necesidad de prediluir la sangre con anticoagulante.

Para llevar a cabo este método se emplea un *tubo de sedimentación* o *pipeta de Westergren* (pipeta de vidrio especialmente diseñada y estandarizada)



Figura 13. VSG obtenida con el *método de Westergren*, en el cual se observa en una pipeta el desplazamiento de los eritrocitos en *mm*, de una muestra de sangre entera después de 1 hora [6].

con una escala graduada de 200 mm en el fondo hasta 0 mm en la parte superior, y un diámetro interno uniforme de 2.5 mm, ver **Figura 13**. El procedimiento del método se describe a continuación:

1. Primero, extraer 2 ml de sangre humana mediante *punción venosa*. Se recomienda realizar el procedimiento dentro de las 2 horas posteriores a la extracción de la muestra si se mantiene a temperatura ambiente, o dentro de las siguientes 6 horas si se mantiene a 4 °C.
2. Depositar la sangre entera homogeneizada con el anticoagulante (solución de citrato de sodio al 3.8 % en una proporción de 1:4) en la pipeta de Westergren, hasta llegar a la marca en 0 mm.
3. En seguida, colocar la pipeta en una gradilla de sedimentación. Asegurarse de que la pipeta esté en una posición totalmente vertical e inmóvil, exenta de cualquier factor que afecte la sedimentación y la temperatura ambiente de (18 – 25) °C. En ese momento poner en marcha el cronómetro.
4. Después de transcurrida 1 hora, leer en mm el desplazamiento de la columna de eritrocitos (descenso de la interfaz plasma-eritrocito) desde la marca en 0 mm hacia abajo. El valor de esta distancia expresada en mm/hora corresponde a la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG).
5. Finalmente, comparar este resultado con los valores normales de referencia mostrados en la **Tabla 2** para su posterior interpretación.

Una modificación del método de Westergren que produce los mismos resultados requiere de sangre anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en lugar de la solución de citrato de sodio. Esto es conveniente, pues permite medir la VSG usando la muestra del mismo tubo de sangre que se utiliza para realizar otros estudios de laboratorio clínico.

3.3.2. Método de Wintrobe

El método de Wintrobe es una variante metodológica del Método de Westergren, por lo que el procedimiento es semejante. Las diferencias consisten en que este método de Wintrobe utiliza una pipeta de Pasteur únicamente para depositar la muestra en un *tubo de Wintrobe* (pipeta de vidrio especialmente diseñada y estandarizada), el cual es mucho más corto que la pipeta empleada en el método de Westergren. Además, este método requiere

de una mezcla de sangre entera con anticoagulante EDTA K3 en una proporción de 1:10, para lo cual se requieren al menos 2 ml de muestra.

3.3.3. Valores normales de referencia de la VSG

Los valores normales de referencia de la prueba de VSG varían principalmente con la edad, el sexo, el ciclo menstrual y las medicaciones [21], estos valores se muestran en la **Tabla 2**:

Velocidad de Sedimentación Globular (valores normales de referencia)		
Grupo	Edad [años]	Valores [mm/hora]
Recién nacidos		< 02
Niños	< 10	< 10
Mujeres	< 50	< 20
	> 50	< 30
Hombres	< 50	< 15
	> 50	< 20
Embarazadas		40 – 45

Tabla 2. Valores normales de referencia de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) [6].

A partir de 27,912 mediciones de la VSG en adultos entre 20 y 65 años, A. Miller y colaboradores propusieron una fórmula empírica simple para determinar los valores normales de referencia de la VSG en hombres y mujeres sanos [32]:

$$VSG_{hombres} = \frac{edad \text{ (años)}}{2} \quad ; \quad VSG_{mujeres} = \frac{edad \text{ (años)} + 10}{2}$$

3.4. Factores que alteran la VSG

Un valor normal de VSG generalmente asegura que no existe enfermedad orgánica, sin embargo, existen numerosos factores y trastornos con alteraciones proteicas del plasma que afectan este valor [33].

La VSG se ve aumentada en un amplio rango de enfermedades, principalmente relacionadas con las proteínas de fase aguda, además es mayor en mujeres que en hombres, lo cual se correlaciona con la diferencia en las concentraciones de fibrinógeno. Aparte de la edad y el sexo, otras variaciones que interfieren con la prueba VSG son el embarazo, el parto y el puerperio, lo cual es explicable por el aumento de fibrinógeno y de la anemia fisiológica presente en estas situaciones [6]. En un embarazo normal, el incremento de fibrinógeno provoca un aumento de la agregación de eritrocitos y por tanto una VSG elevada. Así también, un hematocrito bajo, causa un aumento de la VSG, probablemente acelerando la agregación y disminuyendo las fuerzas de fricción entre los agregados en sedimentación [21].

La VSG aumenta en la anemia [29], más en la megaloblástica que por deficiencia de hierro [30]. Por otro lado, el aumento de VSG acompaña a las infecciones agudas, enfermedades reumáticas, y suele ser muy elevada en la macroglobulinemia de Waldstrom, enfermedad por crioaglutininas [34]. Las enfermedades que se caracterizan por hiperfibrinogenemia como inflamaciones, infecciones, necrosis tisular, o aumento de inmunoglobulinas como el mieloma múltiple y otras inmunoglobulinopatías presentan alta VSG. En cambio, la presencia de sustancias como lecitinas, ácidos grasos, medicamentos como quinina, fenilbutazona, salicilato de sodio y tiosemicarbazona pueden disminuir la VSG al inhibir la agrupación en pilas de monedas, que además es especialmente baja en la policitemia, anormalidades de eritrocitos (hemoglobinopatías, esferocitosis, anemia falciforme), hipofibrinogenemia e insuficiencia cardiaca congestiva. En la **Tabla 3** se presentan algunos de los factores antes mencionados que intervienen con un incremento o disminución de la VSG.

3.5.Limitaciones de la prueba VSG

La VSG es una prueba altamente inespecífica, con falta de sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, que depende de métodos manuales cuya duración es alrededor de una hora, e implica un alto riesgo profesional por los accidentes relacionados con las pipetas de vidrio empleadas para realizar la prueba, teniendo en cuenta que las muestras pueden ser portadoras de infecciones. Como consecuencia, la VSG como prueba de laboratorio tiene baja utilidad clínica, sus limitaciones la muestran como una prueba obsoleta y candidata a ser retirada de los laboratorios clínicos para

sustituirla por pruebas con mayor sensibilidad, especificidad y mejor desempeño analítico, tales como los reactantes de fase aguda, en particular la proteína C reactiva y los marcadores tumorales [6].

Factores que alteran la VSG	
Incremento ↑	Disminución ↓
Eritrocitos	
Anemia Hematocrito bajo Macrocitosis	Policitemia Hematocrito alto Microcitosis Anisocitosis (marcada) Esferocitosis, Acantocitosis Células falciformes, Drepanocitosis ⤵ Talasemia
Leucocitos	
Leucemia	Leucocitosis (marcada)
Proteínas plasmáticas y Lípidos	
Fibrinógeno ^(CA) , Globulinas ^(CA)	Albúmina ^(CA) Fosfolípidos ^(CA) , Lecitinas ^(CA) Ácidos grasos
Condiciones clínicas	
Envejecimiento Mujeres, Menstruación Embarazo, Parto, Puerperio Malignidad, Mieloma múltiple Enfermedades reumáticas Infecciones agudas, Sífilis Artritis reumatoide, Gota Diabetes mellitus	Recién nacidos Insuficiencia cardiaca congestiva Caquexia
Medicamentos	
Vitamina A, Penicilamina Procainamida, Heparina Dextrano, Teofilina	Cortisona, Quinina Salicilato, Fenilbutazona Tiosemicarbazona, Etambutol
Manejo de muestras y Técnica	
Muestra refrigerada Temperatura ambiente alta Tubo de sedimentación inclinado Vibración	Muestra coagulada Temperatura ambiente baja Diámetro de tubo estrecho Presencia de burbujas Retraso en la prueba

Tabla 3. Factores que intervienen con un incremento o disminución de los valores normales de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) en distintas categorías. (CA: concentración alta en el plasma sanguíneo) [33].

De acuerdo con lo anterior, una opción para no descartar del todo el significado de la prueba VSG tradicional del laboratorio clínico, es estudiando la sedimentación eritrocitaria empleando la Técnica Fotoacústica, la cual no depende de mediciones visuales, sino de la detección ultrasónica propia de la muestra de sangre. Dadas las "Ventajas de la TFA" debidas al tipo de muestra, se puede obtener información característica y más completa a partir de la interpretación de señales fotoacústicas.

3.6.Ley de Stokes

Desde el punto de vista físico, el fenómeno de la sedimentación eritrocitaria depende de los siguientes factores: el tamaño de los eritrocitos, la diferencia de densidad entre los eritrocitos y el plasma, y la viscosidad del plasma. Estos tres factores mencionados se pueden relacionar entre sí a través de la *Ley de Stokes*.

La Ley de Stokes se refiere a la fuerza de resistencia que experimentan las partículas moviéndose dentro de un fluido con viscosidad constante, con flujo laminar y de bajo *número de Reynolds*²⁰ [35]. En general, es válida en el movimiento de partículas esféricas, *discretas*²¹ y pequeñas moviéndose a bajas velocidades, usualmente puede escribirse así:

$F_{stokes} = 6\pi R\eta v$	(3.1)
-----------------------------	-------

donde R es el radio de las partículas, η la viscosidad del fluido o líquido en que están inmersas, y v es la velocidad de las partículas.

De acuerdo con el diagrama de cuerpo libre en la **Figura 14**, tenemos solo dos interacciones de la partícula con otros cuerpos del universo, con la Tierra que las atrae hacia abajo por su peso mg , y con el fluido en que están sumergidas que produce dos fuerzas sobre ellas, el empuje estático F_{emp} y la

²⁰ El *número de Reynolds* es un número utilizado para caracterizar el movimiento de un fluido, su valor indica si se trata de un flujo laminar (número de Reynolds pequeño) o turbulento (número de Reynolds grande).

²¹ Las *partículas discretas* son aquellas partículas que no cambian de características (forma, tamaño y densidad) durante el movimiento.

resistencia viscosa F_{stokes} . La velocidad de sedimentación de las partículas cayendo verticalmente en un fluido viscoso debido a su propio peso es constante, ya que al aumentar la velocidad aumenta la fuerza viscosa y se reduce la aceleración, en el límite en que la aceleración se hace nula la velocidad se hace constante alcanzando su valor límite. Por tanto, cuando la fuerza neta sobre la partícula es cero, la siguiente relación se hace válida:

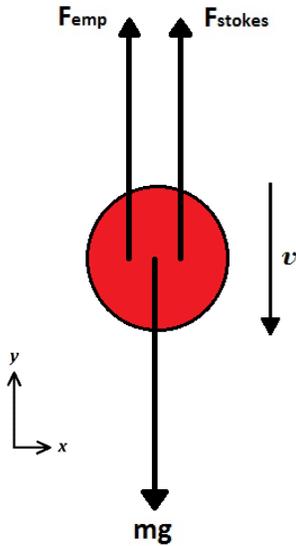


Figura 14. Diagrama de cuerpo libre de una partícula esférica cayendo en un fluido viscoso.

$\sum F_y = ma_y = 0$	(3.2)
$F_{stokes} + F_{emp} = mg$	(3.3)
$6\pi R\eta v + \rho_{líq}V_{par}g = \rho_{par}V_{par}g$	(3.4)
$v = \frac{\rho_{par}V_{par}g - \rho_{líq}V_{par}g}{6\pi R\eta}$	(3.5)
$v = \frac{V_{par}g(\rho_{par} - \rho_{líq})}{6\pi R\eta}$	(3.6)

donde g es la aceleración de la gravedad, ρ_{par} es la densidad de las partículas, $\rho_{líq}$ es la densidad del fluido y v es la velocidad de sedimentación o caída límite de las partículas. Ahora, como el volumen de la partícula se considera para una esfera $V_{par} = \frac{4}{3}\pi R^3$, entonces la llamada velocidad de Stokes v_{stokes} es:

$v_{stokes} = \frac{2R^2g(\rho_{par} - \rho_{líq})}{9\eta}$	(3.7)
---	-------

Sin embargo, la Ley de Stokes no se puede aplicar íntegramente a la sedimentación de eritrocitos porque estas partículas no son esféricas, tienen forma de discos bicóncavos (ver **Figura 8**). En principio, se tiene que utilizar un factor de corrección experimental por no esfericidad k , por lo que la Ley de Stokes se tiene que corregir de la siguiente manera, $F_{stokes} = k6\pi R\eta v$ donde k

es inferior a la unidad. Así, la expresión de la velocidad de Stokes para eritrocitos inmersos en plasma sanguíneo se puede representar como:

$$v_{stokes} = \frac{V_{eritros}g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})}{6\pi Rk\eta} = \frac{2R^2g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})}{9k\eta} \quad (3.8)$$

Es evidente que la velocidad de sedimentación se incrementa con un aumento comparativamente pequeño en R , siendo esta la razón por la cual Fahraeus atribuyó el aumento de la VSG a un aumento en el tamaño de los agregados de eritrocitos [26].

Adicionalmente, el tiempo de sedimentación t_{sed} se obtiene al considerar que las partículas caen una determinada distancia D con velocidad constante, y se utiliza la velocidad de Stokes de la **Ecuación 3.8** considerando que las partículas no son esféricas:

$$t_{sed} = \frac{D}{v_{sed}} = \frac{D6\pi Rk\eta}{V_{par}g(\rho_{par} - \rho_{liq})} = \frac{D9k\eta}{2R^2g(\rho_{par} - \rho_{liq})} \quad (3.9)$$

Dado que el tiempo de sedimentación depende de la diferencia de densidades de las partículas y el líquido, entonces cuando la densidad de las partículas es ligeramente mayor que la densidad del líquido, como el caso de los eritrocitos y el plasma, entonces este factor es ligeramente mayor a cero, por lo que el tiempo de sedimentación se incrementa demasiado. El tiempo de sedimentación es afectado por la forma de la partícula, y se incrementa para el caso de partículas no esféricas comparado con el de partículas esféricas.

Por otra parte, dado que la fórmula de Stokes no es del todo válida al aplicarla a la sedimentación eritrocitaria, se ha propuesto una teoría física en la cual S. Oka propone una fórmula que incluye el efecto del flujo ascendente del plasma y es aplicable al aumento de la VSG debido al crecimiento de los agregados de eritrocitos [36]. Para el desarrollo de esta teoría se utilizan algunos resultados de investigaciones experimentales sobre la sedimentación de eritrocitos con y sin agregación.

3.6.1. Sedimentación de eritrocitos sin agregación

Para la sedimentación de eritrocitos humanos sin agregación, Groom y Anderson observaron microscópicamente la caída de eritrocitos en una *solución de Ringer*²² [37], notaron que las orientaciones celulares en cualquier instante son aleatorias, por lo que concluyeron que un eritrocito puede considerarse como una esfera de radio efectivo $R_{ef} = k_o a = 0.71a$, donde k_o es una constante cuyo valor medio depende de la orientación del disco durante la caída, y a es el radio del disco bicóncavo. Además, Groom y Anderson también encontraron a través del estudio de la velocidad de sedimentación, que el valor medio del radio de Stokes de los eritrocitos es de $2.58 \mu\text{m}$ [37]. Basándose en lo anterior, S. Oka propone escribir la fuerza de resistencia viscosa sobre un eritrocito como:

$$F_{stokes} = 6\pi R_{ef} \eta v f \quad (3.10)$$

donde f es un parámetro de deformabilidad adimensional menor que la unidad, dado que los eritrocitos no son rígidos, el efecto de deformabilidad es importante en la fase de empaquetamiento de la sedimentación eritrocitaria.

Además, también se considera que el efecto de las paredes del tubo en la medición de VSG es generalmente despreciable. El número de Reynolds para la sedimentación de los eritrocitos es bajo, del orden de 10^{-5} , lo cual es insignificante comparado con la unidad. Y no es necesario considerar el efecto de la *difusión*²³ de partículas, ya que un eritrocito no realizará un movimiento browniano activo que impida que sedimente, debido a que su tamaño es considerablemente grande, del orden de μm [36].

La velocidad de sedimentación de eritrocitos está influenciada por la presencia de otras partículas, pues se observa en la interfaz que cuando los eritrocitos descienden se presenta un flujo ascendente de plasma [38], por tanto, la velocidad de sedimentación v_{sed} se hace menor que la velocidad de

²² La *solución de Ringer* es utilizada para reponer fluidos, en ella no ocurre la agregación de eritrocitos, y está compuesta a base de sales inorgánicas, principalmente sodio, potasio y calcio.

²³ La *difusión* es un proceso físico irreversible, en el que las partículas se mueven de una región de mayor concentración a una región de menor concentración hasta conseguirse una distribución uniforme.

Stokes v_{stokes} [36]. La relación v_{sed}/v_{stokes} es una función decreciente de la fracción de volumen H de las partículas $\phi(H) = v_{sed}/v_{stokes}$. De acuerdo con lo anterior, la velocidad de sedimentación se puede representar como:

$$v_{sed} = \frac{V_{eritros}g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})\phi(H)}{6\pi R_{ef}\eta(H)f} \quad (3.11)$$

donde $V_{eritros}$ es el volumen y R_{ef} el radio efectivo de los eritrocitos, g es la constante de la aceleración debida a la gravedad, $\rho_{eritros}$ es la densidad de los eritrocitos, ρ_{plasma} es la densidad del plasma, H es la fracción de volumen de eritrocitos (hematocrito), $\phi(H)$ es un factor de reducción debido al flujo ascendente del plasma, $\eta(H)$ es la viscosidad de la sangre, y f es el parámetro de deformabilidad de los eritrocitos.

A partir de la curva de sedimentación $Y(t)$, donde Y es la distancia de la interfaz plasma-eritrocito desde la parte superior, es decir, la altura del líquido sobrenadante en el tiempo t , entonces tenemos que $v_{sed} = dY(t)/dt$, donde se considera que la fracción de volumen de eritrocitos H en la interfaz cambia con el tiempo, permanece constante mientras la curva de sedimentación es lineal y aumenta con la desaceleración de la caída [38]. Esto conduce a S. Oka a afirmar que la curva de sedimentación eritrocitaria sin agregación nunca se convierte en una sigmoide [36].

3.6.2. Sedimentación de eritrocitos con agregación

La sedimentación de eritrocitos en plasma se acompaña de agregación, y las curvas de sedimentación se vuelven sigmoideas [36]. De acuerdo con la **Ecuación 3.11**, la curva sigmoidea solo es posible cuando $V_{eritros}/R_{ef}$ aumenta con el tiempo. Cuando ocurre la agregación durante la sedimentación se muestra una distribución del tamaño de los agregados, pero este se supone uniforme en cualquier momento [39]. Introduciendo un radio efectivo $R_{ag}(t)$ de un agregado en el tiempo t entonces tenemos $V_{ag}(t) = \frac{4}{3}\pi R_{ag}^3(t)$, donde $V_{ag}(t)$ es el volumen de un agregado en el tiempo t . Por lo que la **Ecuación 3.11** puede generalizarse en la forma:

$$v_{sed} = \frac{2g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})R_{ag}^2(t)\phi(H)}{9\eta(H)f} \quad (3.12)$$

La curva de sedimentación está determinada por $v_{sed} = dY(t)/dt$, donde consecuentemente se tiene que $d^2Y(t)/dt^2 > 0$ en la fase de agregación, ya que $R_{ag}(t)$ aumenta con el tiempo, por lo tanto, se asegura una curva sigmoidea.

