



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE FIRMAS FOTOTÉRMICAS DE SANGRE ENTERA POR FOTOACÚSTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

FISICO

P R E S E N T A:

Flor del Carmen Cortés Ortegón

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Argelia Pérez Pacheco
Investigadora en Ciencias Médicas



Ciudad Universitaria, CDMX, 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi querida UNAM y en especial a la Facultad de Ciencias que con su formación me ha permitido llegar hasta aquí.

También quiero agradecer al equipo de la “Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Hospital General de México”, quiénes me permitieron usar las instalaciones y el equipo apropiado para la realización experimental de este proyecto. Particularmente a mi directora de tesis la *Dra. Argelia Pérez Pacheco* por la paciencia, el aprendizaje constante, su apoyo, tiempo y dedicación con la que me guio en la realización de este trabajo de investigación, por sus valiosas sugerencias y correcciones. Un agradecimiento especial al Dr. Adolfo Pérez García quien con su conocimiento brindó las bases para la elaboración del análisis estadístico que se describe en este trabajo.

Así mismo, mi agradecimiento y reconocimiento a mis sinodales: *Dr. Mayo Villagrán Muñiz*, *Dr. Augusto García Valenzuela*, *Dr. Lenin Francisco Escamilla Herrera* y al *Dr. Jesús Flores Mijangos*, por sus valiosas sugerencias y comentarios para mejorar mi trabajo.

Extiendo mi agradecimiento al equipo que forma parte del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” (HGMDEL), ya que con su autorización se me proporcionaron las muestras de las personas diagnosticadas con anemia hemolítica y leucemia, por otro lado, gracias también al personal del Banco de Sangre del HGMDEL quienes me brindaron las muestras de donantes, sin la valiosa ayuda e intervención de estos dos servicios no habría sido posible el desarrollo de esta investigación. Incluyo también un agradecimiento especial a CONACYT por el apoyo complementario otorgado de infraestructura científica, (No. 206574), 2013.

Gracias también a esos amigos invaluable que me han apoyado durante todo este proceso,

algunos de cerca y otros a la distancia, mandando toda esa buena vibra y motivación cuando me sentía desesperada; a mi mejor amigo, mi cómplice y compañero de vida Jesús, a mis mejores amigos Aida, Belem, Miguel, David, y muchos otros que si no he mencionado les pido me disculpen, pero los tengo muy presentes. Gracias también a mi compañero de investigación y ahora amigo Marco, por su apoyo, por esas discusiones que nos ayudaban a concretar ideas y por esos buenos momentos trabajando juntos en el laboratorio, no hubiera sido lo mismo sin ti.

Finalmente, por encima de todo, infinitamente agradecida con mis padres, por estar siempre presentes con su cariño, lecciones de vida y apoyo incondicional, por no permitir que me rinda, por la paciencia y motivación que a pesar de todo siempre he recibido, no me va a alcanzar la vida para agradecerles por tantas cosas, este pequeño logro es por y para ustedes.

CONTENIDO

RESÚMEN.....	7
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO 1	10
ANTECEDENTES DE LA FOTOACÚSTICA	10
<i>1.1 Antecedentes históricos</i>	<i>10</i>
<i>1.2 Efecto Fotoacústico</i>	<i>14</i>
<i>1.2 Generación y detección de señales fotoacústicas en líquidos.....</i>	<i>16</i>
<i>1.4 Transductores y sensores</i>	<i>19</i>
<i>1.5 Efecto Piezoeléctrico</i>	<i>19</i>
<i>1.6 Sensor Piezoeléctrico de PVDF</i>	<i>21</i>
CAPÍTULO 2:	
APLICACIONES DE LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA EN MEDICINA	23
CAPÍTULO 3:	
LA SANGRE Y SUS COMPONENTES.....	26
<i>3.1 Biometría Hemática y Serología.....</i>	<i>28</i>
CAPÍTULO 4	
ENFERMEDADES PATOLÓGICAS EN LA SANGRE	33
<i>4.1 Anemia</i>	<i>34</i>
<i>4.2 Anemia Hemolítica</i>	<i>37</i>
<i>4.3 Fragilidad osmótica de los eritrocitos</i>	<i>38</i>
<i>4.3 Leucemia.....</i>	<i>40</i>
CAPÍTULO 5:	
METODOLOGÍA	42
<i>5.1 Reglas de seguridad para el uso de sustancias biológicas</i>	<i>42</i>
<i>5.2 Arreglo experimental.....</i>	<i>44</i>
<i>5.3 Procedimiento experimental.....</i>	<i>47</i>

CAPÍTULO 6:

ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
<i>6.1 Análisis de sangre sana</i>	<i>52</i>
<i>6.2 Análisis de sangre con anemia hemolítica</i>	<i>63</i>
<i>6.3 Análisis de sangre con Leucemia</i>	<i>74</i>
<i>6.4 Análisis de áreas de las señales fotoacústicas</i>	<i>77</i>
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	88
ANEXO	91
<i>Fluencia.....</i>	<i>91</i>

RESÚMEN

En el presente trabajo, haciendo uso de la técnica fotoacústica, se estudió la sangre total¹ de sujetos sanos y sangre de sujetos diagnosticados con los siguientes trastornos: anemia hemolítica y leucemia, a fin de identificar patrones y/o características asociadas a cada condición a través de sus señales fototérmicas.