De acuerdo con la teoría, es claro que la VSG está marcadamente influenciada por la agregación de eritrocitos, por lo que se añade un parámetro adimensional para la agregación $\alpha = (N^{1/3} - 1)$, además se considera el tiempo de sedimentación t y el tiempo de retardo para la agregación λ (1ª fase: crecimiento de los agregados). De forma general S. Oka presenta la siguiente expresión:

$$v_{sed} = \frac{2g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})R_{ef}^2\phi(H)}{9\eta(H)f} \left[1 + \left(N^{1/3} - 1 \right) \left(1 - e^{-t/\lambda} \right) \right]^2 \quad (3.13)$$

donde R_{ef} es el radio efectivo de un eritrocito y N es el número de eritrocitos del que está compuesto el agregado final. Cuando $t \gg \lambda$ la curva de sedimentación será lineal. En conclusión, la VSG se incrementa con el aumento del tamaño del agregado final y con la disminución del tiempo de retardo para la agregación [36]. En el "Anexo B" se realiza una estimación comparativa de la VSG a partir de la **Ecuación 3.13**, para las muestras de sangre entera sana, con diagnóstico de anemia y dislipidemia, estudiadas en este trabajo.

4. Metodología

En este capítulo se da una descripción específica del equipo básico utilizado, la forma en que se trabajó con las muestras de sangre entera, el arreglo del equipo experimental, y el procedimiento general que se llevó a cabo para la obtención de los resultados.

4.1. Equipo básico

El equipo básico utilizado para llevar a cabo la TFA consiste de: 1) un láser pulsado Nd-YAG *Quantel Brilliant b* (Q-Switched) como fuente de excitación, 2) un osciloscopio digital *Tektronix DPO 5204B*, 3) un sensor piezoeléctrico *TE Connectivity LDT1-028K* como detector de vibraciones, 4) un fotodiodo *Thorlabs PDA10A*, y 5) una celda de cuarzo *Sigma-Aldrich Z276669*.

4.1.1. Láser Pulsado Nd-YAG

El láser pulsado Nd-YAG (acrónimo del inglés *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) es un dispositivo de emisión *láser*²⁴ de estado sólido, cuyo medio activo es un cristal YAG (Yttrium Aluminium Garnet) dopado con neodimio trivalente. Tiene una emisión característica en el infrarrojo cercano, y de acuerdo con su sistema de bombeo puede operar como láser pulsado cuando es excitado usando lámparas de xenón, lo que significa que este tipo de láser es capaz de iluminar por periodos temporales (flashes), es decir, emite luz en forma de pulsos de corta duración con un patrón de repetición, particularidad que lo diferencia del láser CW que emite luz de forma continua.

En el arreglo experimental se usó un láser pulsado *Quantel Brilliant b* (Q-Switched), cuya longitud de onda de emisión es 1064 nm, pero mediante el uso de módulos intercambiables (espejos dicróicos usados como separadores armónicos) se puede ampliar su capacidad para generar longitudes de onda

²⁴ Un *láser* (acrónimo del inglés *light amplification by stimulated emission of radiation*) es una fuente luminosa que produce un haz de luz colimado, aproximadamente monocromático, y altamente coherente tanto espacial como temporalmente.

de 532, 355, 266, y 213 nm [40]. La frecuencia de repetición del pulso es de 10 Hz, la duración o anchura del pulso es de 5 ns, y la energía máxima que puede alcanzar es de 400 mJ/pulso [41]. Para este trabajo se irradió convenientemente a las muestras utilizadas únicamente con una longitud de onda de 532 nm y una energía promedio de aproximadamente 1.8 mJ/pulso.

4.1.2. Osciloscopio digital

El osciloscopio digital es un instrumento electrónico que muestra oscilaciones de ondas o señales eléctricas de manera gráfica, las cuales son generadas en respuesta a determinados estímulos físicos, como sonido, tensión mecánica, presión, luz o calor.

En este caso se usó un *Tektronix DPO 5204B Digital Phosphor Oscilloscope* [42], con un ancho de banda de 2 GHz y una velocidad de muestreo de 10 GS/s. El osciloscopio dispone de cuatro canales analógicos para la adquisición de la información, de los cuales se utilizó uno para la conexión del fotodiodo y otro para el sensor piezoeléctrico de PVDF. Todos los datos fueron exportados a través de una memoria USB para ser procesados en una computadora.

4.1.3. Sensor piezoeléctrico PVDF

Un sensor piezoeléctrico es un dispositivo diseñado para detectar fenómenos físicos a través del *efecto piezoeléctrico*²⁵, por lo que es aplicable para medir presión, tensión, detección de movimiento, vibración o impacto.

El *fluoruro de polivinilideno* (PVDF) es el polímero piezoeléctrico más desarrollado. Este material en forma de lámina delgada es flexible, por lo que suele emplearse comúnmente como sensor de contacto y transductor acústico [43]. El PVDF tiene varias ventajas comparado con otros piezoeléctricos: es

²⁵ El *efecto piezoeléctrico* fue descubierto en 1880 por Jackes y Pierre Curie en cristales de cuarzo. El fenómeno se produce en determinados sistemas cristalinos y consiste en la aparición de una polarización eléctrica en un material al deformarse bajo la acción de un esfuerzo mecánico. Es un efecto reversible, pues aparece una deformación cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre dos caras del material.

resistente, ligero, tiene una elevada resistencia a altas temperaturas, estable ante radiación UV, alta rigidez y resistencia a la deformación, buena resistencia mecánica, baja conductividad térmica, alta resistencia a químicos y corrosión, presenta un amplio ancho de banda, rápida respuesta electromecánica, y es biológicamente compatible. El polímero tiene baja constante dieléctrica, baja rigidez elástica y baja densidad, lo cual da como resultado sensores de excelente sensibilidad. Otras características atractivas del material polimérico piezoeléctrico frente al cerámico son su baja impedancia acústica y mecánica, y tiene una constante de deformación piezoeléctrica más baja, pero una constante de tensión piezoeléctrica mucho más alta, su salida de alto voltaje es alrededor de diez veces mayor para la misma entrada de fuerza, por lo que los sensores poliméricos son mejor valorados que los cerámicos [44].

La aplicación de estos piezoeléctricos se incluye en micrófonos, altavoces, dispositivos de ultrasonido, dispositivos de conversión de energía, actuadores, sensores táctiles, hidrófonos, controles de vibración, y dispositivos para medir tensión, aceleración y propiedades ópticas [45]. Las aplicaciones en el campo de la medicina se dan en el monitoreo de la respiración, medición de pulso arterial, y distribución de presión entre cuerdas vocales.

En el arreglo experimental de este trabajo se usó un *LDT1-028K Piezo Sensor* de PVDF de *TE Connectivity's Measurement Specialties* [46], el cual no requiere de una fuente de alimentación externa, y puede utilizarse como sensor de vibración o impacto, produciendo como salida una señal eléctrica cuando se le aplican fuerzas al área de detección. Las dimensiones de la lámina transparente de poliéster (Mylar) que protege a la película piezoeléctrica son 41.40 mm × 16.26 mm con un espesor de 1.57 mm; el rango de temperatura de funcionamiento es de (0 – 70) °C; y el voltaje de salida es de (10 – 100) mV, dependiendo del impacto e impedancia del circuito. Además, la frecuencia más baja medible con una película piezoeléctrica es del orden de 10^{-3} Hz, y puede detectar frecuencias hasta de 10^9 Hz [47].

En la **Figura 15 (A)** se muestra la señal de respuesta correspondiente al sensor piezoeléctrico de PVDF *TE Connectivity LDT1-028K* al ser irradiado directamente con el láser pulsado, usando una longitud de onda de 532 nm y una energía de 1.8 mJ/pulso. En la **Figura 15 (B)** se presenta la Transformada rápida de Fourier (FFT) aplicada a la misma señal de respuesta.

Respuesta del sensor piezoeléctrico PVDF (TE Connectivity LDT1-028K)

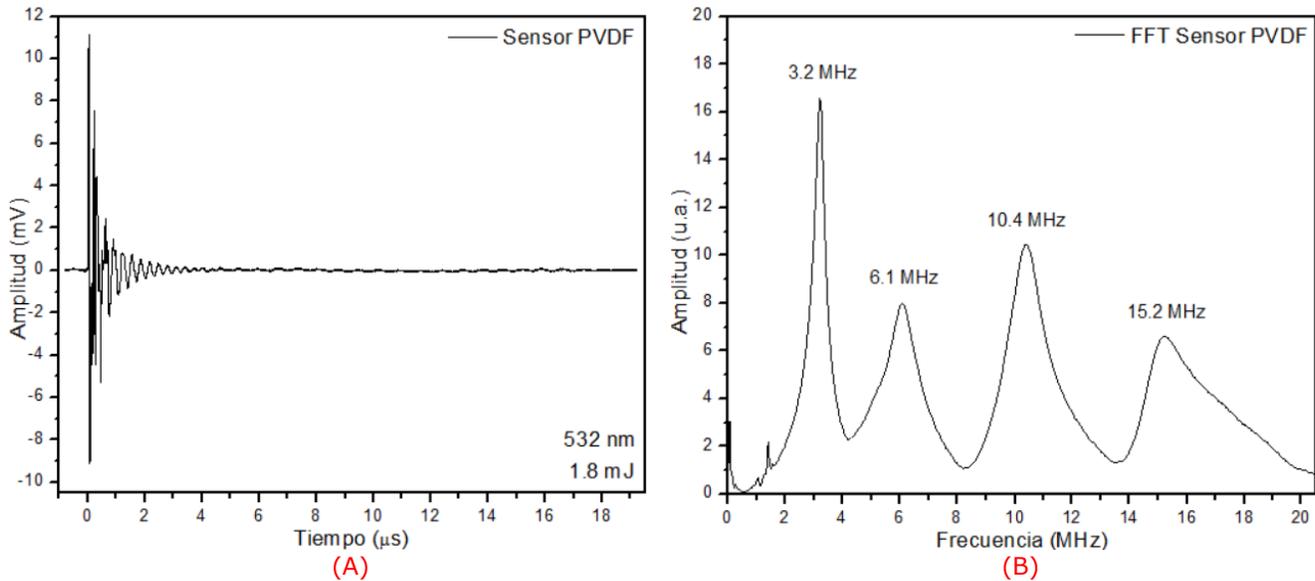


Figura 15. (A) Señal de respuesta del *LDT1-028K Piezo Sensor* de PVDF irradiado directamente por el láser pulsado con una longitud de onda de 532 nm y una energía de 1.8 mJ/pulso. **(B)** Transformada rápida de Fourier (FFT) aplicada a la misma señal de la Figura (A).

4.1.4. Fotodiodo

Un fotodiodo es un dispositivo que puede utilizarse como detector de luz, que es capaz de generar una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de iluminación. El material empleado en la composición del fotodiodo es un factor importante para definir sus propiedades, la sensibilidad a determinados intervalos de longitud de onda depende del material semiconductor.

En este trabajo se utilizó un *Thorlabs PDA10A Silicon Amplified Detector* [48] como mecanismo de disparo del osciloscopio, para observar y estabilizar la señal fotoacústica detectada por el sensor piezoeléctrico. Además, está diseñado para detectar señales de luz, en este caso pulsos láser, que pueden tener una longitud de onda desde (200 – 1100) nm, con un ancho de banda de 150 MHz y un área activa de 0.8 mm². Este tipo de detector es recomendable para medir fuentes de luz continua o pulsada.

4.1.5. Celda de cuarzo

La celda de cuarzo es una cubeta donde se introducen muestras líquidas, es transparente y sin impurezas que puedan afectar la lectura durante los experimentos de espectroscopía. El cuarzo tiene un elevado grado de pureza, por lo que debido a su transparencia sus propiedades ópticas son mejores que la de los vidrios tradicionales, es capaz de transmitir en su mayor parte la radiación perteneciente al espectro de la radiación visible y ultravioleta.

En el arreglo experimental se usó una celda de cuarzo *Sigma-Aldrich Z276669* rectangular estándar cuyo volumen es de 3.5 ml, sus dimensiones son de 48 mm × 12.5 mm × 12.5 mm, con una longitud de trayectoria óptica de 10 mm, su rango de transmisión espectral es de (170 – 2700) nm [49] y su transmitancia es superior al 80 % para haces de longitud de onda de 532 nm, la cual fue utilizada en este trabajo.

4.2. Muestras: Preparación

En este trabajo se emplearon muestras de sangre entera pertenecientes a tres grupos principales: 1) muestras de sangre provenientes de donadores sanos, 2) muestras de sangre rechazadas por el Banco de Sangre por ser catalogadas con dislipidemia, y 3) muestras de sangre de pacientes diagnosticados con anemia hemolítica.

Las muestras provenientes de donadores sanos y muestras catalogadas con dislipidemia fueron proporcionadas por el Banco de Sangre, mientras que las muestras de sangre diagnosticadas con anemia hemolítica fueron proporcionadas por el Laboratorio de Hematología Especializada (LHE). Todas las muestras otorgadas se encontraban centrifugadas sin presencia de *hemólisis*²⁶. Las muestras se transportaron con precaución al laboratorio de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) situado en el mismo Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (HGM).

²⁶ La *hemólisis* es visible después de la centrifugación de las muestras, donde el plasma sanguíneo muestra una coloración rojiza, es un factor de interferencia importante en las mediciones de laboratorio, algunas veces no se aprecia visualmente, por lo que puede provocar resultados erróneos [50].

La determinación de que las muestras de sangre provinieran de donadores sanos se estableció con base en los valores y especificaciones de la biometría hemática y *serología*²⁷ proporcionadas por el Banco de Sangre. También se proporcionaron las biometrías hemáticas correspondientes a las muestras de anemia hemolítica por parte del LHE. Dado que las personas con dislipidemia no fueron aceptados para donación en Banco de Sangre, no se les realizaron estudios clínicos a estas muestras.

La preparación de las muestras para ser medidas en el laboratorio es un proceso simple. Antes de extraer la sangre contenida en el *Tubo Vacutainer*²⁸ con el anticoagulante, la muestra se debe mezclar cuidadosamente bajo un *procedimiento de homogenización* como en la **Figura 16** para conservar la concentración de células de forma homogénea en todo su volumen, esto debido a que las muestras proporcionadas se encuentran bajo un proceso de centrifugación en el que se separan los componentes principales de la sangre entera, o bien, con el tiempo se produce la sedimentación de células por diferencia de densidad, de ahí el hecho de que los eritrocitos tiendan a ir al fondo del Tubo Vacutainer y el plasma quede en la parte superior.



Figura 16. El procedimiento de homogenización de la sangre entera consiste en un mezclado de $8 \times 8 \times 8$, en el que se toma el Tubo Vacutainer y se rota suavemente 8 veces de forma vertical hacia arriba, 8 veces de forma vertical hacia abajo y 8 veces simulando el movimiento en forma de un número ocho, procurando no realizar movimientos bruscos que provoquen daño a las células eritrocitarias (Imagen tomada del Laboratorio de Banco de Sangre).

²⁷ La *serología* es un estudio de laboratorio fundamental para realizar donaciones de sangre, permite detectar infecciones o que tanto el individuo es inmune a una infección o enfermedad específica, tales como el sarampión, rubeola, VIH, hepatitis, sífilis, entre otras.

²⁸ El *Tubo Vacutainer* es un tubo de plástico para la recolección de sangre entera, es utilizado en el laboratorio clínico, se identifica con un tapón de color violeta, y contiene como aditivo el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el cual se mezcla con la sangre cuando se recolecta y tiene la función de preservar la muestra retrasando la coagulación, esto permite tener una menor probabilidad de hemólisis.

Una vez que la sangre entera se encuentra completamente homogeneizada, se extrae directa e inmediatamente del Tubo Vacutainer para vaciarla adecuadamente en la celda de cuarzo.

Es importante mencionar que el transporte y manejo de las muestras se debe realizar con delicadeza para evitar que las células eritrocitarias sean dañadas. De esta manera no se provoca el fenómeno de la hemólisis [50], lo cual puede interferir con las mediciones realizadas en este trabajo. Además, se debe utilizar en todo momento: guantes de látex, bata, tapabocas y gafas protectoras de radiación láser, como medida preventiva de seguridad.

4.3. Arreglo experimental

El arreglo del equipo básico y la configuración utilizada para la detección de señales fotoacústicas correspondientes al monitoreo de la sedimentación de eritrocitos de muestras de sangre entera, se muestra en la **Figura 17**. Este arreglo se describe a detalle en la siguiente sección "Procedimiento General".

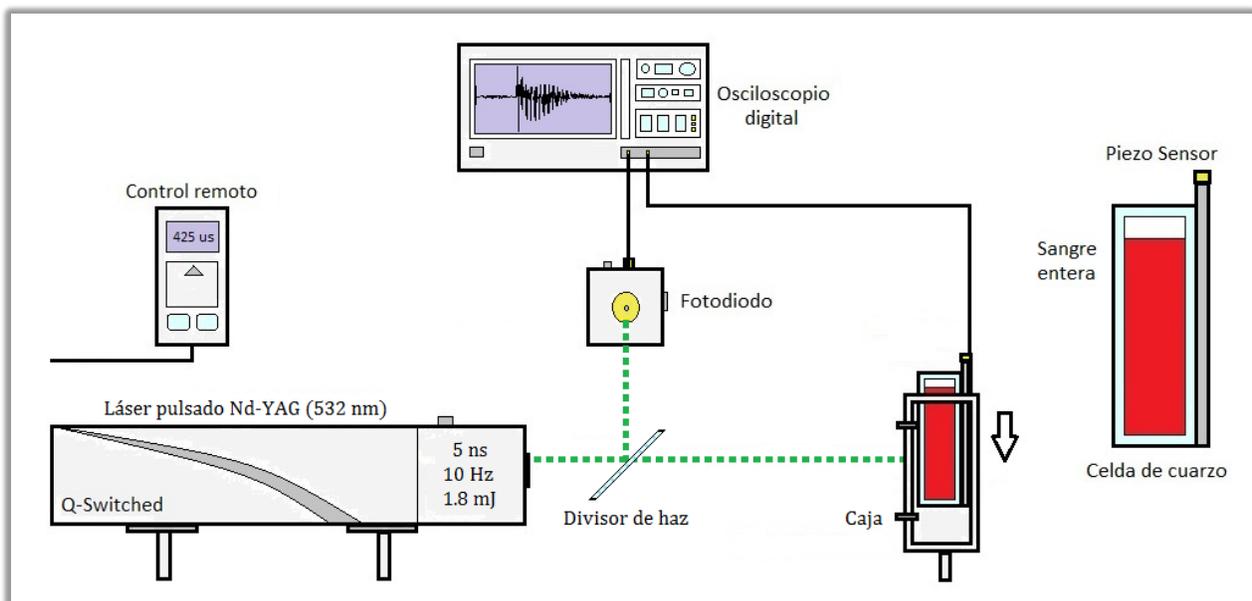


Figura 17. Arreglo experimental y configuración esencial para la detección de señales fotoacústicas de una muestra de sangre entera. La muestra colocada al interior de la celda de cuarzo fue irradiada directamente por el láser pulsado Nd-YAG con una longitud de onda de 532 nm y una energía de 1.8 mJ/pulso.

4.4.Procedimiento General

Las señales fotoacústicas se obtuvieron después de cerciorarse que la muestra de *sangre entera*²⁹ es capaz de absorber la longitud de onda de 532 nm emitida por el láser pulsado. Esto se confirmó obteniendo su espectro de absorción óptico, el cual se muestra más adelante en la sección "Espectros de Absorción" en el Capítulo 5. Así se garantiza la absorción de luz verde por parte de la muestra, y por consecuencia la generación del efecto fotoacústico.

Se trabajó en un entorno de temperatura controlada, alrededor de 20 °C. Previamente a irradiar la muestra de sangre entera con el láser pulsado, primero se homogeneizó dentro del Tubo Vacutainer con anticoagulante, tal como se describe en la sección "Muestras: Preparación". Inmediatamente después, la sangre homogeneizada fue cuidadosamente vertida dentro de la celda de cuarzo a un volumen fijo, para esto se tomaron 2 de los 3.5 ml que contiene el Tubo Vacutainer. Este volumen se utilizó convenientemente considerando que el spot del láser se mantuvo a una altura fija, ver **Figura 18**.

Luego, de acuerdo con el arreglo experimental de la **Figura 17**, la celda de cuarzo con muestra se colocó dentro de una caja que funciona como soporte; ésta se montó a una distancia de 40 cm de la fuente de iluminación láser, procurando que la cara frontal de la celda de cuarzo se encontrara de manera transversal a la trayectoria del láser. El sensor piezoeléctrico de PVDF fue acoplado a la cara trasera de la celda usando cinta doble-cara. Y la caja ayudó a mantener de manera controlada el acoplamiento de la celda con el sensor piezoeléctrico por medio de un ajuste mecánico usando tornillos. Dicho sensor se conectó a través de un cable coaxial con BNC (Bayonet Neill-Concelman) que fue conducido a uno de los canales del osciloscopio.

El monitoreo se inició tomando en cuenta que la muestra estaba totalmente homogeneizada (**Figura 18 A**), entonces se tomó como distancia inicial el límite superior del líquido. Se iluminó la muestra con láser y se comenzó a tomar el tiempo de sedimentación con el cronómetro. Los datos de las señales obtenidas fueron capturados cada 2 o 4 min. Conforme se dio el

²⁹ En la *sangre entera*, la hemoglobina son las moléculas que absorben la luz, y estas se distribuyen uniformemente dentro de los eritrocitos. La hemoglobina es la responsable de los efectos térmicos iniciales después de la absorción del pulso láser [20].

proceso de sedimentación de eritrocitos, la zona de la muestra irradiada por el láser tenía una concentración cada vez menor (**Figura 18 B**). El monitoreo finalizó una vez que los eritrocitos sedimentaron lo suficiente como para que el spot del láser irradiara completamente al plasma (**Figura 18 C**). Se detuvo el cronómetro y se tomó como distancia final el límite inferior del spot, el cual se encontró justo por encima de la interfaz plasma-eritrocito. Se registró el tiempo transcurrido (medido en min) y la distancia total recorrida por los eritrocitos dentro de la celda (medida en mm). En el momento en el que el spot le pegó directamente al plasma ya no se observó señal fotoacústica en la pantalla del osciloscopio (**Figura 18 C**).

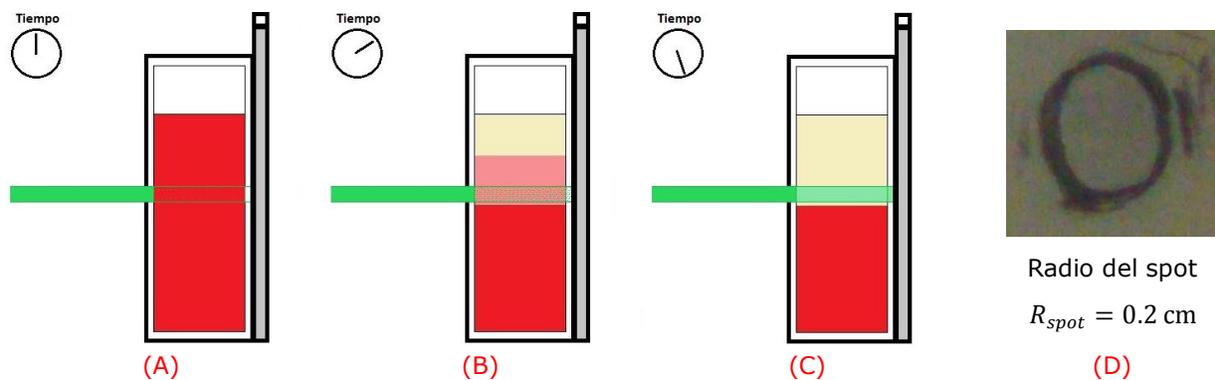


Figura 18. Esquema del monitoreo en el que se representa la zona iluminada por el láser pulsado de una muestra de sangre entera durante el proceso de sedimentación eritrocitaria. **(A)** En el tiempo inicial la muestra está totalmente homogeneizada, se corre el cronómetro. **(B)** En este tiempo la zona iluminada por el láser tiene menor concentración de eritrocitos. **(C)** En este tiempo la sedimentación eritrocitaria es suficiente para que el spot del láser no ilumine a los eritrocitos, se detiene el cronómetro. Para efectos de claridad no se dibujó la caja con tornillos de la Figura 17. **(D)** Tamaño del spot del láser que ilumina la muestra (detectado con papel fotosensible y cuya circunferencia fue delineada para una mejor apreciación).

Un aspecto importante es que la *energía* de salida del láser irradiada sobre la muestra se calculó midiendo la potencia del spot del láser con un delay de $FL - QS Dly = 425 \mu s$ (ajuste con control remoto del tiempo de retardo entre la lámpara de flash y el orden de disparo del Q-Switch), para esto se usó un potenciómetro y se obtuvo una lectura en *potencia* de $P = 18 \text{ mW}$, además considerando que la *frecuencia de repetición* de los pulsos del láser es $f = 10 \text{ Hz}$, entonces la energía irradiada equivale a $E = PT = P/f = 18 \text{ mW}/10 \text{ Hz} \Rightarrow E = 1.8 \text{ mJ}$, siendo ésta la energía elegida para la observación de señales FA nítidas, de buen tamaño y bien definidas, además de plantear como propósito irradiar las muestras con la menor cantidad de energía para no dañar a las células. Conocida la energía irradiada $E = 1.8 \text{ mJ/pulso}$ y el tamaño del spot,

cuyo radio fue $R_{spot} = 0.2 \text{ cm}$ (**Figura 18 D**), entonces en la **Ecuación 4.1** se presenta la *fluencia*.

$$F = \frac{E}{A} = \frac{E}{\pi(R_{spot})^2} = \frac{1.8 \text{ mJ}}{\pi(0.2 \text{ cm})^2} \Rightarrow F = 14.32 \text{ mJ/cm}^2 \quad (4.1)$$

Cabe señalar que en la UIDT se realizó un estudio para verificar que con este valor de energía/fluencia no se producen alteraciones relacionadas con la morfología de los eritrocitos después de ser irradiados por el láser. Esto se realizó a través de contar la viabilidad de las células mediante frotis de sangre entera [51]. En trabajos publicados en los que se usan pulsos láser se ha reportado que la viabilidad de las células de levadura disminuye a medida que la fluencia del láser aumenta de 85 a 1500 mJ/cm² [52]. Y, en estudios de células eritrocitarias individuales, usando una longitud de onda de 532 nm, se encontró que la probabilidad de daño inducido por láser en fluencias por debajo de 2500 mJ/cm² es nula, mientras que el umbral de daño se encuentra dado por una distribución normal con un valor medio de 4350 mJ/cm². Además, la regla general afirma que cuanto mejor sea el estado de la célula, menor será su umbral de daño por láser [20]. Considerando lo anterior, en este trabajo se utilizó una fluencia muy por debajo de estos valores reportados, por lo que se puede asegurar que no se generó daño a los eritrocitos.

Las señales eléctricas se visualizaron de forma estática en el osciloscopio seleccionando una escala vertical (voltaje) de 1 mV/div y una escala horizontal (tiempo) de 2 μs/div (de un total de diez divisiones mostradas en la pantalla), se capturaron 100,000 S (puntos o muestras) por cada archivo de datos correspondiente a cada una de las mediciones por cada tiempo durante el monitoreo, por tanto la velocidad de muestreo fue $v_m = (100,000 \text{ S}) / (2 \mu\text{s})(10) = 5 \text{ GS/s}$. Los archivos de datos se salvaron en archivos de valores separados por comas (.csv), y se fueron transfiriendo a la computadora para almacenar la información en una base de datos con el software *OriginPro*.

El procedimiento anterior se realizó para un total de 42 muestras de sangre entera, de las cuales 11 fueron de donadores sanos, 15 de pacientes diagnosticados con anemia hemolítica, y 16 de personas rechazadas por el Banco de Sangre por ser catalogadas con dislipidemia.

5. Resultados y Análisis

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos al llevar a cabo lo descrito en la sección "Procedimiento General" del Capítulo 4 "Metodología". Los valores de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) de los grupos de sangre entera se obtuvieron y analizaron mediante dos métodos: Método Visual (MV) y Método Fotoacústico (MF); cada método será presentado y descrito en este capítulo por separado. Las señales fotoacústicas se guardaron en archivos de datos (.csv) salvados del osciloscopio digital, y se procedió a exportarlos a una computadora para analizarlos utilizando distintas herramientas matemáticas del software *OriginPro*. El análisis estadístico se llevó a cabo usando herramientas del software *SPSS Statistics*.

5.1.VSG con Método Visual (MV)

Para calcular la VSG mediante lo que llamamos el Método Visual, se consideró, de lo descrito detalladamente en el "Procedimiento General", lo siguiente: con base en la **Figura 18**, después de homogeneizar la muestra de sangre y colocarla en la celda de cuarzo, se tomó como distancia inicial el límite superior del líquido, luego se procedió a iluminar la muestra con el láser y se comenzó a tomar el tiempo, después de que los eritrocitos sedimentaron lo suficiente como para que el spot del láser estuviera encima de la interfaz plasma-eritrocito, entonces se registró el tiempo en min y la distancia final en mm. Con la distancia recorrida y el tiempo de sedimentación se obtuvieron los valores de la Velocidad de Sedimentación Globular a través del Método Visual (VSG MV), mostrados en la **Tabla 4**. El tiempo medido originalmente en min fue transformado a horas para calcular las velocidades con unidades de mm/hora.

5.1.1. Tabla de Datos

En la **Tabla 4** se muestran los ID de las muestras, la medición de Distancia y Tiempo para calcular la VSG a través del Método Visual (VSG MV). Las muestras son ordenadas por grupos de acuerdo con la siguiente clasificación: Sana, Anemia Hemolítica y Dislipidemia de grado 3 + y 4 +.

Velocidad de Sedimentación Globular (Método Visual)									
#	ID	Distancia [mm]	Tiempo [horas]	VSG MV [mm/hora]	#	ID	Distancia [mm]	Tiempo [horas]	VSG MV [mm/hora]
Sana									
1	S1	8.0	0.92	8.73	7	S7	7.0	8.67	0.81
2	S2	8.0	0.77	10.43	8	S8	8.0	2.47	3.24
3	S3	8.0	0.40	20.00	9	S9	8.0	0.93	8.57
4	S4	8.0	1.23	6.49	10	S10	8.0	0.97	8.28
5	S5	8.0	0.77	10.43	11	S11	8.0	1.60	5.00
6	S6	6.0	2.73	2.20					
Anemia Hemolítica									
12	A1	8.0	0.60	13.33	20	A9	7.0	0.52	13.55
13	A2	6.0	0.20	30.00	21	A10	6.0	0.43	13.85
14	A3	9.0	0.20	45.00	22	A11	5.0	0.20	25.00
15	A4	9.0	0.70	12.86	23	A12	8.0	1.13	7.06
16	A5	9.0	0.40	22.50	24	A13	8.0	1.63	4.90
17	A6	9.0	1.23	7.30	25	A14	8.0	0.18	43.64
18	A7	10.0	0.43	23.08	26	A15	4.0	0.57	7.06
19	A8	8.0	0.28	28.24					
Dislipidemia 3+									
27	L31	8.0	1.00	8.00	31	L35	8.0	1.10	7.27
28	L32	10.0	0.30	33.33	32	L36	9.0	2.00	4.50
29	L33	10.0	0.47	21.43	33	L37	8.0	1.63	4.90
30	L34	8.0	0.80	10.00	34	L38	9.0	1.13	7.94
Dislipidemia 4+									
35	L41	8.0	1.13	7.06	39	L45	8.0	1.00	8.00
36	L42	8.0	0.82	9.80	40	L46	8.0	0.93	8.57
37	L43	8.0	1.17	6.86	41	L47	8.0	1.00	8.00
38	L44	9.0	0.58	15.43	42	L48	8.0	0.23	34.29

Tabla 4. Tabla de datos correspondientes al Método Visual (MV). Los valores de VSG MV se calcularon a partir de la medición visual de Distancia y Tiempo de la sedimentación de los eritrocitos dentro de una celda.

De un total de 42 muestras mostradas en la **Tabla 4**, se descartaron aquellas con valores extremos en el tiempo de sedimentación, estas fueron $ID = \{S7, A13, L32, L48\}$. Una posible causa de este comportamiento es que se hayan clasificado incorrectamente al considerar que provienen de sujetos sanos o con uno de los trastornos estudiados [53]. También se puede deber a algún factor técnico o manejo incorrecto de las mismas que provocó hemólisis y consecuentemente errores en la medición [50], tal como un transporte inadecuado, agitaciones bruscas, utilización tardía (la medición de la VSG después de una hora es poco fiable), refrigeración de las muestras, variaciones importantes en la temperatura de la zona de trabajo u otra alteración técnica presente en la **Tabla 3** del Capítulo 3 sección "Factores que alteran la VSG".

5.1.2. Datos descriptivos MV

De acuerdo al Método Visual, en la **Tabla 5** se presenta para cada grupo de sangre de la **Tabla 4** el número de muestras a considerar y su porcentaje con respecto al total de muestras, la media de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG MV), su respectiva desviación estándar y error estándar.

Datos descriptivos (Método Visual)					
Grupo	Frecuencia (N)	Porcentaje (%)	Media [mm/hora]	Desviación estándar	Error estándar
Sana	10	26.4	8.34	4.98	1.57
Anemia	14	36.8	20.89	12.56	3.36
Dislipid. 3+	7	18.4	9.15	5.74	2.17
Dislipid. 4+	7	18.4	9.10	2.96	1.12
Total	38	100	13.25	10.16	1.65

Tabla 5. Datos descriptivos correspondientes al Método Visual (MV) para cada grupo: frecuencia, porcentaje, media de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG MV), desviación estándar y error estándar de la media.

5.1.3. Prueba de normalidad

La prueba de normalidad no paramétrica *Kolmogorov-Smirnov* fue aplicada sobre el tamaño de muestra $N = 38$ para comprobar si el conjunto de valores de la variable Velocidad de Sedimentación Globular (VSG MV) (cuantitativa continua) está bien modelado por una distribución normal. Aplicando esta prueba se obtuvo como resultado una significancia estadística cuyo valor fue $p = 0.024 < 0.05$, por lo que los valores se distribuyen aparentemente de manera no normal, sin embargo, para poder aplicar futuros procedimientos estadísticos nos apoyamos en el *Teorema del Límite Central*, el cual establece que **“cuando el tamaño N de la muestra es lo suficientemente grande, entonces se garantiza una distribución aproximadamente normal”**. Considerando el alcance de este teorema fundamental en estadística, se aplicó más adelante una prueba paramétrica para el Análisis de la Varianza (ANOVA) [54] de los grupos estudiados.

En la **Figura 19 (A)** se presenta el histograma que representa la distribución de frecuencias de la variable VSG MV con una escala lineal, como se puede observar esta distribución es asimétrica y sesgada hacia la izquierda (con valores concentrados a la izquierda de la distribución). Una causa de este comportamiento asimétrico es debido a que las mediciones provenientes de muestras biológicas cubren una amplia gama de valores (mucha variabilidad), pero principalmente es por tratarse de un sesgo de selección [53], puesto que solo se incluyen tres grupos generales de sangre (Sana, Anemia y Dislipidemia) dentro de una gran variedad de grupos que se están excluyendo.

En la **Figura 19 (B)** se muestra la distribución de frecuencias después de la aplicación de una transformación logarítmica $\log_{10}(x)$ a la escala lineal de velocidades (VSG MV) de la **Figura 19 (A)**, con el fin de mejorar las suposiciones sobre la normalidad de la distribución, de esta manera se reduce el rango de los valores medidos, es decir, se comprime a los valores más altos para que sean más comparables con los valores bajos, así se puede visualizar una distribución considerablemente simétrica.

Histograma de Velocidades de Sedimentación Globular (Método Visual)

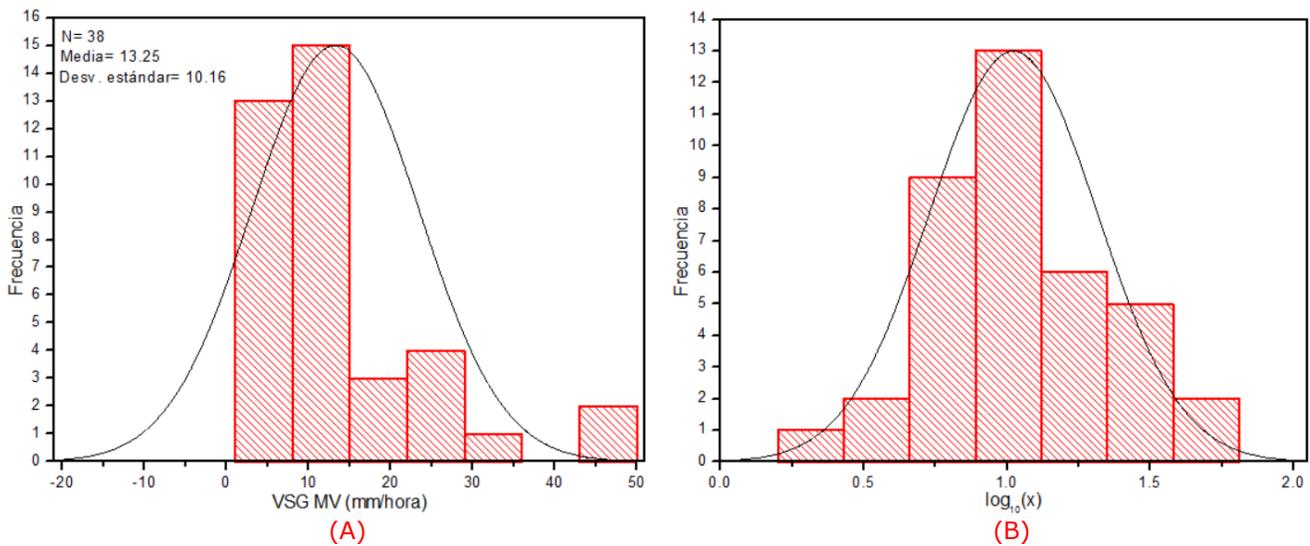


Figura 19. Histograma que representa la distribución de frecuencias de las Velocidades de Sedimentación Globular a través del Método Visual (VSG MV) con: **(A)** escala lineal y **(B)** escala logarítmica.

5.1.4. ANOVA de un factor

El Análisis de la Varianza (ANOVA)³⁰ es una prueba estadística paramétrica utilizada para contrastar las medias de la variable cuantitativa VSG MV entre los cuatro grupos de la **Tabla 5**. Este análisis comprueba si las medias de los grupos son diferentes y pertenecen a distintas poblaciones.

En principio, se asume una *hipótesis nula* que afirma que NO existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la VSG MV de los cuatro grupos de sangre, es decir, son iguales; mientras que la *hipótesis alterna* afirma que SI existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de estos grupos, y por tanto al menos dos de las cuatro medias de los grupos son diferentes.

Antes de realizar el ANOVA se supone que la distribución de los datos es considerablemente normal (**Figura 19**). Se considera que la variable estudiada es cuantitativa continua, que el tamaño de la muestra es $N > 30$ y que el factor categórico es el grupo de sangre. Además, se aplicó una prueba de *Levene* para determinar la homogeneidad de las varianzas, obteniendo el valor $p = 0.002$ menor que el nivel habitual $p = 0.05$, por lo que las varianzas no son iguales, son heteroscedásticas, condición que se considera posteriormente.