El proceso de generación de señales fotoacústicas se debe a la absorción de la energía de la radiación incidente de la muestra de sangre que al calentarse experimenta expansiones termoelásticas y posteriormente ondas de presión. Las propiedades ópticas y termoelásticas de la muestra se encuentran involucradas en las señales generadas después de la incidencia laser, éstas señales son detectadas con un sensor ultrasónico y son analizadas.

Se obtuvieron las firmas fototérmicas de las distintas muestras de sangre estudiadas y se analizaron según su patología. El análisis de las señales se realizó mediante el primer máximo de la señal, el tiempo de arribo y a través del área bajo la curva, con ello fue posible identificar diferencias estadísticas en función del trastorno asociadas a la estructura, cantidad, forma y tamaño de las células.

Los resultados de estos análisis se presentan en el capítulo 7, iniciando con el análisis de sangre sana, posteriormente de sangre con anemia y a continuación de sangre con leucemia, finalmente se expone el análisis estadístico realizado y las conclusiones.

El trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT), del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Las muestras de sangre fueron otorgadas por el Banco de Sangre y por el laboratorio de Hematología del Hospital General de México.

¹ **Sangre total:** Se llama así a la sangre que conserva cada una de sus componentes (células y plasma), es decir, se mantiene tal como ha sido extraída de los donantes y/o pacientes.

INTRODUCCIÓN

Muchas investigaciones en medicina donde se realizan análisis de muestras biológicas se basan en la utilización de sistemas espectroscópicos. Estos sistemas presentan algunas desventajas ya que en algunos casos la luz no puede adentrarse profundamente en el tejido biológico sin dispersarse y en el caso de obtener imágenes, éstas resultan borrosas, lo que impide visualizar profundamente el interior del cuerpo humano o resultan en técnicas que son nocivas para las células, por lo que su uso debe limitarse al mínimo.

Con el desarrollo de la tecnología, diferentes técnicas se han aplicado para el estudio de muestras biológicas. Una de las técnicas es la fotoacústica que combina los principios básicos de las propiedades ópticas y del sonido ofreciendo una técnica no-invasiva y no-ionizante, además permite estudiar materiales en estado sólido, líquido o gas, inclusive se pueden estudiar materiales opacos, que otras técnicas espectroscópicas no podrían estudiar [1]. El efecto fotoacústico consiste en la generación de ondas acústicas producidas por la absorción de luz de un material determinado [2].

En este proyecto de investigación se trabajó con un biofluido: la sangre humana, la cual fue clasificada en sangre total de sujetos sanos y sangre de sujetos diagnosticados con los siguientes trastornos: anemia hemolítica y leucemia. Se aplicó la técnica fotoacústica a las muestras para ello se utilizó un láser de Nd-YAG con una longitud de onda de 532 nm, un osciloscopio, un sensor piezoeléctrico de PVDF modelo LDT1-028K, se obtuvieron las señales fotoacústicas producidas por las distintas muestras de sangre y se analizaron según su patología.

Se lograron identificar las señales fototérmicas características de sujetos sanos, sin embargo, dado que las señales fotoacústicas muestran toda la información referente a las células y sustancias de la sangre, trabajar con patologías como anemia hemolítica y leucemia fue complicado dadas sus características clínicas, a pesar de esto, para el caso de la anemia hemolítica se lograron identificar diferencias y patrones entre anemia microcítica, y macrocítica. Gracias a las observaciones realizadas

por personal del laboratorio de hematología y los análisis de la biometría hemática, se confirmaron diferencias entre las patologías debidas al tamaño de las células, densidad y forma. Estas diferencias fueron quienes determinaron la forma final de la señal fotoacústica, además haciendo un análisis del primer máximo de la señal se corrobora que existe una correlación entre la hemoglobina y la amplitud de las señales fotoacústicas que se estudiaron.

Finalmente se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS, a través del área bajo la curva de las señales completas, con ello fue posible identificar que las diferencias estadísticas entre las muestras de donantes, anemia hemolítica y leucemia, no sólo son producto del trastorno hematológico, sino que también se encuentran relacionadas con las características clínicas propias de cada patología.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES DE LA FOTOACÚSTICA

1.1 Antecedentes históricos

El efecto fotoacústico fue descubierto por Alexander Graham Bell quien fue un científico, inventor y logopeda británico [3][4]. Según su bibliografía, la madre y esposa de Bell eran sordas, lo que influyó profundamente en sus trabajos de investigación sobre la detección y emisión del sonido. Después de la invención del teléfono, en 1876, Bell comenzó a centrar su atención en un nuevo concepto: el uso de la luz para transmitir sonido. Hacia 1873 se descubre la fotosensibilidad del selenio y cinco años más tarde Bell iniciaría experimentos para adaptar las propiedades de este (entre ellas la variación de su resistencia eléctrica cuando absorbe la luz) a la transmisión telefónica. Aunque el mismo Alexander da crédito a A.C. Brown por la primera demostración de la reproducción del sonido debida a la acción de luz sobre selenio en circuito con una batería y un teléfono, la primera evidencia bien documentada de la transmisión de sonido mediante la luz pertenece a Bell y a su asistente Charles Sumner Tainter (un conocido fabricante de instrumentos ópticos), quienes pudieron transmitir mensajes de voz de forma inalámbrica en junio de 1880.