Los resultados al ejecutar el ANOVA de un solo factor arrojaron un valor estadístico $F = 5.819$ acompañado del valor de significación observado $p = 0.003$, puesto que p es menor que el nivel de significación habitual $p = 0.05$, entonces se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alterna, y consecuentemente se puede concluir que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente significativas, es decir, al menos dos de las cuatro medias de los grupos de sangre de la **Tabla 5** son diferentes.

Posteriormente, para contrastar específicamente entre las medias de los cuatro grupos de sangre, es decir, para saber que media difiere de que otra por parejas de grupos, se realizó el análisis *Post Hoc: comparaciones múltiples*

³⁰ El ANOVA de un factor relaciona dos variables: la variable dependiente, escalar, cuantitativa (VSG MV); y la variable independiente, nominal, categórica o factor (grupo de sangre).

asumiendo que las varianzas no son iguales, para esto se optó por la prueba *T2 de Tamhane* considerando un nivel de significación $p = 0.05$, los resultados obtenidos de esta prueba se muestran en la **Tabla 6**.

Post Hoc: comparaciones múltiples (Prueba T2 de Tamhane)				
Grupo (I)	Grupo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. p
Sana	Anemia	-12.554	3.709	0.020
	Dislipid. 3 +	-0.812	2.680	1.000
	Dislipid. 4 +	-0.766	1.931	0.999
Anemia H.	Sana	12.554	3.709	0.020
	Dislipid. 3 +	11.742	3.998	0.050
	Dislipid. 4 +	11.788	3.539	0.026
Dislipid. 3+	Sana	0.812	2.680	1.000
	Anemia	-11.742	3.998	0.050
	Dislipid. 4 +	0.046	2.440	1.000
Dislipid. 4+	Sana	0.766	1.931	0.999
	Anemia	-11.788	3.539	0.026
	Dislipid. 3 +	-0.046	2.440	1.000

Tabla 6. Post Hoc: comparaciones múltiples para ANOVA de un solo factor usando prueba *T2 de Tamhane*, cuyo valor de significación observado (Sig.) representa las diferencias marcadas entre parejas de grupos. La diferencia de medias es significativa al nivel de $p = 0.05$.

De acuerdo con los valores de significación observados (*Sig.*) arrojados en la prueba *T2 de Tamhane* en la **Tabla 6**, se determinó que el grupo de Anemia Hemolítica presenta diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ respecto al grupo de sangre Sana y Dislipidemia 4 +, mientras que se mantiene justo al borde $p = 0.05$ con el grupo de Dislipidemia 3 +. Una posible causa de que este último valor no sea tan marcado se debe a la clasificación subjetiva de los grados de dislipidemia en el Banco de Sangre, ya que la clasificación se realiza visualmente, pues aún no se cuenta con un sistema automatizado que determine los grados de dislipidemia con mayor precisión. Por otra parte, todos aquellos valores con $p > 0.05$ aseguran que no existen diferencias significativas entre esos pares de grupos.

En la **Figura 20** se presenta una gráfica comparativa de “cajas y bigotes” de los valores de la variable VSG MV de cada grupo de sangre. Como se aprecia, existe una notoria diferencia entre las medias del grupo de Anemia Hemolítica con respecto a las medias de los otros tres grupos, incluso a pesar de que los valores tienen una mayor variabilidad, lo cual concuerda muy bien con los valores de significación p resaltados en la **Tabla 6**.

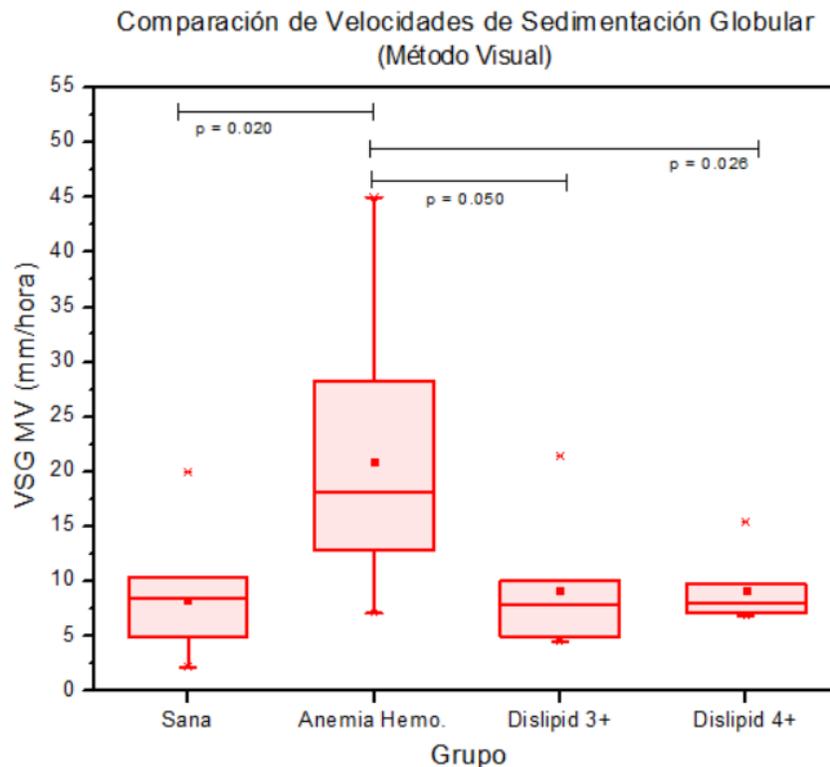


Figura 20. Gráfica comparativa de “cajas y bigotes” de las Velocidades de Sedimentación Globular de los cuatro grupos de sangre obtenidas a través del Método Visual (VSG MV). La significación p se muestra solo para los grupos que presentan diferencias significativas.

Con base en el análisis de esta sección basado específicamente en el Método Visual, se puede concluir que SI existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de Anemia Hemolítica y los grupos de sangre Sana, Dislipidemia 3 + y Dislipidemia 4 +. Por otro lado, NO existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de sangre Sana, Dislipidemia 3 + y Dislipidemia 4 +. De estos resultados y apoyándonos en la literatura del Capítulo 2 sección “Trastornos de la Sangre”, si se toma como referencia la VSG de sangre Sana, entonces se puede afirmar que: alteraciones presentes en la sangre con Dislipidemia, como el exceso en la concentración de lípidos

(colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas (quilomicrones, *VLDL*, *IDL*, *LDL* y *HDL*) NO es un factor que influya marcadamente con la VSG; mientras que alteraciones presentes en la sangre con Anemia Hemolítica, como el tamaño (VCM: anisocitosis, macrocitosis, microcitosis), forma (poiquilocitosis, esferocitosis, esquistocitosis, queratocitosis) y distribución (agregación) de los eritrocitos, SI influye notoriamente en la VSG.

5.2.VSG con Método Fotoacústico (MF)

En esta sección se trabaja únicamente con la información obtenida de las señales fotoacústicas del monitoreo de la sedimentación eritrocitaria.

El Método Fotoacústico se ilustra con el arreglo de la **Figura 17** y el esquema de la **Figura 18** descritos en el "Procedimiento General". En resumen, el monitoreo inició cuando la muestra se colocó totalmente homogeneizada en la celda de cuarzo (**Figura 18 A**), para después acoplarla con el sensor piezoeléctrico en la caja con tornillos. Se iluminó la muestra con láser a una altura fija y se comenzó a guardar los datos de las señales obtenidas cada 2 o 4 min. Durante el proceso de sedimentación de eritrocitos, la zona de la muestra irradiada por el láser tenía una concentración cada vez menor (**Figura 18 B**). El monitoreo finalizó una vez que los eritrocitos sedimentaron hasta que el spot se encontró por encima de la interfaz plasma-eritrocito (**Figura 18 C**), entonces se guardaron los últimos datos ya que no se observó señal FA en la pantalla del osciloscopio.

Previo a la presentación de los resultados a partir del MF, se muestra el espectro de absorción óptico de la sangre, así como un ejemplo de la señal FA obtenida durante el monitoreo de la sedimentación eritrocitaria.

5.2.1. Espectros de Absorción

Tal como se argumentó en la sección "Procedimiento General" del Capítulo 4 "Metodología", el primer paso para la generación de señales fotoacústicas es asegurarse que la muestra es capaz de absorber la longitud de onda incidente. Para esto, los espectros de absorción ópticos de la Sangre entera y el Plasma

sanguíneo se obtuvieron con un espectrofotómetro *UV-VIS* en un rango de 320 a 1100 nm, ver **Figura 21**. Para ambos espectros se tomó como blanco o matriz una *solución salina*³¹ (suero al 0.9 % de *NaCl*), y se utilizó una celda de vidrio de 1 cm de longitud de trayectoria óptica.

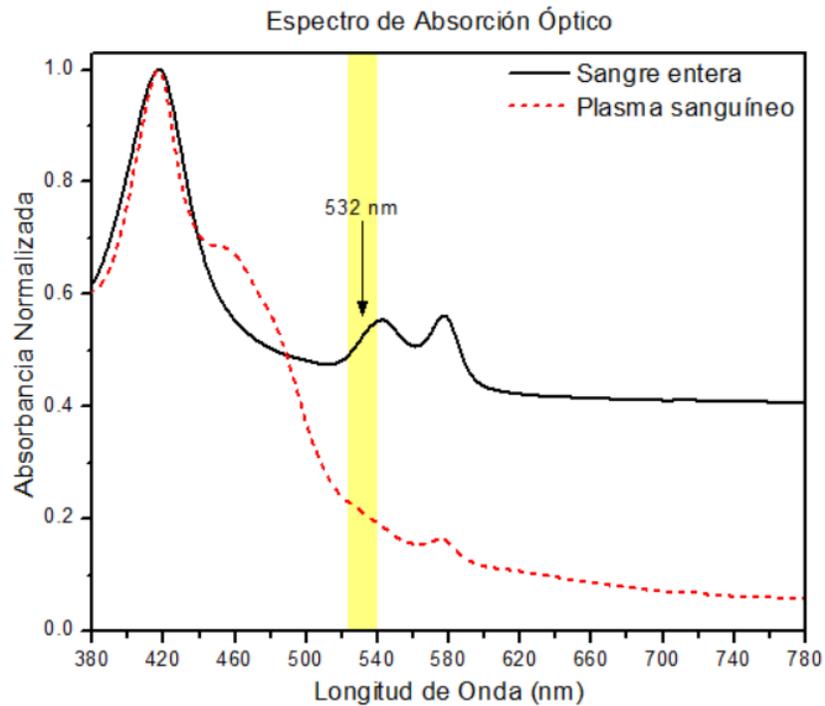


Figura 21. Espectro de absorción óptica de Sangre entera (línea sólida negra) y Plasma sanguíneo (línea cortada roja) en un rango de longitud de onda de 380 a 780 nm.

El espectro de absorción óptico de la Sangre entera se obtuvo realizando una disolución de 10 μ L de sangre entera homogeneizada en 3.5 mL de solución salina. Se usó esta proporción para que la disolución permitiera el paso de la luz sin que los valores de absorbancia se salieran de los límites de medición del equipo. El espectro de absorción óptico del Plasma sanguíneo se obtuvo empleando una muestra previamente centrifugada, por lo que la parte eritrocitaria y plasmática se encontraban separadas. Posteriormente, se realizó una mezcla de 80 % de solución salina y 20 % de plasma, obteniendo una disolución de 3.5 mL.

³¹ La *solución salina* es una solución isotónica que se emplea para que los eritrocitos se mantengan en equilibrio y del mismo tamaño dentro del medio, de esta forma la concentración de soluto en la solución es la misma dentro y fuera de las células.

De acuerdo con la **Figura 21**, en el rango de luz visible se puede notar que alrededor de la longitud de onda de interés 532 nm, la absorción óptica del Plasma sanguíneo es pequeña con respecto a la absorción óptica de la Sangre entera. Este resultado confirma que la sangre (hemoglobina) absorbe fuertemente en 532 nm, condición fundamental de las muestras empleadas en este trabajo para la obtención de las señales fotoacústicas.

Es interesante observar en la **Figura 3** del Capítulo 1 que los espectros fotoacústicos de sangre entera, eritrocitos y hemoglobina son similares en sus características principales, y a su vez estos espectros fotoacústicos también son similares al espectro de absorción óptico de sangre entera de la **Figura 21**.

5.2.2. Señal Fotoacústica de Sangre entera

La señal fotoacústica (firma característica) correspondiente a una muestra de sangre entera homogeneizada de una persona sana se muestra en la **Figura 22 (A)**, así también su amplificación de la escala de tiempo en la **Figura 22 (B)**. El tiempo de arribo de la señal FA permite calcular en el "Anexo A" la velocidad con la que se propaga el sonido en la sangre entera.

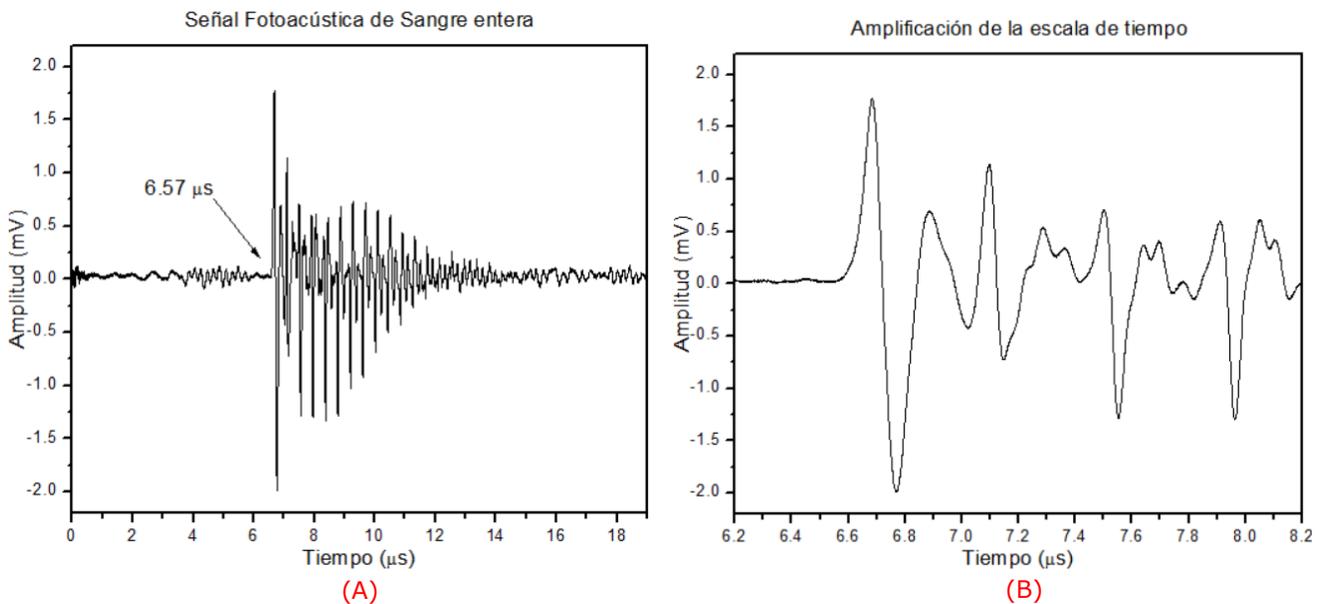


Figura 22. (A) Señal fotoacústica de una muestra de sangre entera homogeneizada, irradiada por el láser pulsado con una longitud de onda de 532 nm y una energía de 1.8 mJ/pulso, su tiempo de arribo es de aproximadamente 6.57 μs. **(B)** Amplificación de la escala de Tiempo de la misma señal de la Figura (A).

Es notable que debido a la excelente sensibilidad del sensor piezoeléctrico de PVDF, la relación señal-*ruido*³² es grande, por lo que no fue necesario amplificar las señales eléctricas obtenidas y observadas en tiempo real en el osciloscopio. En resumen, estas señales obtenidas a través de la TFA son el resultado de un proceso de transformación de energía luminosa en térmica, y de ésta en acústica.

5.2.3. Monitoreo de Sedimentación eritrocitaria con MF

En la **Figura 23** se muestra gráficamente el monitoreo de sedimentación eritrocitaria de una sola muestra de sangre entera sana tras guardar los datos de las señales fotoacústicas cada 4 min. Este es un ejemplo del gráfico que se generó para cada una de las 42 muestras monitoreadas en este trabajo.

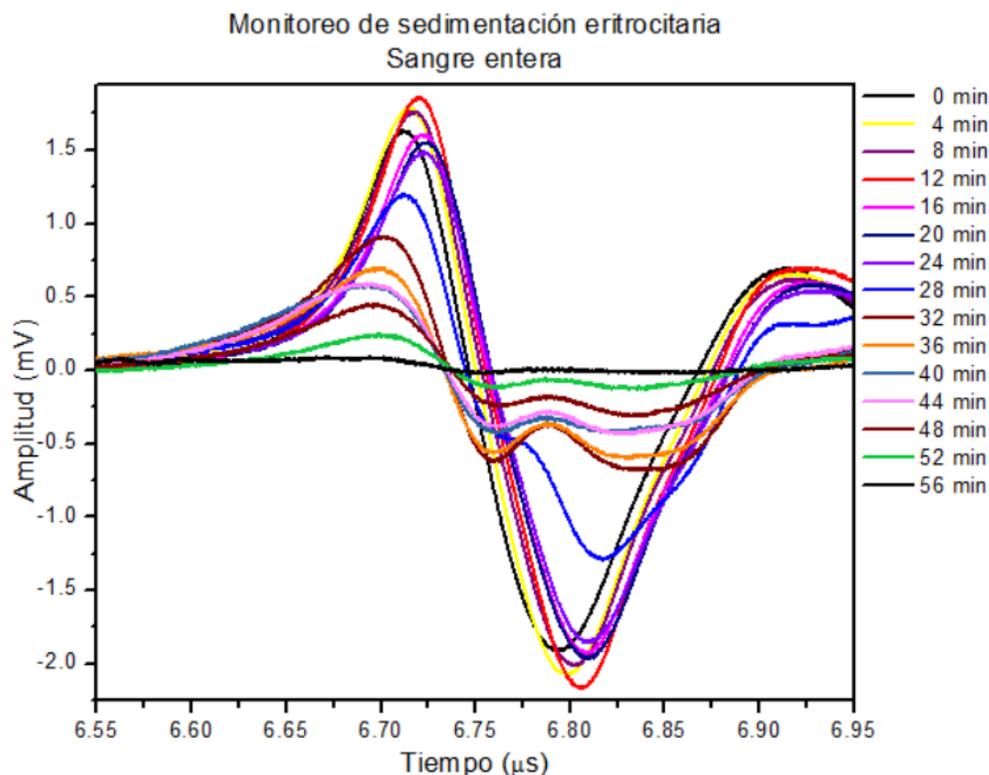


Figura 23. Señales fotoacústicas (picos principales) correspondientes al monitoreo de sedimentación eritrocitaria de una sola muestra de sangre entera sana, capturadas cada 4 minutos durante 56 minutos. La muestra fue irradiada por el láser pulsado con una longitud de onda de 532 nm y una energía de 1.8 mJ/pulso.

³² El *ruido* es aquella perturbación no deseada e independiente que se superpone a la señal de interés, aun cuando esta no existe.

Tal como se describió en el "Procedimiento General" del Capítulo 4 "Metodología", el monitoreo se inicia inmediatamente después de la homogenización de la muestra de sangre entera, y se finaliza en el tiempo en que se deja de observar la señal FA, guardando para cada cierto tiempo los datos de la señal. En la **Figura 23** se observa claramente el efecto de la variación en amplitud (mV) de las señales FA durante el proceso de la sedimentación eritrocitaria conforme pasa el tiempo (min). La amplitud del pico principal tiende a disminuir (aunque en algunos casos aumenta ligeramente y luego desciende gradualmente) hasta que en cierto tiempo se hace prácticamente nula.