Fue el 27 de agosto de 1880, cuando Bell presenta por primera vez un aparato funcional llamado “fotófono” en una reunión de la “*American Association for the Advancement of Science*”, en Boston, según él sería un instrumento más revolucionario que el teléfono conocido hasta entonces y que había patentado años antes, pues pretendía cumplir la misma funcionalidad que el teléfono, pero de forma inalámbrica, con este nuevo hallazgo intentaba transmitir la voz a grandes distancias utilizando la luz solar como medio de transporte de la información [3].

El fotófono funcionaba de la siguiente manera (*ver Figura 1 y 2*): un haz de luz proveniente del sol rebotaba contra un espejo, el haz era direccionado a un espejo oscilante que vibraba en respuesta a

la voz de la persona que hablaba por la boquilla. Así, cuando la luz del sol se proyectaba sobre el espejo, las vibraciones de la voz se superponían con el haz de luz reflejado, la señal modulada en forma de luz (que provenía del espejo oscilante) se dirigía hacia un detector fotoresistivo de selenio, cuya resistencia disminuía al recibir más luz y aumentaba al recibir menos. Este detector estaba acoplado a un circuito eléctrico con un generador. Como último paso, para transformar de nuevo la señal eléctrica en acústica se incluía un altavoz en el circuito de manera análoga a la del teléfono.

Como vemos la clave del fotófono estaba en transformar la señal óptica en eléctrica y finalmente en acústica.

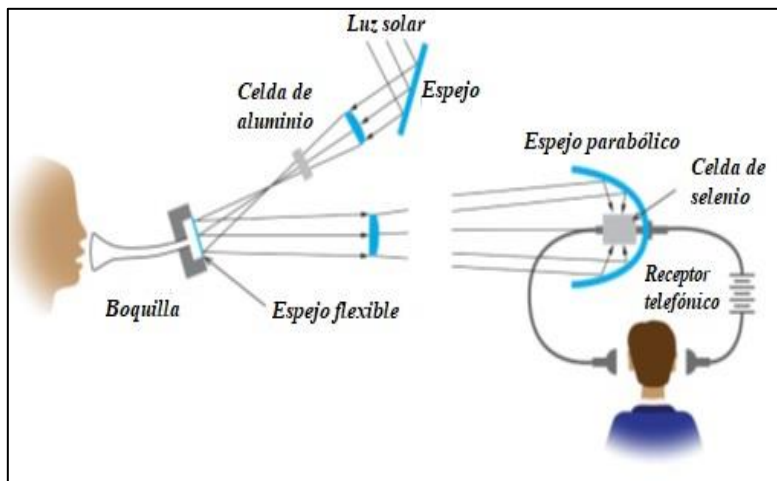


Figura 1. Fotófono, diseñado y construido por Alexander G. Bell y Charles S. Tainer. [1]

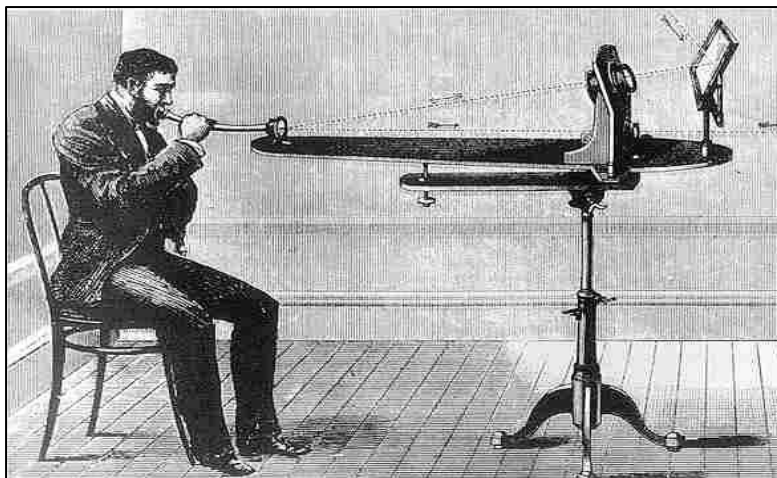


Figura 2. Alexander Graham Bell mostrando el funcionamiento del fotófono. [4]

Cabe destacar que la celda de selenio del fotófono puede ser considerada la primera implementación práctica de telefonía inalámbrica o, de hecho, el primer dispositivo de comunicación óptica.

Trabajando en sus experimentos con el fotófono, Bell descubrió que al iluminar diferentes materiales sólidos era posible producir sonidos por la acción de una luz variable [6].

En octubre del mismo año Bell viaja a Francia a recibir el premio Volta, que le otorgaron por el desarrollo del teléfono, llevando consigo el fotófono y hace una demostración. Como era de esperarse el descubrimiento del efecto "sonoro" inducido por la luz causó una gran conmoción en la comunidad científica presente. Así que no fue sorpresa que además de Bell, muchos científicos notables de la época comenzaron a realizar más investigaciones experimentales y teóricas sobre el fenómeno, entre ellos están:

- Lord Rayleigh quien concluyó en 1881, que la explicación a los sonidos producidos por la luz, era efecto de una vibración debido a un calentamiento desigual de los diafragmas o placas cuando se iluminaba con luz intermitente.[3]
- Mercadier y Preece estudiaron el efecto en una variedad de materiales y postularon el calentamiento y enfriamiento periódico del aire en contacto térmico con el disco causó la producción de sonido. [3]
- Röntgen y Tyndall mostraron que el fenómeno no se restringía a cuerpos sólidos, y estudiaron el efecto en la absorción de gases y vapores. Röntgen estudió gas de iluminación (gas de carbón) y amoníaco, mientras que Tyndall estudió una gran cantidad de gases y vapores, incluidos los de perfumes.[3]

A través de estas investigaciones iniciales se comprendió que el efecto ofrecía la posibilidad de obtener información espectral de diversos tipos de muestras.[7]

Inmerso en sus experimentos Bell llegó a descubrir con el fotófono, colocando el selenio en forma de diafragma sobre el tubo de escucha, que ese material (y otros sólidos) emitía sonido cuando era

iluminado con luz modulada (es decir, luz cuya intensidad se modificaba), esto se conseguía haciendo pasar el haz de luz por un disco rotatorio con agujeros. Incluso utilizando un dispositivo denominado "Espectrófono" (Figura 3), encontró que la intensidad del sonido emitido depende de la longitud de onda o color de la luz incidente, y que por lo tanto el efecto debía ser atribuido a un proceso de absorción óptica del material utilizado y que además dicha absorción se daba fuera de la región del espectro visible.

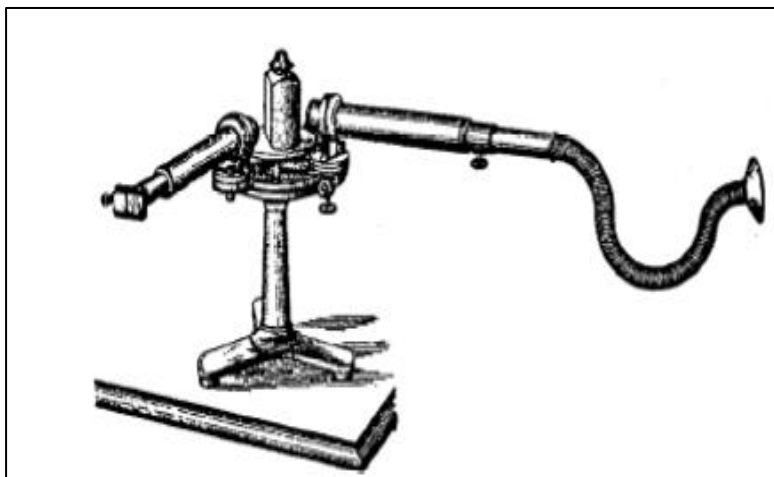


Figura 3. El Espectrófono de Bell. La luz solar entra por el tubo de la izquierda, una especie de telescopio donde un sistema de lentes la hace incidir sobre el prisma colocado en el centro donde se separa en diferentes longitudes de onda, antes de incidir sobre el prisma colocado en el centro donde se separa en diferentes longitudes de onda, antes de incidir sobre un material sólido colocado a la entrada del tubo de la derecha y provocar el efecto fotoacústico. Las ondas sonoras generadas se propagan a través del tubo de escucha de manera similar a como lo hacen en el estetoscopio. [3]

Después de la conmoción causada, el efecto radiofónico (término con el que se conocía en esa época al efecto fotoacústico) se desvaneció en las notas al pie de la ciencia del siglo XIX, principalmente porque los experimentos eran difíciles de cuantificar, ya que dependían en gran medida de la audición humana para la detección de la señal.

Pronto, el fotófono fue relegado a un objeto de curiosidad científica más que de cualquier valor serio por casi medio siglo hasta que, gracias en gran medida al desarrollo del micrófono y al desarrollo de nuevas fuentes luminosas de mayor intensidad (como el láser) y al desarrollo de sensibles sistemas

de detección, amplificadores y procesamiento de datos, comenzaron a gestarse las primeras aplicaciones prácticas.