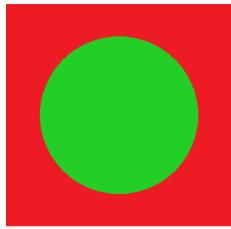
En general, el cambio en amplitud de las señales FA puede darse por la variación de dos parámetros: 1) variación de la energía/fluencia del láser depositada en la muestra, y 2) variación de la concentración de la sustancia absorbente de la muestra. Este segundo punto se ha comprobado en estudios anteriores de soluciones con diferentes concentraciones del colorante Violeta de Genciana diluido en Agua Tridestilada [55], así como en estudios de cambios inducidos por glucosa en las propiedades ópticas de sangre entera de cerdo [56]. Sin embargo, en este trabajo la energía/fluencia depositada en la muestra siempre se mantuvo constante (aunque no se descartan mínimas variaciones debidas a la inestabilidad del láser), por lo que las variaciones de la amplitud en los primeros minutos están fuertemente relacionadas con la cantidad de eritrocitos (concentración de hemoglobina) que está en constante cambio en la zona iluminada, tal como se muestra en la **Figura 18**. Este fenómeno es analizado más adelante en la sección "Fases de la VSG con MF".

En la **Figura 24** se representa la relación que existe entre el tamaño de la *fente fotoacústica*³³ y el tamaño del pico principal. Esta es la razón por la que la anchura a media altura (FWHM) y el área del primer pico disminuye notablemente a partir de los 28 min. Cuando el spot del láser comienza a iluminar a la interfaz plasma-eritrocito, el tamaño de la fente fotoacústica disminuye, es decir, su tamaño varía en función del tiempo de sedimentación.

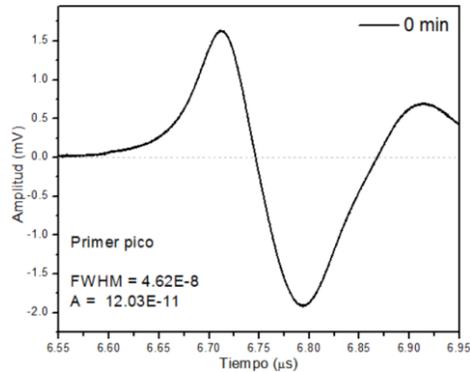
En la **Figura 25** se muestra el monitoreo de los primeros minutos de una muestra de sangre sana y una muestra de sangre con anemia hemolítica.

³³ La *fente fotoacústica* es aquella zona iluminada de la muestra, en la que se genera calor a partir de la absorción de la radiación luminosa pulsada, y donde consecuentemente se producen las ondas de presión.

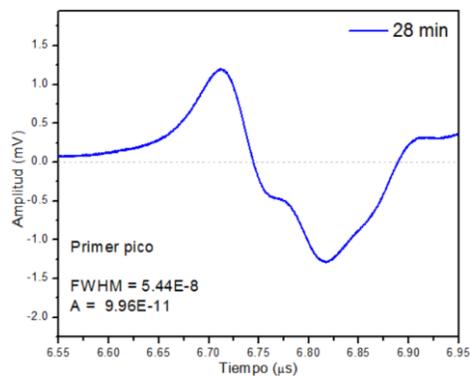
Tamaño de la Fuente Fotoacústica



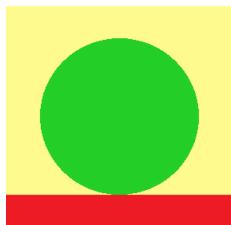
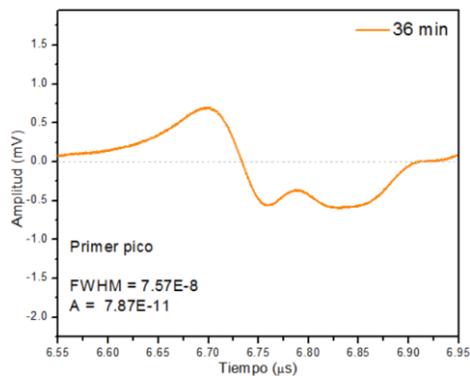
(A)



(B)



(C)



(D)

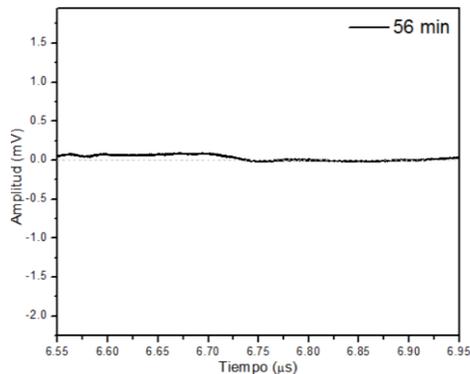


Figura 24. Representación de como el tamaño de la fuente fotoacústica afecta la anchura a media altura (FWHM) y el área A del primer pico de la señal fotoacústica. **(A)** Spot iluminando a la muestra homogeneizada (0 min). **(B)** Spot iluminando una pequeña fracción del plasma sanguíneo (28 min). **(C)** Spot iluminando ambas partes separadas por la interfaz plasma-eritrocito (36 min). **(D)** Spot iluminando solo al plasma sanguíneo (56 min).

En la sangre sana (**Figura 25 A**) se presenta el monitoreo de los primeros 24 min, en los que se observa que la señal permanece inalterada en función del tiempo de sedimentación, sin embargo, en el monitoreo de la sangre con anemia (**Figura 25 B**) se presenta variación en la señal a partir del primer minuto, y el cambio evoluciona constantemente después de los 6 min. Una probable explicación de este efecto se debe a que las ondas acústicas que se propagan en la sangre sana no se dispersan por la poca o ninguna formación de agregados; mientras que en la sangre con anemia hemolítica la formación de agregados si afectan significativamente a las ondas acústicas inducidas por el láser [57]. Por otra parte, en la **Figura 23**, la variación de la señal en sangre sana a los 28 min se debe a que el spot ilumina en la interfaz plasma-eritrocito.

Monitoreo de sedimentación eritrocitaria de una muestra de sangre sana y anemia hemolítica

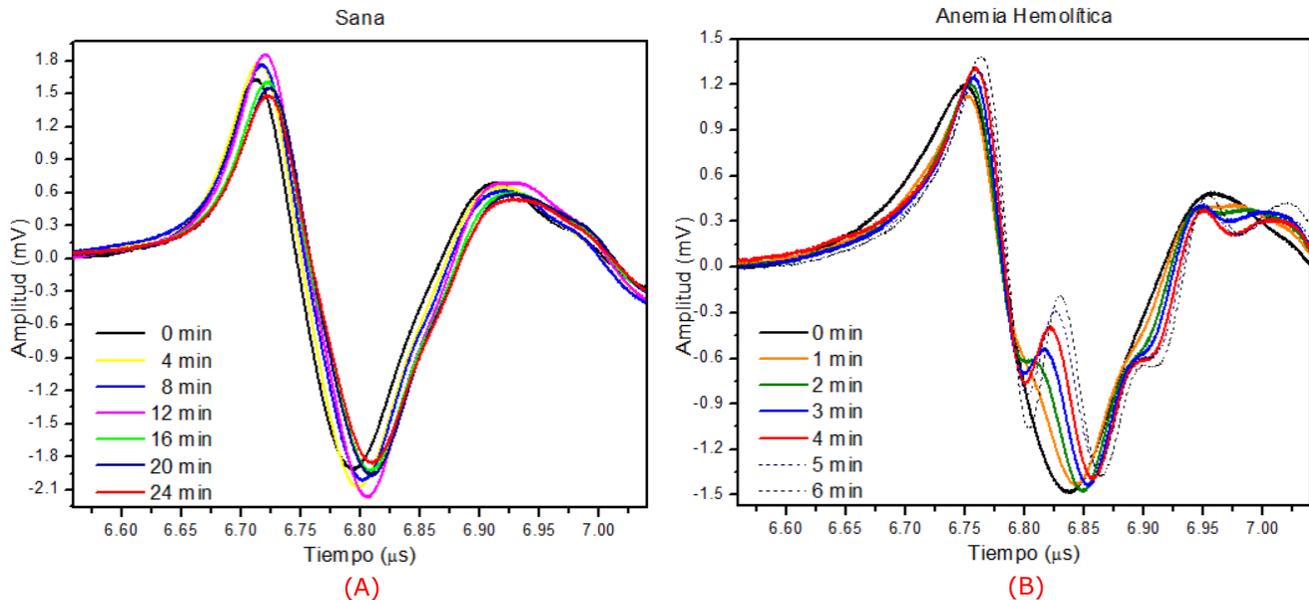


Figura 25. Monitoreo de los primeros minutos de la sedimentación eritrocitaria de muestras de sujetos diferentes. **(A)** Muestra de sangre sana. **(B)** Muestra de sangre con anemia hemolítica.

A través de un monitoreo de los primeros 10 min usando el MF, es posible determinar si la sangre es sana o presenta alguna alteración que involucra cambios en la distribución de los eritrocitos, tal como Rouleaux o agregación.

5.2.4. Curvas características por grupo de sangre

Diversos tipos de análisis de la señal fotoacústica pueden realizarse, en general, este análisis depende de los parámetros relacionados con la señal eléctrica, así como del arreglo experimental empleado. Estos parámetros son: el tiempo de arribo, la amplitud o valor máximo, el valor pico a pico, el periodo, el valor eficaz o RMS (Root Mean Square), y las posibles combinaciones entre ellos. Por su simplicidad, en este trabajo se utilizó el análisis de las variaciones de la amplitud máxima (pico principal o primer máximo) de la señal eléctrica, además de que estos cambios a su vez se relacionan con variaciones de la señal longitudinal generada en la superficie del material, proporcionando información importante.

A partir de las señales fotoacústicas obtenidas en el monitoreo, como el de la **Figura 23**, se midió la amplitud máxima del pico principal para cada una de las señales FA guardadas en su respectivo tiempo. Posteriormente, a la columna de datos (amplitud máxima) obtenida del paso anterior, se le aplicó el método de normalización *Divided by Max*, en el que se divide a la columna por el valor máximo del conjunto de datos. Esto último se realizó con la finalidad de comparar más adelante las gráficas de distintas muestras. Estas mediciones se realizaron a través de las herramientas del software *OriginPro* para todas las muestras de sangre entera bajo la clasificación: Sana, Anemia Hemolítica y Dislipidemia de grado 3 + y 4 +.

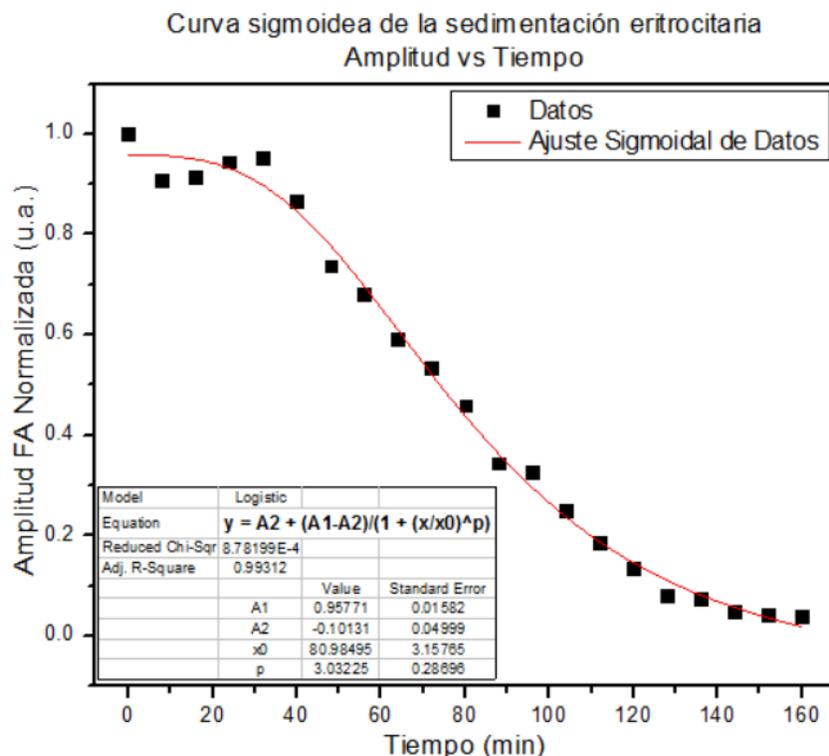


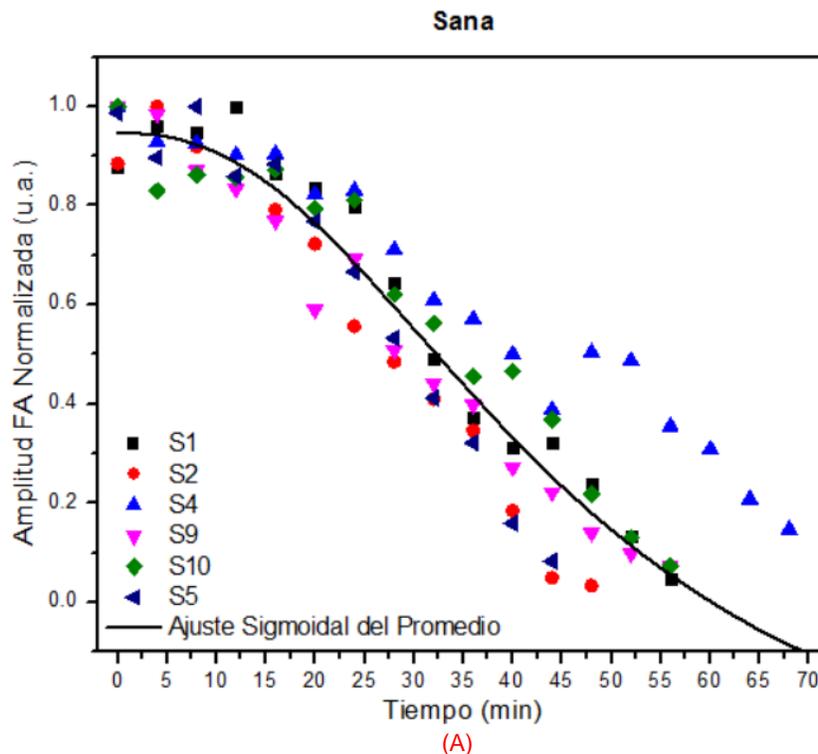
Figura 26. Gráfico de Amplitud vs Tiempo que muestra los valores de amplitud máxima de los picos principales de cada señal fotoacústica durante el monitoreo. Se observa un comportamiento cuya mejor curva de ajuste corresponde a una función sigmoidea.

A fin de mostrar el comportamiento de la variación de las amplitudes de las señales FA normalizadas durante el monitoreo asociado a cada muestra, en la **Figura 26** se grafican las amplitudes máximas de las señales FA en función del tiempo de sedimentación eritrocitaria. Se nota claramente que las amplitudes decrecen conforme aumenta el tiempo, pero no lo hacen de manera lineal, sino siguiendo un comportamiento cuya mejor curva de ajuste

corresponde a una *función sigmoidea*³⁴ [58], tal cual se establece en la **Figura 12** del Capítulo 3 en la sección “Fases de la VSG”.

Este procedimiento se realizó para todas las muestras de sangre, de esta manera se obtuvieron distintas curvas sigmoideas. Por otro lado, al agrupar las muestras en torno a la clasificación de sangre: Sana, Anemia Hemolítica y Dislipidemia de grado 3+ y 4+, se realizó un promedio de los datos de las muestras pertenecientes a cada grupo para obtener una curva promedio; luego se realizó un ajuste sigmoideal a cada una de estas curvas promedio, de esta manera fue posible asociar una sola curva sigmoidea a cada uno de estos grupos. En la **Figura 27** se presentan las curvas de ajuste sigmoideales que caracterizan a cada grupo de sangre.

Ajustes sigmoideales característicos de cada grupo de sangre



³⁴ La *función sigmoidea* empleada para los ajustes de este trabajo es específicamente una función logística que permite curvas flexibles en forma de “S”, la ecuación predeterminada por el software OriginPro es $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$ donde A_1 es la asíntota superior, A_2 es la asíntota inferior, x_0 es el valor del punto medio de la sigmoidea y p es la tasa de crecimiento logístico o inclinación de la curva.

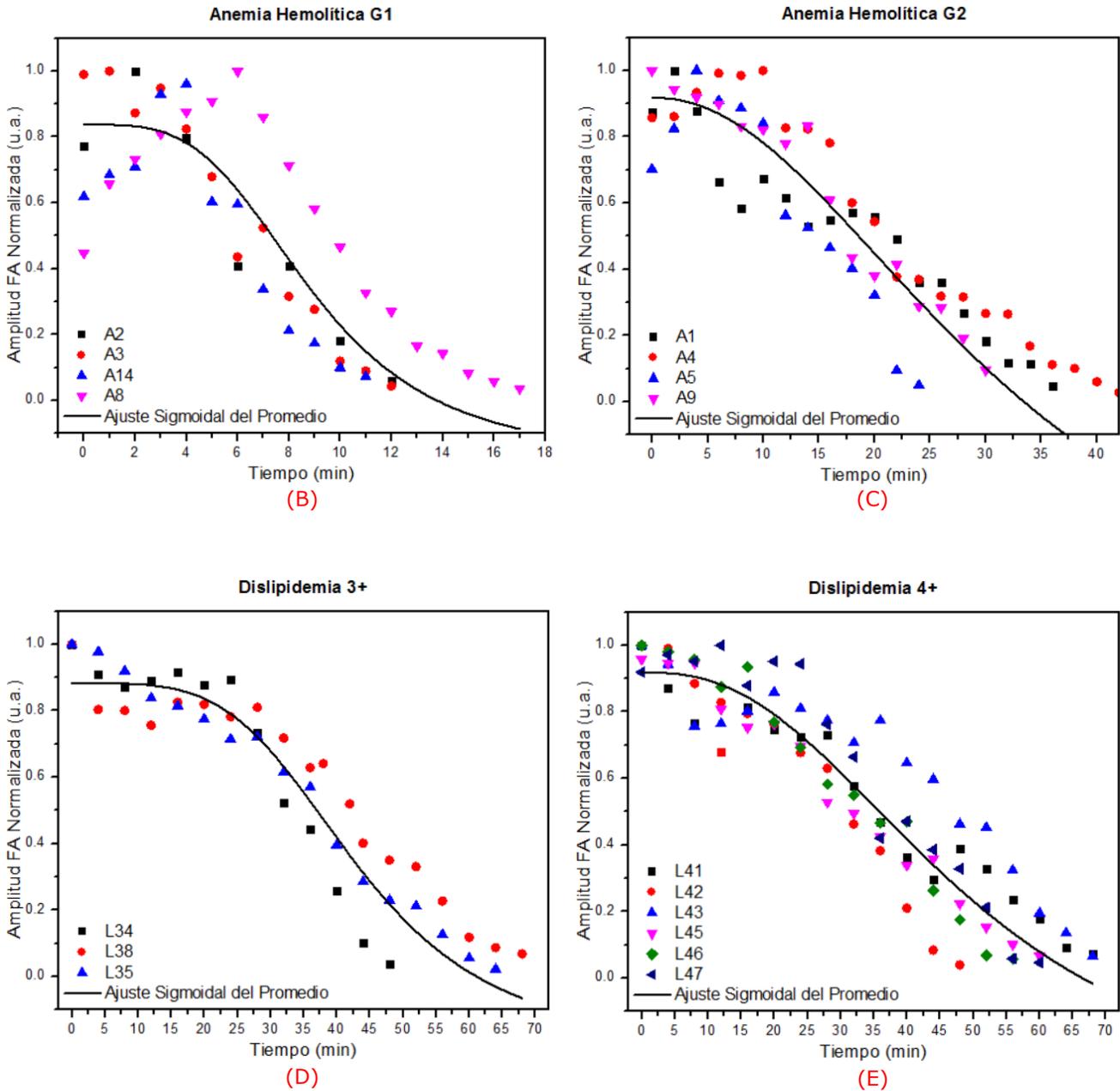


Figura 27. Ajustes sigmoideales característicos de cada grupo de sangre, obtenidos a partir del promedio de muestras pertenecientes a cada uno de los grupos: **(A)** Sana, **(B)** Anemia Hemolítica G1, **(C)** Anemia Hemolítica G2, **(D)** Dislipidemia 3 + y **(E)** Dislipidemia 4 +.