1.2 Efecto Fotoacústico

El efecto fotoacústico, es un fenómeno que consiste en la transformación de la energía luminosa en energía mecánica, en forma de sonido. El mecanismo de generación de ondas acústicas se da mediante un proceso termoelástico, que sucede de la siguiente manera [2]:

Se utiliza una fuente de luz pulsada o modulada con energía E_a (energía de absorción) para iluminar la muestra a analizar, ésta absorbe parte de la energía óptica emitida por la fuente de luz. Al transformarse esta energía en calor, la energía produce un aumento local de la temperatura ΔT , que puede describirse de la siguiente manera;

$$\Delta T = \frac{E_a}{C_p \rho V} \quad (1)$$

Donde C_p y ρ son el calor específico y la densidad de la muestra cuyo volumen V , es la zona de absorción óptica, respectivamente.

Si la fuente de excitación es un láser y si el pulso es suficientemente corto como para producir un aumento repentino de la temperatura, no hay tiempo suficiente para que ocurra la difusión térmica². En tal caso, el aumento de temperatura da como resultado una expansión térmica y genera un aumento de volumen de la presión local (ΔP) en la zona irradiada;

$$\Delta P = \rho v^2 \cdot \beta \Delta T$$

² *Difusión Térmica: Propagación de calor.*

$$= \left(\frac{\beta v^2}{c_p} \right) \cdot \left(\frac{E_a}{v} \right) = \Gamma H \mu_a \quad (2)$$

Donde tenemos que β es el coeficiente de expansión térmica y v es la velocidad del sonido en la región de absorción óptica, la expresión $\left(\frac{\beta v^2}{c_p} \right) = \Gamma$ es el parámetro de Grüneisen³, el cual depende de la transformación de la energía térmica producida en energía mecánica. $\left(\frac{E_a}{v} \right) = H \mu_a$ es la densidad de energía óptica absorbida que es igual al producto de la fluencia⁴ láser, H , y el coeficiente de absorción de la muestra μ_a .

Un aumento de presión fotoinducido se propaga fuera del volumen irradiado en forma de una onda acústica, que puede ser detectada por un transductor.

Las condiciones de tensión confinada se satisfacen cuando la tensión se limita al volumen de expansión elástica térmica y no tiene tiempo para relajarse durante la irradiación. El tiempo de relajación del estrés τ_a , está determinado por el tiempo que tarda el sonido en propagarse a través del espesor de la región irradiada.

$$\tau_a = \frac{\delta}{v} \quad (3)$$

donde δ es el grosor de la región irradiada, definida por $\delta = \left(\frac{1}{\mu_a} \right)$ en medios dominados por absorción y $\delta = \left(\frac{1}{\mu_{eff}} \right)$ en medios dominados por la dispersión. En este último, la condición de confinamiento de estrés se satisface cuando $\tau_a \gg \tau_L$ y $\tau_a \gg \tau_h$ (τ_L es la duración del pulso láser y τ_h es el tiempo de difusión de calor) o $\mu_{eff} v \tau_L \ll 1$. La ecuación (2) es válida en estas condiciones.

Con respecto a la ecuación (2), debe enfatizarse que la señal fotoacústica es proporcional a la absorción de la muestra irradiada. Esta es su propiedad más importante y está detrás del principio más utilizado de

³ **Parámetro de Grüneisen:** describe el efecto que tiene el cambiar el volumen de una red cristalina en sus propiedades de vibración, y, como consecuencia, el efecto que el cambio de temperatura tiene sobre el tamaño o la dinámica de la red cristalina.

⁴ **Fluencia:** También conocida como densidad de potencia, expresa la cantidad de trabajo realizado en una superficie determinada (joules/cm²).

detección fotoacústica en biomedicina [1][8]. Cabe señalar además que, si la duración del pulso láser no es lo suficiente corta para que se produzca la liberación de calor antes de que el pulso se detenga ($\mu_{\text{eff}} \nu \tau_L \approx 1$ o $\mu_{\text{eff}} \nu \tau_L \geq 1$), la relajación del estrés se vuelve significativa y la amplitud de la onda de presión inducida por láser disminuye desde el valor dado por la ecuación (2). También la forma de la onda de presión inducida por láser se amplía. En consecuencia, para inducir señales fotoacústicas, los investigadores generalmente utilizan pulsos láser en el rango de los nanosegundos.

1.3 Generación y detección de señales fotoacústicas en líquidos

Existen varias formas para generar las señales fotoacústicas, donde la más común es produciendo una expansión termoelástica⁵ del medio mediante excitación pulsada o modulada (véase *tabla 1*). En este trabajo de investigación se utilizó luz pulsada.

Tabla 1. Diferencias entre excitación pulsada y excitación modulada. [2]

Diferencias entre excitación pulsada y excitación modulada		
	Excitación modulada	Excitación pulsada
Naturaleza del efecto	<i>Predominantemente fototérmico, con flujo de ondas térmicas que dan origen a ondas acústicas en medios acoplados.</i>	<i>Expansión termoelástica que crea ondas acústicas, con efectos mínimos de flujo de calor.</i>
¿Cómo se da la excitación?	<i>Los pulsos de luz son grandes en el tiempo (del orden de ms) y para generarlos se usan moduladores mecánicos que generan ondas acústicas de baja frecuencia (desde 1hz hasta los 4000 Hz). Si además se cuenta con un monocromador dado que la luz blanca tiene un espectro amplio, se puede realizar un barrido de la longitud de onda obteniéndose así la espectroscopía fotoacústica.</i>	<i>Los pulsos de luz son cortos en el tiempo (desde μs hasta fs) y la distancia de propagación acústica durante el tiempo de excitación es mucho menor que las dimensiones de la muestra, así la onda acústica generada tendrá un espectro amplio y por lo tanto el monitoreo de la señal puede realizarse también en una amplia región del espectro.</i>

⁵ **Expansión termoelástica:** Deformación de origen térmico producido por cualquier estado estacionario d conducción de calor.

¿Cómo se detecta?	Se realiza una detección indirecta de los efectos en la muestra, usando una configuración de micrófonos convencionales.	Se realiza una detección directa de las ondas de presión utilizando detectores piezoeléctricos, optimizando así la otra relación entre la señal detectada y el ruido que se puede introducir en la medición.
Capacidad de penetración en la muestra	Depende de la longitud de onda de la onda térmica y por lo tanto de la frecuencia de corte, pero generalmente tiene una baja penetración del orden de 100 μm .	Depende de la longitud de onda de excitación óptica y del ancho de banda disponible del detector ultrasónico, suele estar en el rango de milímetros a centímetros.

Se sabe que la absorción de radiación ya sea de un medio: sólido, líquido o gaseoso puede dar lugar a procesos radiativos tales como fotoluminiscencia, fotoelectricidad, reacciones químicas entre otras, así como a procesos no radiativos entre los que encontramos la generación de ondas elásticas cuyo fenómeno proporciona información sobre la muestra analizada.

La generación de señales fotoacústicas se da en 4 fases (véase *Figura 4*):

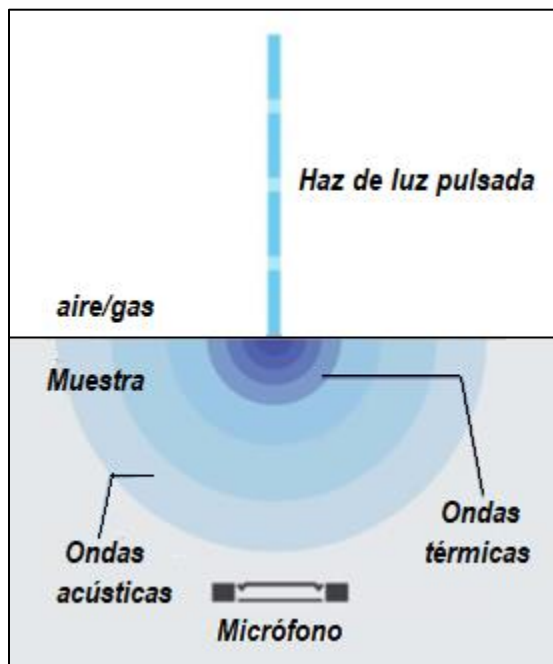


Figura 4. Proceso de generación de señales fotoacústicas.

1.- Se hace incidir un haz de luz pulsada o modulada sobre la muestra, éste lo absorberá dadas sus propiedades ópticas.

2.- La energía proveniente de este haz de luz es parcialmente transformada en calor, lo que provoca que la muestra se caliente. Al tratarse de un haz de luz pulsado la muestra se calienta y enfría en periodos de tiempo, estos cambios de temperatura dan origen a una expansión y compresión periódica de las moléculas que integran al fluido generando ondas térmicas.

3.- Las partículas del fluido vibran con fuerza en torno a sus posiciones de equilibrio lo que causa cambios locales de presión. Debido a las breves expansiones que se producen, al alternar entre expansión y contracción, se genera una onda con frecuencia en el intervalo de 1–100 MHz mejor conocidas como ondas de ultrasonido.

La detección de estas ondas acústicas se da de dos maneras [9][10];

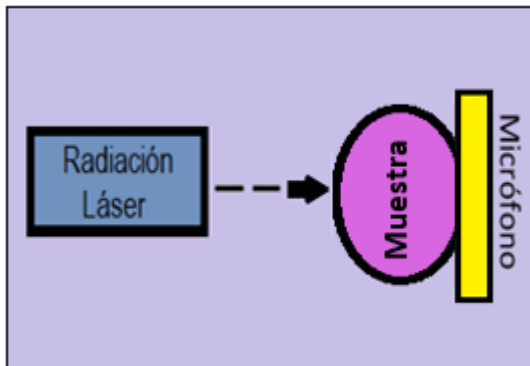


Figura 5. Generación directa de señales fotoacústicas.

Detección directa (Figura 5); El detector se pone en contacto directo con la muestra, sin que exista una interfaz adicional, asegurando que existe un buen acoplamiento entre ambos. Por lo general se emplean detectores piezoeléctricos cerámicos como los sensores piezoeléctricos de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o de membrana como los de fluoruro de polivinilo.