Es importante resaltar que para el grupo de Anemia Hemolítica fue posible distinguir dos subgrupos: G1 (**Figura 27 B**) y G2 (**Figura 27 C**). Esta subclasificación fue en primera instancia, únicamente de observar el comportamiento de las curvas sigmoideas de las muestras. Con los datos de la biometría e interpretación de los resultados de laboratorio por parte del

Laboratorio de Hematología Especializada del HGM, fue posible entender y dar una explicación a estas diferencias en los subgrupos G1 y G2, las cuales fueron asociadas al VCM, ver sección "Volumen Corpuscular Medio" del Capítulo 2; así el subgrupo G1 presentó valores estándar de VCM mientras que el subgrupo G2 está asociado fuertemente con microcitos, ya que el VCM de estas muestras está muy por debajo del rango normal. Además, se tiene que considerar que no solo el tamaño y la forma de los eritrocitos influyen en el comportamiento de las curvas sigmoideas de estos grupos, también están presentes otros factores importantes como la cantidad de eritrocitos (hematocrito) y el tiempo de crecimiento de los agregados en la primera fase de la sedimentación.

A fin de comparar los cinco ajustes sigmoideas de la **Figura 27**, se presentan simultáneamente estas curvas correspondientes a cada grupo de sangre en la **Figura 28 (A)** con sus respectivas desviaciones estándar en la **Figura 28 (B)**.

Curvas sigmoideas características y desviación estándar de cada grupo de sangre

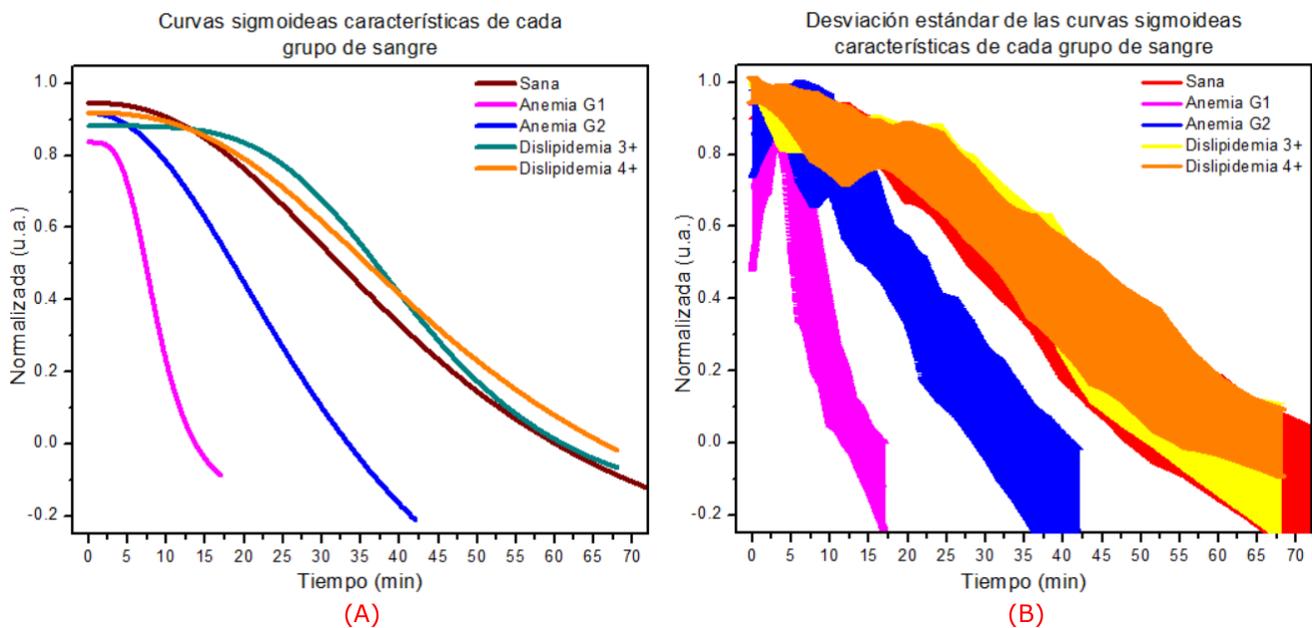


Figura 28. (A) Curvas sigmoideas características de cada grupo de sangre. **(B)** Desviación estándar respectiva de cada curva sigmoidea de los mismos grupos de la Figura (A).

Como se puede observar en la **Figura 28 (A)** no hay un traslape entre las curvas de Anemia Hemolítica de los subgrupos G1 y G2 con respecto a las curvas de los grupos de sangre Sana y Dislipidemia 3+ y 4+. Aunque la desviación estándar de cada una de las curvas características es grande, ver **Figura 28 (B)**, no representa un problema para distinguir las curvas de Anemia Hemolítica G1 y G2 de las curvas de sangre Sana y Dislipidemia 3+ y 4+, pues existe una notable diferencia en las pendientes de las dos curvas de Anemia con respecto al resto, lo que conlleva a que no se traslapen en la mayor parte del tiempo. También puede notarse que no se presentan diferencias relevantes entre la pendiente de la curva característica de la sangre Sana con respecto a las pendientes de las curvas de Dislipidemia 3+ y 4+, de hecho, los tiempos de sedimentación eritrocitaria también son muy semejantes.

De lo anterior, se puede concluir que la presencia de alteraciones en la concentración de lípidos (colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas (quilomicrones, *VLDL*, *IDL*, *LDL* y *HDL*) presentes en la sangre con Dislipidemia NO son un factor que influya notoriamente en la VSG; sin embargo, la presencia de alteraciones en la sangre con Anemia Hemolítica tales como el tamaño (VCM: anisocitosis, macrocitosis, microcitosis) y la forma (poiquilocitosis, esferocitosis y eliptocitosis) de los eritrocitos SI influyen fuertemente en la VSG.

Este resultado generado a partir de las observaciones de las biometrías hemáticas y del análisis de las señales eléctricas realizado a través de este Método Fotoacústico, representado hasta el momento en la **Figura 28**, concuerda con las conclusiones de la sección "VSG con Método Visual".

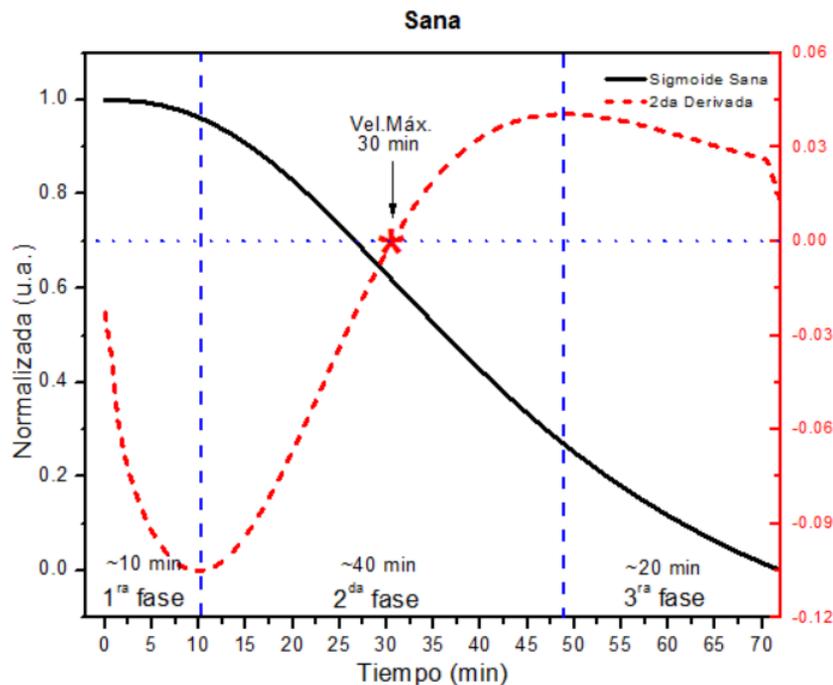
5.2.5. Fases de la VSG con MF

Con el objetivo de identificar a partir de las curvas sigmoideas los tiempos aproximados de cada una de las tres fases de la sedimentación eritrocitaria para cada grupo, así como también una estimación del tiempo en que se alcanza la velocidad máxima durante la segunda fase de la sedimentación eritrocitaria, se aplicó la segunda derivada a cada una de las curvas sigmoideas de la **Figura 29**.

Se observa que el valor mínimo de la segunda derivada de la curva de sedimentación corresponde al tiempo en que se da el cambio de fase: agregación (1ª fase) → precipitación (2ª fase); mientras que el valor máximo de la segunda derivada corresponde al tiempo en que se da el cambio de fase: precipitación (2ª fase) → empaquetamiento (3ª fase).

Para la curva de sangre Sana (**Figura 29 A**), la fase de agregación se da en los primeros 10 min, la fase de precipitación tarda alrededor de 40 min, y la fase de empaquetamiento es mayor a 10 min. Es destacable que estos tiempos obtenidos a través del MF coinciden bastante bien con los tiempos de las fases reportados en la literatura [30], los cuales son obtenidos a través del Método de Westergren. De acuerdo con la teoría [6], en la sangre sana los eritrocitos forman pocos o ningún agregado, por lo que a los eritrocitos les lleva mucho tiempo comenzar a sedimentar, es decir, la poca formación de agregados no ayuda a que el tiempo de sedimentación sea menor, o lo que es equivalente a que la VSG sea mayor.

Fases de la sedimentación eritrocitaria (Método Fotoacústico)



(A)

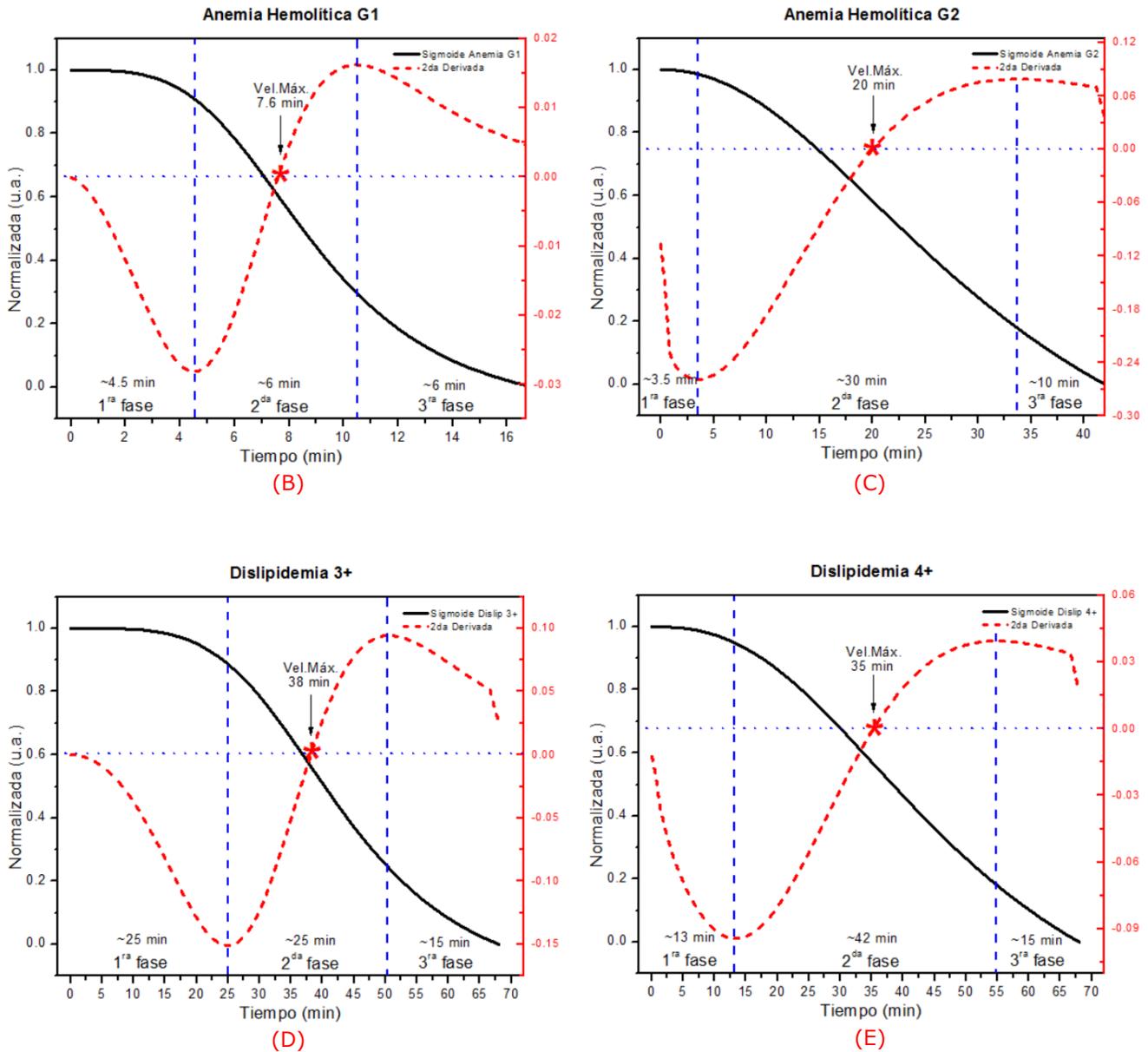


Figura 29. Fases de la sedimentación eritrocitaria por grupo de sangre. En cada figura se presentan las curvas sigmoideas características (en color negro) y sus segundas derivadas respectivas (en color rojo). El tiempo asociado a cada una de las fases de la VSG se obtiene a partir de los valores máximos y mínimos de la segunda derivada de la curva característica. El tiempo en que se alcanza la Velocidad Máxima de sedimentación en la 2ª fase se obtiene cuando la segunda derivada de la curva característica es igual a cero, y se representa con un asterisco en color rojo.

Para la curva de Anemia Hemolítica la primera fase tiene una duración notoriamente menor que la sangre Sana, en G1 (**Figura 29 B**) se tiene 4.5 min y en G2 (**Figura 29 C**) se tiene 3.5 min; en la segunda fase para G1 se tiene un tiempo de 6 min y para G2 de 30 min; y para la tercera fase G1 y G2 presentan un tiempo superior a 6 min. En general, en la anemia esta disminución del

tiempo de retardo (1ª fase) puede deberse al rápido crecimiento de los agregados, lo que tiene como consecuencia un incremento de la VSG. Lo anterior se afirma con base en los resultados del modelo de S. Oka [36] expuestos en el Capítulo 3 en la sección "Sedimentación de eritrocitos con agregación". Además, es probable que en la sangre con Anemia Hemolítica, el rápido crecimiento de los agregados durante la fase de agregación (1ª fase) se vea reflejado con un aumento notable en la amplitud de las señales FA (ver datos de los primeros minutos en la **Figura 27 (B)** y **Figura 27 (C)** sin considerar el ajuste sigmoidal), pues la formación de agregados conlleva a una agrupación creciente de eritrocitos (mayor concentración de hemoglobina absorbe en la zona iluminada por el láser). Este efecto observado en la anemia, no es tan notable en la sangre sana debido a que en ella los eritrocitos forman pocos o ningún agregado, ver **Figura 27 (A)**.

Para la curva de Dislipidemia se tiene que para 3+ (**Figura 29 D**) la primera fase tarda alrededor de 25 min mientras que para 4+ (**Figura 29 E**) es de 13 min; la segunda fase para 3+ dura 25 min y para 4+ es de 42 min; finalmente la tercera fase para 3+ y 4+ es superior a 15 min. Se observa que los tiempos de la primera fase son mayores que los tiempos de los grupos de Anemia Hemolítica, lo que conduce a afirmar nuevamente que se presenta poca formación de agregados, tal como sucede en la sangre Sana. En la **Tabla 7** se presentan los tiempos antes mencionados de cada fase de la curva de sedimentación para cada grupo.

La segunda derivada de la curva de sedimentación correspondiente a cada grupo también nos da información sobre el tiempo en el que se alcanza la velocidad máxima durante la fase de precipitación (2ª fase). Este tiempo se obtiene cuando la segunda derivada de la curva es igual a cero (asterisco sobre la línea horizontal punteada de la **Figura 29**), es decir, en el punto de inflexión de la curva sigmoidea de sedimentación. Los dos subgrupos de Anemia Hemolítica presentan una velocidad máxima de precipitación en un tiempo temprano con respecto a los otros grupos de sangre, mientras que los grupos de Dislipidemia alcanzan esta velocidad máxima en un tiempo poco superior al de la sangre Sana, estos resultados se presentan en la **Tabla 7**.

En el "Anexo C" se presenta el procedimiento con el que se obtienen las Velocidades de Sedimentación Globular a partir del Método Fotoacústico (VSG MF) para cada una de las 38 muestras individuales consideradas en este

trabajo, sin embargo, en esta sección solo se consideran las VSG MF de las 5 curvas sigmoideas características respectivas de cada grupo, mostradas en la **Figura 28**. Los valores "Pendiente VSG MF" de la **Tabla 7** corresponden a estas velocidades asociadas a la pendiente de la recta del ajuste lineal de cada curva.

Tiempo de las fases de la curva de VSG (Método Fotoacústico)						
Grupo	1ª fase [min]	2ª fase [min]	3ª fase [min]	Tiempo de Vel. Máx. [min]	Pendiente VSG MF [mV/hora]	Error estándar $\times 10^{-4}$
Sana	10	40	20	30	-0.016	1.80
Anemia G1	4.5	6	6	7.6	-0.074	13.6
Anemia G2	3.5	30	10	20	-0.027	2.59
Dislipid. 3+	25	25	15	38	-0.018	4.25
Dislipid. 4+	13	42	15	35	-0.017	2.29

Tabla 7. Tiempo de duración de las tres fases de la curva de sedimentación eritrocitaria y Tiempo en que se alcanza la Velocidad Máxima en la fase de precipitación (2ª fase), los valores corresponden a la Figura 29; y Velocidad de Sedimentación Globular con el Método Fotoacústico (VSG MF), el signo negativo se debe a que la pendiente de la recta del ajuste lineal de las curvas características es negativa, los valores corresponden a la Figura 28 (A).

En general, la fase de agregación (1ª fase) de la **Tabla 7**, es la más importante, ya que la VSG y el comportamiento de la curva de todo el proceso dependerán del tiempo de retardo para la agregación (tiempo de crecimiento de los agregados en la primera fase) y del tamaño de los mismos. Se puede notar que las pendientes asociadas a las curvas (VSG MF) del grupo de sangre Sana y los grupos de Dislipidemia 3+ y 4+ son muy semejantes, además de que estos tres grupos difieren bastante de las VSG MF de los grupos de Anemia Hemolítica G1 y G2. Por otra parte, si el tiempo de retardo para la agregación es corto, como en el caso de los grupos de Anemia Hemolítica, entonces la pendiente asociada a la curva se incrementa con respecto a la pendiente de la curva de sangre Sana; además, si la formación de agregados es más rápida, entonces también la velocidad máxima de sedimentación se alcanzará en un tiempo más temprano. En resumen, el tiempo de la primera fase de cualquier muestra, da información valiosa sobre el incremento de la VSG con respecto a la VSG de sangre Sana.