Detección indirecta (Figura 6); La muestra a estudiar se colocan frente o dentro de una celda la cual contiene un gas. Como resultado de la absorción de la luz modulada la muestra se calienta, el calor difundido por la muestra es absorbido por una capa de gas adyacente a la región iluminada, la capa de gas se calienta periódicamente generándose así ondas acústicas que se propagan a través de la celda hasta llegar al detector, el cuál es generalmente un micrófono convencional.

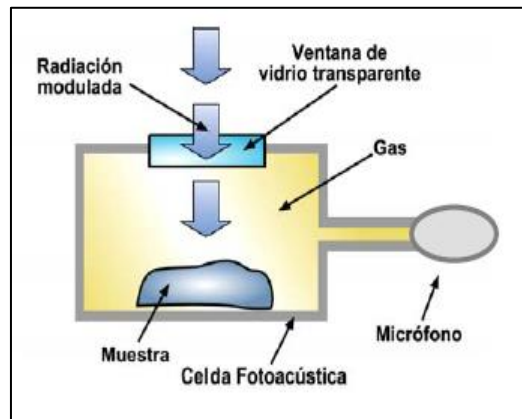


Figura 6. Generación indirecta de señales fotoacústicas.[3]

El uso del transductor (micrófono), nos ayuda a detectar la señal acústica, dando origen a la señal fotoacústica que podemos visualizar y que contiene información referente a la muestra.

1.4 Transductores y sensores

Un transductor es aquel dispositivo que se encarga de transformar una magnitud física (mecánica, térmica, magnética, eléctrica, óptica, etc.) en otra magnitud, normalmente en una señal eléctrica. Los transductores se pueden dividir en dos categorías;

- **Sensores:** son transductores que reciben o responden a estímulos de un sistema físico, a partir de la energía del medio se proporciona una señal de salida que es función de la magnitud que se pretende medir y la convierte en una señal eléctrica útil para un sistema de control, como podría ser un termopar.
- **Actuadores:** funcionan a la inversa de los sensores, reciben señales eléctricas de un sistema de control y los convierten en una salida mecánica como un altavoz.

Los sensores a su vez se pueden clasificar en dos grupos:

- **Activos:** son aquellos a los que hay que conectar a una fuente externa de energía eléctrica para que puedan responder al estímulo físico a medir como por ejemplo las fotoresistencias y termoresistencias.
- **Pasivos:** son los que directamente dan una señal eléctrica como respuesta a un estímulo físico como los fotodiodos.

Algunos de los sensores y transductores utilizados con más frecuencia son aquellos que miden fuerza, presión, temperaturas y velocidad. Este capítulo se centrará en los sensores de presión, más específicamente en sensores piezoeléctricos de PVDF.

1.5 Efecto Piezoeléctrico

El efecto piezoeléctrico fue descubierto por los hermanos Jacques y Pierre Curie en 1880, quienes encontraron que el cristal de cuarzo cambia sus dimensiones cuando se somete a un campo eléctrico, y, a la inversa, genera carga eléctrica cuando se deforma mecánicamente, es decir, se da lugar a la

polarización eléctrica del material al deformarse bajo la acción de una presión o deformación mecánica [11]. Es un efecto reversible de modo que, al aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre dos caras de un material piezoeléctrico, aparece una deformación.

Antes de la segunda guerra mundial, otros investigadores descubrieron que ciertos materiales cerámicos presentaban el fenómeno piezoeléctrico al ser sometidos a un alto voltaje de polarización, un proceso análogo a la magnetización de un material ferroso [12]. Esto dio inicio a una intensa búsqueda de materiales orgánicos que pudieran mostrar piezoelectricidad, hasta que en 1969 Kawai encontró una actividad piezoeléctrica muy alta en el fluoruro de polivinilideno (PVDF). Aunque otros materiales, como el nylon y el PVC exhiben el efecto, ninguno es tan altamente piezoeléctrico como el PVDF y sus copolímeros⁶. Dado que, como otros materiales ferromagnéticos, el PVDF es también piroeléctrico, es decir, produce carga eléctrica en respuesta a un cambio de temperatura y esto lo favorece para ser utilizado en diversas aplicaciones como cámaras de video con visión nocturna, cámaras de seguridad anti robo o alarmas de incendio. Otras aplicaciones de este polímero piezoeléctrico se encuentran en el área médica como películas para sensores de presión y sensores táctiles.

La conversión eficiente de energía térmica en eléctrica, utilizando materiales piroeléctricos es de gran importancia debido a sus aplicaciones potenciales en muchas áreas tales como; espectrometría, radiometría, pirometría, termometría, detección de dirección, medición de temperatura remota, conversión de energía solar, diagnóstico por láser, monitoreo infrarrojo de imágenes contaminadas [13].