De acuerdo con el análisis de esta sección basado específicamente en el Método Fotoacústico, se puede concluir a partir de la información recabada en la **Tabla 7**, que SI existen diferencias entre los grupos de Anemia Hemolítica G1 y G2 con respecto a los grupos de sangre Sana, Dislipidemia 3 + y 4 +, lo cual se ve reflejado en las diferencias de las pendientes de las rectas de ajuste (VSG MF) de las curvas características y tiempo de las tres fases respectivas de cada grupo. Por otro lado, NO existen diferencias notables entre los grupos de sangre Sana, Dislipidemia 3 + y 4 +. De estos resultados y apoyándonos en la literatura del Capítulo 2 sección "Trastornos de la Sangre", si se toma como referencia la VSG de sangre Sana, entonces se puede afirmar que: alteraciones presentes en la sangre con dislipidemia, como el exceso en la concentración de lípidos (colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas (quilomicrones, *VLDL*, *IDL*, *LDL* y *HDL*) NO es un factor que influya marcadamente con la VSG; mientras que alteraciones presentes en la sangre con anemia hemolítica, como el tamaño (VCM: anisocitosis, macrocitosis, microcitosis), forma (poiquilocitosis, esferocitosis, esquistocitosis, queratocitosis) y distribución (agregación) de los eritrocitos, SI influye notoriamente en la VSG.

Conclusiones

En este trabajo se presenta una de las diversas aplicaciones y alcances que tiene la TFA pulsada para contribuir en el área médica como alternativa para el estudio de la sangre.

La TFA pulsada permite obtener información complementaria a las técnicas estándar de análisis de sustancias ópticamente turbias, en particular ha demostrado ser más sensible que otros métodos de detección óptica. La información obtenida a partir de la amplitud o valor máximo, el tiempo de arribo, y la forma de las señales fotoacústicas, permiten caracterizar muestras líquidas fuertemente absorbentes como la sangre entera humana.

El análisis de los resultados obtenidos del monitoreo a través de la TFA pulsada permitió determinar la VSG de las muestras estudiadas, agruparlas de acuerdo con la patología e incluso subclasificar las muestras de anemia hemolítica en dos subgrupos cuyas diferencias se debieron principalmente al tamaño de los eritrocitos.

A partir de las segundas derivadas de las curvas sigmoideas asociadas a cada grupo se calculó el tiempo de las tres fases de la sedimentación eritrocitaria. Como una consecuencia de estos resultados, al realizar un análisis del monitoreo de los primeros diez minutos para una sola muestra de sangre, se puede determinar si la sangre es sana o presenta alguna alteración que involucra cambios en la distribución de los eritrocitos, tal como la formación de Rouleaux (pila de monedas) o agregación (conglomerados irregulares), lo cual se identifica obteniendo un tiempo de la primera fase considerablemente menor que el de la sangre sana y confirmando la presencia de un incremento de la dispersión en las señales fotoacústicas del monitoreo en función del tiempo.

Este estudio demostró que las alteraciones presentes en la sangre con Dislipidemia como el exceso en la concentración de lípidos (colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas, NO es un factor que influya con la VSG; mientras que alteraciones presentes en la Anemia como el tamaño de los eritrocitos

(VCM), menor cantidad de eritrocitos (hematocrito bajo), tiempo corto de la fase de agregación (rápido crecimiento de los agregados), y variabilidad en la forma de los eritrocitos, SI influye notoriamente en la VSG.

La VSG obtenida con el Método Visual y el Método Fotoacústico presenta un coeficiente de correlación lineal de Pearson cercano a la unidad, principalmente para las muestras de sangre sana esto podría a su vez compararse con los métodos tradicionales como el Wintrobe y Westergren, sin embargo no se obtendría la información adicional que da el MF, por lo que el uso del MF permite determinar con base en un valor normal de la VSG si existe o no enfermedad orgánica, siendo así el MF una alternativa con mayor potencial para el diagnóstico clínico.

Trabajo Futuro

Los resultados de este trabajo muestran que la TFA tiene un gran potencial para la realización de diversos estudios, en particular para el estudio de sangre entera sana y con anemia hemolítica, pudiendo contemplar su extensión al análisis de diversos biofluidos.

Se propone mejorar la metodología usada en este trabajo con el afán de optimizar y estandarizar el procedimiento de medición, específicamente cambiando la fuente de iluminación y las longitudes de onda, así como el diseño de la caja y el tamaño de la celda para utilizar menor cantidad de sangre, consecuentemente se reducirá el tiempo de medición para el cálculo de la VSG a través de la TFA con respecto a la prueba tradicional, y se estudiarán muestras con distintas patologías y/o procesos.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se busca desarrollar un modelo teórico y la simulación respectiva del proceso fotoacústico que se produce debido a la absorción de la sangre. También se espera complementar el trabajo con herramientas computacionales (reconocimiento de patrones a través de redes neuronales artificiales) para identificar y clasificar las firmas y curvas sigmoideas de sedimentación características de cada uno de los trastornos estudiados.

Anexos

A. Velocidad del sonido en Sangre entera

La velocidad con la que viaja el sonido en la sangre entera v_{sonido} se puede calcular de forma sencilla con los datos obtenidos en este trabajo, resaltando que esta velocidad se calcula únicamente para las 11 muestras del grupo de sangre Sana presentado en la **Tabla 4** del Capítulo 5. Para estos cálculos solo se consideran los datos del tiempo inicial 0 min, correspondientes a cada monitoreo, es decir, cuando las muestras se encontraban totalmente homogeneizadas.

Dado que se conoce la distancia total d_{total} recorrida por el sonido, desde que se genera en el frente interior de la celda de cuarzo hasta que lo detecta el sensor piezoeléctrico:

$$d_{total} = d_{sangre} + d_{cuarzo} = 10.00 \text{ mm} + 1.25 \text{ mm} = 11.25 \text{ mm} \quad (A1)$$

donde d_{sangre} es la distancia recorrida por el sonido en el interior de la celda de cuarzo donde está contenida la sangre, y d_{cuarzo} es la distancia recorrida por el sonido en la segunda pared de la celda de cuarzo, que se encuentra entre la sangre y el sensor. La incertidumbre asociada al instrumento de medición es $\Delta d = 0.01 \text{ mm}$.

Además, se conoce el tiempo en que el sonido recorre esta distancia total d_{total} para cada una de las señales fotoacústicas, ver **Figura 22**, por lo que se obtiene el promedio del tiempo de arribo de las señales fotoacústicas:

$$t_{total} = t_{sangre} + t_{cuarzo} = 6.5712 \text{ } \mu\text{s} \quad (A2)$$

donde la incertidumbre correspondiente es $\Delta t = 0.0118 \text{ } \mu\text{s}$, entonces, la velocidad del sonido v_{sonido} en la sangre entera homogeneizada de muestras de personas sanas es:

$$v_{sonido} = \frac{d_{sangre}}{t_{sangre}} = \frac{d_{sangre}}{t_{total} - t_{cuarzo}} = \frac{d_{sangre}}{t_{total} - \frac{d_{cuarzo}}{v_{cuarzo}}} = \frac{10.00 \text{ mm}}{6.5712 \mu\text{s} - \frac{1.25 \text{ mm}}{5500 \text{ m/s}}}$$

$$= \frac{0.010 \text{ m}}{6.5712 \mu\text{s} - \frac{0.00125 \text{ m}}{5500 \text{ m/s}}} = \frac{0.010 \text{ m}}{6.5712 \mu\text{s} - 0.2273 \mu\text{s}} = \frac{0.010 \text{ m}}{6.3439 \mu\text{s}} \cong 1576 \text{ m/s}$$

Ahora, realizando el desarrollo de las *incertidumbres*³⁵ asociadas a los cálculos anteriores entonces finalmente obtenemos que el intervalo para la velocidad del sonido es:

$v_{sonido} = (1576 \pm 5) \text{ m/s}$	(A3)
---	------

Se está considerando que la velocidad del sonido en la pared de la celda de cuarzo es de alrededor de 5500 m/s. De esta forma en la **Ecuación A3** se obtiene que en un entorno de alrededor de 20 °C, la velocidad del sonido se propaga en la sangre entera homogeneizada a $(1576 \pm 5) \text{ m/s}$, lo cual es bastante consistente con el valor de 1570 m/s reportado en la literatura [59].

Además, es importante señalar que para el caso en que se calcule la velocidad del sonido para algún trastorno en específico, seguramente los resultados serán muy diferentes debido a que se presenta mayor variabilidad en los componentes de cada una de las muestras, lo cual afecta notablemente los tiempos de arribo de las señales fotoacústicas.

³⁵ La *incertidumbre* de la velocidad del sonido en la sangre entera $v = \frac{d}{t}$ se calcula utilizando la siguiente expresión $\Delta v = \left| \frac{\partial v}{\partial d} \right| \Delta d + \left| \frac{\partial v}{\partial t} \right| \Delta t = \left| \frac{1}{t} \right| \Delta d + \left| \frac{-d}{t^2} \right| \Delta t$ donde $d = 0.01 \text{ m}$, $\Delta d = 0.00001 \text{ m}$, $t = 6.5712 \mu\text{s}$ y $\Delta t = 0.0137 \mu\text{s}$; o bien, la incertidumbre se puede obtener a través de la desviación estándar de la media de las velocidades obtenidas para cada una de las muestras.

B. Estimación de VSG basada en Ley de Stokes

En esta sección se realiza una estimación comparativa de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) de los tres grupos generales de sangre entera estudiados: sana, anemia y dislipidemia; estimación basada en el modelo propuesto por S. Oka (específicamente la **Ecuación 3.13**) descrito en la sección "Ley de Stokes" del Capítulo 3.

Se considera que cualquier muestra de sangre sana posee células individuales que difieren entre ellas mismas, es decir, presentan variabilidad en su tamaño, e incluso en su forma, pero en sangre con alteraciones eritrocitarias marcadas como la anemia, esta variabilidad se incrementa demasiado. Debido a estas complicaciones solo se realiza una estimación de lo que sucede en el fenómeno de la VSG.

La **Ecuación B1** considera el radio efectivo R_0 de un eritrocito, la densidad de los eritrocitos $\rho_{eritros}$, la densidad del plasma ρ_{plasma} , la viscosidad de la sangre $\eta(H)$, el hematocrito H , la aceleración de la gravedad g , el factor de reducción debido al flujo ascendente del plasma $\phi(H)$, el parámetro de deformabilidad del eritrocito f , el número de eritrocitos del que está compuesto el agregado final N , el tiempo de sedimentación t y el tiempo de retardo para la agregación λ . Es posible encontrar algunos de estos valores reportados en la literatura [60], sin embargo, no se conocen todos los parámetros para los tres grupos.

$$VSG = \frac{2g(\rho_{eritros} - \rho_{plasma})R_0^2\phi(H)}{9\eta(H)f} \left[1 + \left(N^{\frac{1}{3}} - 1 \right) \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda}} \right) \right]^2 \quad (B1)$$

En general, por observación e independientemente del trastorno, se sabe que la densidad de la parte eritrocitaria siempre es ligeramente mayor que la densidad del plasma ($\rho_{eritros} > \rho_{plasma}$). Además, durante las mediciones se observó que las muestras de anemia presentaron menor viscosidad (mayor fluidez) en comparación con las muestras de sangre sana y dislipidemia, mientras que la viscosidad de las muestras con dislipidemia fueron ligeramente más viscosas (menor fluidez) que las de sangre sana. Por tanto, de acuerdo con la **Ecuación B1** se tiene que a menor viscosidad la velocidad de

sedimentación es mayor, y de igual forma una muestra mucho más espesa o viscosa presenta una velocidad de sedimentación menor, siempre que los demás parámetros permanezcan constantes.

En sangre sana se presentan pocos o ningún agregado de eritrocitos, y considerando que tanto en sangre sana como en sangre con dislipidemia se mantienen semejantes el radio, la densidad y el parámetro de deformabilidad de los eritrocitos, así como el hematocrito y el tiempo de retardo, entonces la diferencia en la VSG estará afectada solo por la densidad del plasma y la viscosidad de la sangre. Esto se debe a que en este trastorno el problema se encuentra principalmente en el plasma sanguíneo. La densidad del plasma y viscosidad de la sangre con dislipidemia es ligeramente mayor que en sangre sana (debido a un exceso en la concentración de lípidos y lipoproteínas), entonces la diferencia de densidades en el numerador es más pequeña para la dislipidemia, y de igual manera el denominador es mayor para la dislipidemia. Por tanto, si el numerador es menor y el denominador es mayor, entonces se estima que la VSG de sangre con dislipidemia tiende a ser menor o equivalente a la VSG de sangre sana:

$VSG_{dislip} \lesssim VSG_{sana}$	(B2)
------------------------------------	------

En sangre con anemia la medición de la VSG es fuertemente afectada por alteraciones eritrocitarias como el tamaño (VCM: anisocitosis, macrocitosis, microcitosis) y la distribución (agregación), de hecho, varias de estas alteraciones pueden estar presentes en una misma muestra. De la teoría sabemos que la VSG se incrementa en anemia con el aumento del tamaño del agregado final y con la disminución del tiempo de retardo para la agregación. En general, la sangre con anemia contiene eritrocitos más grandes o más pequeños con respecto a los eritrocitos presentes en sangre sana (depende del tipo de anemia), por lo que de acuerdo con la **Ecuación B1** la VSG tiende a elevarse con un aumento pequeño de su tamaño debido a que es directamente proporcional al cuadrado del radio de los eritrocitos; si consideramos que su tiempo de retardo también es notablemente más corto, es decir, el crecimiento de los agregados en la primera fase es más rápido que en la sangre sana; que el parámetro de deformabilidad del eritrocito probablemente también es menor en sangre con anemia que en sangre sana debido a las anormalidades en su forma (poiquilocitosis, esferocitosis, esquistocitosis, queratocitosis, drepanocitosis); que la viscosidad de la sangre con anemia es menor; y

además, que el hematocrito también es menor (lo cual implica que el factor de reducción debido al flujo ascendente del plasma sea mayor), entonces indudablemente se estima que la VSG de sangre con anemia tiende a ser mayor o equivalente a la VSG de sangre sana:

$VSG_{sana} \lesssim VSG_{anemia}$	(B3)
------------------------------------	------

Las relaciones anteriores (**Ecuación B2** y **Ecuación B3**), nos conducen a la siguiente relación generalizada (**Ecuación B4**) para las velocidades de sedimentación eritrocitaria de sangre entera sana, anemia y dislipidemia. Se estima que la VSG de sangre con anemia tiende a ser generalmente superior a la VSG de sangre sana y VSG de sangre con dislipidemia:

$VSG_{dislip} \lesssim VSG_{sana} \lesssim VSG_{anemia}$	(B4)
--	------

Este apartado se realizó para estimar que las muestras de sangre humana con alguna clase de enfermedad presentan una VSG diferente a la VSG de referencia de sangre sana, ya que están involucrados distintos factores, como los presentados en la **Ecuación B1**, que varían con relación al tipo de enfermedad. En un análisis más detallado sobre la VSG se debe prestar atención a la concentración de las proteínas plasmáticas, las cuales influyen con el potencial zeta en la formación de agregados de eritrocitos y son el principal contribuyente de la viscosidad sanguínea.

C. Correlación de la VSG con MV y MF

En esta sección se presenta la correlación de las velocidades medias obtenidas a través de los dos métodos empleados en este trabajo: Método Visual (MV) y Método Fotoacústico (MF). Dado que la Velocidad de Sedimentación Globular a partir del Método Visual (VSG MV) de las muestras individuales ya fueron calculadas y presentadas en la **Tabla 4**, se describe ahora la manera en que se obtuvo la Velocidad de Sedimentación Globular a través del Método Fotoacústico (VSG MF) para cada muestra.

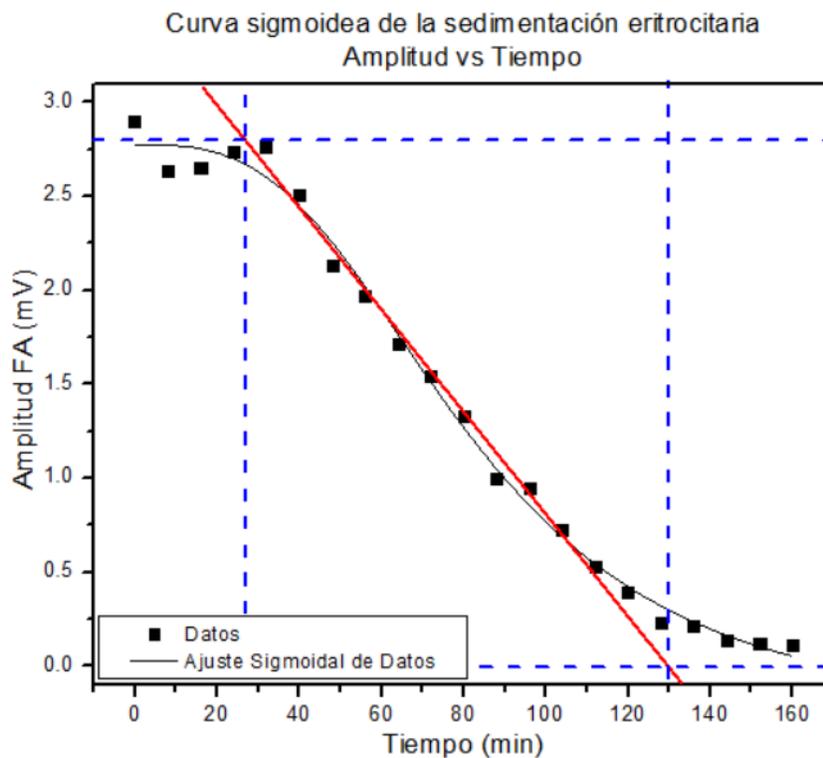


Figura 30. Pendiente de la recta del ajuste lineal (línea roja) correspondiente al intervalo de la fase de precipitación (2ª fase) de la curva sigmoidea de una muestra de sangre sana.

En la **Figura 30** se muestra la gráfica de las amplitudes máximas de los picos principales de las señales FA del monitoreo en función del tiempo de la sedimentación eritrocitaria. La gráfica es semejante a la **Figura 26**, con la diferencia de que en este procedimiento no se normalizó la curva obtenida. Una vez realizado el ajuste sigmoideal, se trazan la asíntota inferior y superior de la curva, así como las líneas verticales que sirven de referencia para identificar el intervalo correspondiente a la fase de precipitación (2ª fase).

Posteriormente, se realizó el ajuste lineal de este intervalo para obtener la pendiente asociada a la recta, la cual se interpretó como la velocidad media de sedimentación eritrocitaria (VSG MF) y se transformó a valores positivos con unidades de mV/hora. La **Figura 30** solo es un ejemplo del procedimiento realizado para cada una de las muestras de sangre consideradas. En la **Tabla 8** se muestran los ID de las muestras y se presenta la medición de la Velocidad de Sedimentación Globular obtenida a través del Método Visual (VSG MV) y del Método Fotoacústico (VSG MF). Las muestras son ordenadas de acuerdo a la clasificación: Sana, Anemia Hemolítica y Dislipidemia de grado 3 + y 4 +.

Velocidad de Sedimentación Globular (Método Visual y Método Fotoacústico)							
Muestra #	ID	VSG MV [mm/hora]	VSG MF [mV/hora]	Muestra #	ID	VSG MV [mm/hora]	VSG MF [mV/hora]
Sana							
1	S1	8.73	2.42	6	S6	2.20	1.57
2	S2	10.43	2.67	7	S8	3.24	1.27
3	S3	20.00	4.73	8	S9	8.57	2.23
4	S4	6.49	1.78	9	S10	8.28	2.37
5	S5	10.43	2.51	10	S11	5.00	0.88
Anemia Hemolítica							
1	A1	13.33	1.67	8	A8	28.24	8.64
2	A2	30.00	4.61	9	A9	13.55	1.76
3	A3	45.00	5.35	10	A10	13.85	4.58
4	A4	12.86	2.44	11	A11	25.00	2.56
5	A5	22.50	2.36	12	A12	7.06	0.45
6	A6	7.30	0.82	13	A14	43.64	8.52
7	A7	23.08	1.47	14	A15	7.06	2.01
Dislipidemia 3+							
1	L31	8.00	2.80	5	L36	4.50	2.26
2	L33	21.43	7.56	6	L37	4.90	0.46
3	L34	10.00	5.71	7	L38	7.94	2.71
4	L35	7.27	4.14				
Dislipidemia 4+							
1	L41	7.06	1.74	5	L45	8.00	2.26
2	L42	9.80	3.52	6	L46	8.57	2.63
3	L43	6.86	1.82	7	L47	8.00	3.59
4	L44	15.43	5.00				

Tabla 8. Tabla de datos correspondientes al Método Visual y Método Fotoacústico. Los valores de VSG MF fueron obtenidos a partir del análisis del monitoreo y amplitud de las señales FA.

En la **Figura 31** se presenta la correlación de la VSG MV y VSG MF para cada uno de los cuatro grupos presentados en la **Tabla 8**.

Correlación de la VSG calculadas con MV y MF (VSG MF) vs (VSG MV)

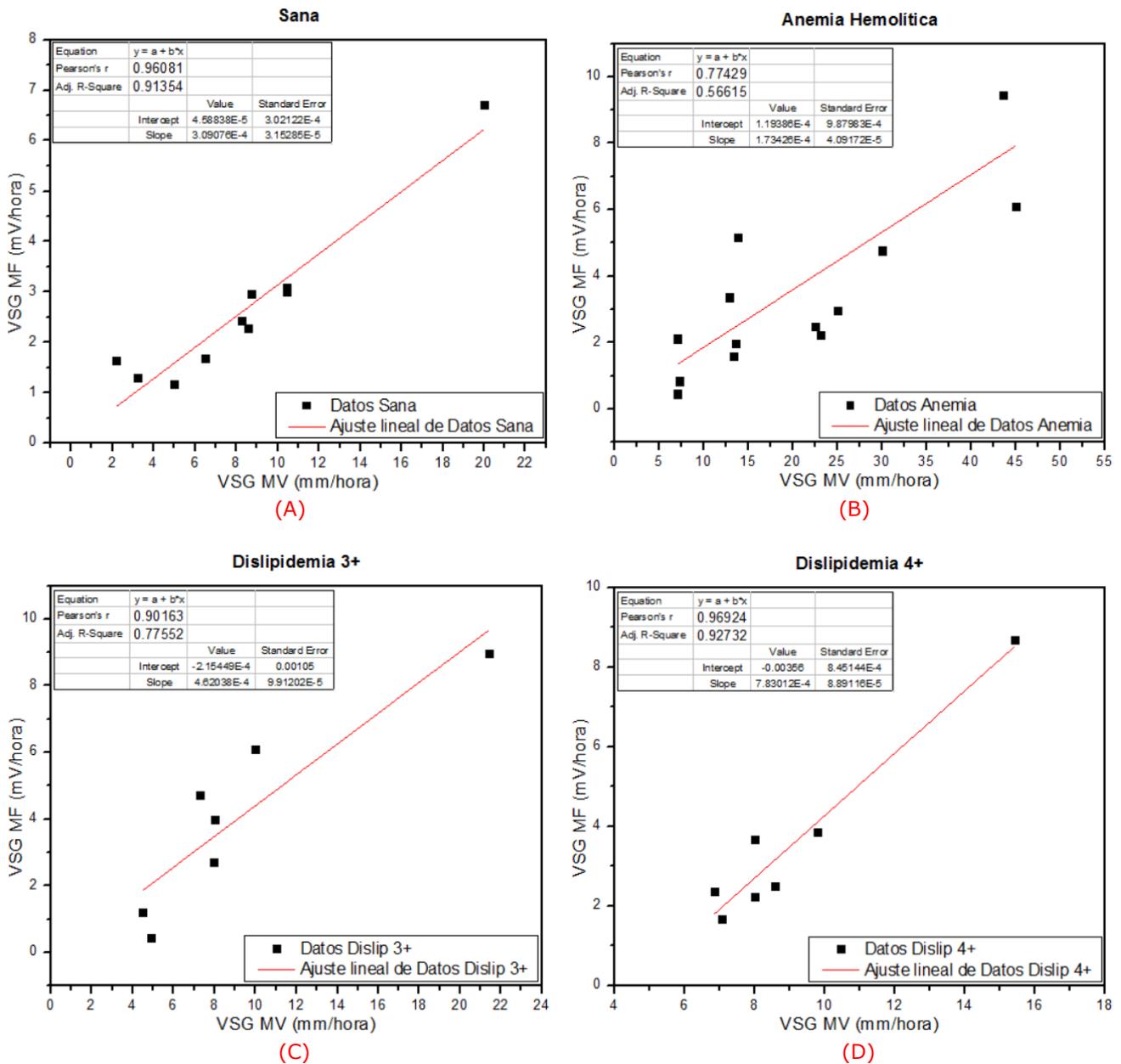


Figura 31. Correlación de la Velocidad de Sedimentación Globular con Método Visual (VSG MV) vs Velocidad de Sedimentación Globular con Método Fotoacústico (VSG MF), para cada grupo de sangre: **(A)** Sana, **(B)** Anemia Hemolítica, **(C)** Dislipidemia 3 + y **(D)** Dislipidemia 4 +. Los valores corresponden a los presentados en la **Tabla 8**.

El ajuste lineal que se realizó aparentemente es un buen modelo, ya que los datos de los cuatro grupos de sangre se ajustan considerablemente bien a la recta de ajuste. El *coeficiente de correlación lineal de Pearson* (r) que tomamos como medida estadística es cercano a $r = 1$ en tres de los cuatro grupos, lo que significa que nuestras dos variables tienen una relación lineal fuerte, pues los datos se ajustan de buena manera a una recta de pendiente positiva, y por consecuencia permite realizar predicciones aceptables de la variable VSG MF en función de la VSG MV. Por otro lado, el *coeficiente de determinación ajustado* nos indica que el modelo lineal también es bueno para replicar resultados. En general, la información que se presenta en la **Tabla 9** nos conduce a afirmar que las dos variables medidas con distintos métodos tienen un buen grado de dependencia.

Coeficientes de correlación de Pearson y de determinación ajustado		
Grupo	Coef. Pearson r	Coef. Determin. $R^2_{ajustado}$
Sana	0.96	0.91
Anemia Hemo.	0.77	0.57
Dislipidemia 3+	0.90	0.77
Dislipidemia 4+	0.97	0.93

Tabla 9. Coeficientes de correlación lineal de Pearson y coeficiente de determinación ajustado correspondientes a las gráficas de los grupos de sangre de la Figura 31.

El coeficiente de correlación de Pearson y de determinación ajustado es menor para el grupo de Anemia Hemolítica, ver **Figura 31 (B)**, ésta relación moderada de las variables puede deberse a la imprecisión para identificar la fase de precipitación en la curva sigmoidea de cada muestra, pues debido a la variabilidad de anomalías en este grupo, no necesariamente se debe asumir un comportamiento cuyo mejor ajuste sea uno sigmoidal. También se puede deber a una medición imprecisa del desplazamiento recorrido por la interfaz plasma-eritrocito con el Método Visual, pues la anemia sedimenta rápidamente. Aún con todas las observaciones anteriores, estos valores siguen siendo altos si se considera que se están estudiando muestras biológicas, cuyas condiciones pueden variar por algún pequeño factor no controlado.

Referencias

- [1] P. A. Lomelí Mejía, N. P. Castellanos Ábrego, M. M. Méndez González, A. Cruz Orea y J. L. Jiménez Pérez, «Aplicaciones biofísicas de la fotoacústica,» *Investigación en Discapacidad*, vol. 1, nº 2, pp. 90-94, 2012.
- [2] A. Rosencwaig y A. Gersho, «Theory of the photoacoustic effect with solids,» *Journal of Applied Physics*, vol. 47, nº 1, pp. 64-69, 1976.
- [3] E. Marín, «Escuchando la luz: breve historia y aplicaciones del efecto fotoacústico,» *Lat. Am. J. Phys.*, vol. 2, nº 2, pp. 209-215, 2008.
- [4] S. Manohar y D. Razansky, «Photoacoustics: a historical review,» *Advances in Optics and Photonics*, vol. 8, nº 4, p. 32, 2016.
- [5] G. Tortora y B. Derrickson, *Principios de Anatomía y Fisiología*, 13 ed., Ciudad de México: Médica Panamericana, 2013.
- [6] G. Campuzano Maya, «Eritrosedimentación: réquiem para una prueba,» *Medicina & Laboratorio*, vol. 16, nº 1-2, pp. 11-40, 2010.
- [7] W. Ackroyd, «The Photophone,» *Science for All*, vol. IV, pp. 307-312, 1884.
- [8] M. L. Viengerov, «New method of gas analysis based on Tyndall-Roentgen optoacoustic effect,» *Doklady Akademii Nauk SSSR*, vol. 19, nº 687, 1938.
- [9] E. L. Kerr y J. G. Atwood, «The Laser Illuminated Absorptivity Spectrophone: A Method for Measurement of Weak Absorptivity in Gases at Laser Wavelengths,» *Applied Optics*, vol. 7, nº 5, pp. 915-921, 1968.
- [10] C. L. Hu, «Spherical Model of an Acoustical Wave Generated by Rapid Laser Heating in a Liquid,» *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 46, nº 3, pp. 728-736, 1969.
- [11] M. W. Sigrist y F. K. Kneubühl, «Laser-generated stress waves in liquids,» *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 64, nº 6, pp. 1652-1663, 1978.
- [12] L. Amar, M. Bruma, P. Desvignes, M. Leblanc, G. Perdriel y M. Velghe, «Detection, d'ondes élastiques (ultrasonores) sur l'os occipital, induites par impulsions laser dans l'oeil d'un lapin,» *C. R. Acad. Sci. Paris*, vol. 259, pp. 3653-3655, 1964.
- [13] L. Amar, M. Bruma, M. Velghe y P. Desvigne, «On detection of laser induced ultrasonic waves in human eye and elaboration of a theory of fundamental mechanism of vision,» *Z. Angew. Math. Phys.*, vol. 16, pp. 182-183, 1965.

- [14] A. Rosencwaig, «Photoacoustic Spectroscopy of Biological Materials,» *Science*, vol. 181, pp. 657-658, 1973.
- [15] C. Haisch, «Photoacoustic spectroscopy for analytical measurements,» *IOP Publishing*, vol. 23, p. 17, 2012.
- [16] R. Pérez Solano, G. Gutiérrez Juárez y L. Polo Parada, «Modelo esféricamente simétrico de la señal fotoacústica en el dominio temporal producida por objetos micrométricos: el caso de células de melanoma in vitro,» *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, vol. 25, nº 2, pp. 75-81, 2012.
- [17] D. R. Vázquez, «Tesis: Estudio de partículas de grafito en suspensión usando la técnica fotoacústica con láser pulsado a 355 y 532 nm,» UNAM, Facultad de Ciencias, Ciudad de México, 2019.
- [18] J. E. Alba Rosales, G. Ramos Ortiz, L. F. Escamilla Herrera, B. Reyes Ramírez, L. Polo Parada y G. Gutiérrez Juárez, «Effects of optical attenuation, heat diffusion, and acoustic coherence in photoacoustic signals produced by nanoparticles,» *Applied Physics Letters*, vol. 112, pp. 143101 (1-5), 2018.
- [19] A. Landa, J. J. Alvarado Gil, G. Gutiérrez Juárez y M. Vargas Luna, «Photoacoustic monitoring of real time blood and hemolymph sedimentation,» *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, nº 1, pp. 377-379, 2003.
- [20] D. O. Lapotko y E. Y. Lukianova, «Influence of Physiological Conditions on Laser Damage Thresholds for Blood, Heart, and Liver Cells,» *Lasers in Surgery and Medicine*, nº 36, pp. 13-21, 2005.
- [21] B. Ulloa Rosero, M. Tapia Cadena, C. Toscano Gallardo y C. Pozo Larco, *Fundamentos de hematología*, Quito, Ecuador: EDIMEC, 2017.
- [22] J. Sans Sabrafen, C. Besses Raebel y J. L. Vives Corrons, *Hematología Clínica*, España: Elsevier, 2006.
- [23] S. B. McKenzie, *Hematología clínica*, México D.F.: El Manual Moderno, 2000.
- [24] E. Feliu, J. M. Ribera, A. Flores y M. Batlle, *Esquemas Clínico-Visuales en Hematología*, Madrid, España: Harcourt, 2001.
- [25] P. E. Miguel Soca, «Dislipidemias,» *ACIMED*, vol. 20, nº 6, pp. 265-273, 2009.
- [26] R. Fahraeus, «The suspension stability of the blood,» *Physiological Reviews*, vol. IX, nº 2, pp. 241-274, 1929.
- [27] CLSI, «H02-A5 Procedures for the Erythrocyte Sedimentation Rate Test, 5th Edition,» mayo 2011. [En línea]. Available: <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h02/>. [Último acceso: 27 octubre 2019].

- [28] CLSI, «The History of Clinical and Laboratory Standards Institute,» [En línea]. Available: <https://clsi.org/about/clsis-history/>. [Último acceso: 27 octubre 2019].
- [29] M. Girona Callol, «La Velocidad de Sedimentación Globular en relación con las anemias,» *Anales de Medicina y Cirugía*, vol. XIX, nº 11, pp. 326-328, 1946.
- [30] CLSI, «H2-A4 Reference and Selected Procedure for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test: Approved Standard, 4th Edition,» vol. 20, nº 27, p. 25.
- [31] N. Z. Mendoza Martínez, «Tesis: Determinación del punto de corte de un método automatizado que determina el parámetro Velocidad de Sedimentación Globular y correlación con el método manual de Wintrobe, en la población pediátrica del INP,» UNAM, Facultad de Química, México D.F., 2014.
- [32] A. Miller, M. Green y D. Robinson, «Simple rule for calculating normal erythrocyte sedimentation rate,» *British Medical Journal*, vol. 286, p. 266, 1983.
- [33] B. F. Rodak, G. A. Fritsma y E. M. Keohane, *Hematology: Clinical principles and applications*, St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012.
- [34] H.G.M., «Manual de Procedimientos Técnicos,» Laboratorio de Hematología Especializada del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Unidad 204, Ciudad de México.
- [35] V. L. Streeter, E. B. Wylie y K. W. Bedford, *Mecánica de fluidos*, Santafé de Bogota, Colombia: Mc Graw Hill, 2000.
- [36] S. Oka, «A physical theory of erythrocyte sedimentation,» *Biorheology*, vol. 22, nº 4, pp. 315-321, 1985.
- [37] A. C. Groom y J. C. Anderson, «Measurement of the Size Distribution of Human Erythrocytes by a Sedimentation Method,» *Journal of Cellular Physiology*, nº 79, pp. 127-137, 1971.
- [38] D. Kernick, A. W. L. Jay y S. Rowlands, «Erythrocyte Settling,» *Can. J. Physiol. Pharmacol*, vol. 52, pp. 1167-1177, 1974.
- [39] X. Huang, A. Yoshikoshi, K. Hirano y A. Sakanishi, «Effects of contrast media on erythrocyte aggregation during sedimentation,» *Can. J. Physiol. Pharmacol*, vol. 81, pp. 397-404, 2003.
- [40] R. Paschotta, «Artículo sobre "Láseres YAG" en la RP Photonics Encyclopedia,» [En línea]. Available: https://www.rp-photonics.com/yag_lasers.html. [Último acceso: 01 noviembre 2019].
- [41] Quantel, «Brilliant b: Hoja de datos,» [En línea]. Available: <https://www.velocimetry.net/laser%20catalogues/quantel/Brilliant%20B%20Qswitched%20NdYAG%20oscillator.pdf>. [Último acceso: 26 octubre 2019].

- [42] Tektronix, «Mixed Signal Oscilloscopes: Hoja de datos,» [En línea]. Available: <https://www.tek.com/datasheet/mixed-signal-oscilloscopes>. [Último acceso: 01 noviembre 2019].
- [43] FECYT, «Materiales piezoeléctricos,» *Boletín Vigilancia Tecnológica*, nº 3, p. 12, 2010.
- [44] J. S. Harrison y Z. Ounaies, «Piezoelectric Polymers,» *NASA Langley Research Center. ICASE*, p. 26, December 2001.
- [45] S. B. Lang y S. Muensit, «Review of some lesser-known applications of piezoelectric and pyroelectric polymers,» *Appl. Phys. A*, pp. 125-134, 2006.
- [46] TE Connectivity, «LDT1-028K Piezo Sensor: Hoja de datos,» Measurement Specialties, [En línea]. Available: https://www.te.com/commerce/DocumentDelivery/DDEController?Action=showdoc&DocId=Data+Sheet%7FLDT_with_Riveted_Leads%7FA1%7Fpdf%7FEnglish%7FENG_DS_LDT_with_Riveted_Leads_A1.pdf%7FCAT-PFS0007. [Último acceso: 05 noviembre 2019].
- [47] Measurement Specialties, «Piezo Film Sensors: Technical Manual,» [En línea]. Available: <https://www.sparkfun.com/datasheets/Sensors/Flex/MSI-techman.pdf>. [Último acceso: 05 noviembre 2019].
- [48] Thorlabs, «PDA10A Si Amplified Fixed Gain Detector: User Guide,» [En línea]. Available: <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=PDA10A&pn=PDA10A>. [Último acceso: 05 noviembre 2019].
- [49] Sigma-Aldrich, «UV quartz cuvette Z276669,» [En línea]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z276669?lang=en®ion=US>. [Último acceso: 05 noviembre 2019].
- [50] L. Thomas, «Hemólisis como influencia y factor de interferencia,» *EJIFCC*, vol. 13, nº 4, pp. 107-113, 2002.
- [51] G. Campuzano Maya, «Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos,» *Medicina & Laboratorio*, vol. 1, nº 69, pp. 311-357, 2008.
- [52] Y. Lin, Y. Huang, G. Wang, T. R. J. Tzeng y D. B. Chrisey, «Effect of laser fluence on yeast cell viability in laser-assisted cell transfer,» *Journal of Applied Physics*, nº 106, pp. 1-7, 2009.
- [53] A. Chocó, «Elementos para evitar errores en el diseño de investigaciones en ciencias de la salud,» *Revista Científica*, vol. 26, nº 1, pp. 78-92, 2016.
- [54] J. Moncho Vasallo, *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*, Barcelona, España: Elsevier, 2015.
- [55] A. Pérez Pacheco, *Poster: Analysis of photoacoustic signals of crystal violet dye solutions*, México D.F.: Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI, 2019.

- [56] M. Kinnunen y R. Myllyla, «Effect of glucose on photoacoustic signals at the wavelengths of 1064 and 532 nm in pig blood and intralipid,» *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 38, pp. 2654-2661, 2005.
- [57] E. Hysi, R. K. Saha y M. C. Kolios, «On the use of photoacoustics to detect red blood cell aggregation,» *Biomedical Optics Express*, vol. 3, nº 9, pp. 2326-2338, 2012.
- [58] OriginLab, «Logistic,» [En línea]. Available: <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/Logistic-FitFunc>. [Último acceso: 20 abril 2020].
- [59] E. G. Ruedlinger Standen, «Tesis: Ultrasonografía Médica,» UACH, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Valdivia, Chile, 2002.
- [60] D. C. Giancoli, *Physics: Principles with applications*, New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005.