⁶ *Copolímeros: Molécula compuesta de dos o más clases diferentes de pequeñas moléculas llamadas monómeros que se pueden unir de diferentes formas por medio de enlaces químicos.*

1.6 Sensor Piezoeléctrico de PVDF

Los sensores piezoeléctricos de PVDF son materiales cristalinos que al deformarse (por acción de una presión) generan una señal eléctrica. En este proyecto se utilizó un sensor de este tipo modelo LDT1-028K [14] (Figura 7), el cual, gracias a sus características puede ser empleado en una gran variedad de aplicaciones dado que, resulta ser bastante útil para detectar efectos que impliquen vibración, impacto o fuerza. La película piezoeléctrica está recubierta con un material conductor y una película de poliéster Mylar 2, es flexible, resistente al calor, con excelente aislamiento eléctrico, traslúcida y duradera, no contiene plastificantes, así al aplicar una fuerza sobre el área de detección se produce una señal de salida eléctrica.

Una de las ventajas del cable dual que está conectado al sensor es que permite una fácil conexión a un circuito o dispositivo de monitoreo para procesar la señal obtenida, también es posible conectarlo a otros dispositivos, tales como, Arduino, Raspberry Pi, Beagle Bone, Ti LaunchPad, ChipKit, STM4F32, STM Núcleo, microcontroladores PIC, microcontroladores ATMEL, etc.

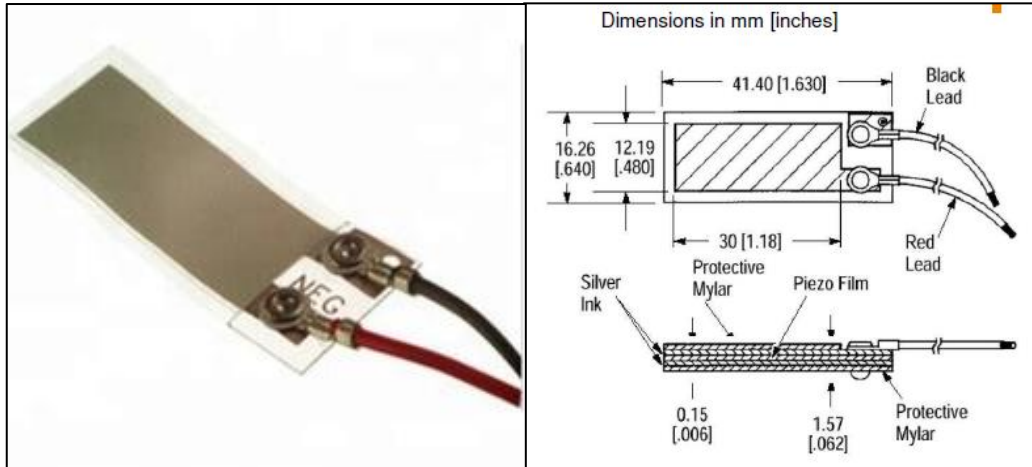


Figura 7. A la derecha se muestra el sensor piezoeléctrico de PVDF modelo LDT1-028K y a la derecha se ilustran sus especificaciones físicas [14].

Las características y aplicaciones de este sensor se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características y aplicaciones del sensor LDT1-028K. [13]

Sensor LDT1-028K	
<i>Características</i>	<i>Algunas aplicaciones</i>
<i>Amplio rango de frecuencias (de 0.001 Hz a 108 Hz)</i>	<i>Detector directo de una fuerza de contacto</i>
<i>Alta sensibilidad, estabilidad y resistencia dieléctrica</i>	<i>Contador de números de impacto</i>
<i>Señal de voltaje de salida:</i>	<i>Medición de esfuerzo de vigas, placas y estructuras rígidas</i>
<i>10mv a 100v, dependiendo de la fuerza aplicada y el acoplamiento de impedancia</i>	<i>Medición del tiempo de un evento de vibración</i>
<i>Temperatura de funcionamiento: 0° a +70°C</i>	<i>Detección de movimiento</i>

CAPÍTULO 2:

APLICACIONES DE LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA EN MEDICINA

La ciencia avanza a pasos agigantados y con ello se buscan nuevas tecnologías que permitan analizar el mundo microscópico desde las células, moléculas e incluso átomos hasta las galaxias más distantes. Un gran número de investigaciones y análisis para estudiar la materia a nivel macro y micro se basan en la utilización de sistemas espectroscópicos, sobre todo en el terreno de la medicina donde se busca la aplicación de técnicas no invasivas, no radiactivas y que puedan tener alta resolución. Una de estas técnicas empleada para el estudio de sistemas biológicos, es la fotoacústica, cuyo fundamento basado en la obtención de ultrasonido es deseable para realizar imágenes médicas mínimamente invasivas. La detección sensible de pulsos fotoacústicos de banda ancha es deseable en muchas aplicaciones que van desde la tomografía fotoacústica y la microscopía hasta la formación de imágenes por ultrasonido clínico.

Una de las ventajas de la fotoacústica es que se combinan los principios básicos de la óptica y la acústica, se puede obtener una alta resolución espacial ultrasónica consiguiendo una gran profundidad de penetración. Estas características permiten que la técnica sea lo suficientemente sensible para estudiar materiales en estado sólido, líquido o gas e inclusive materiales opacos, lo que en el ámbito de la medicina facilita la exploración de diversos mecanismos biológicos (*Figura 8*), además de ser una técnica no-invasiva y no-ionizante.

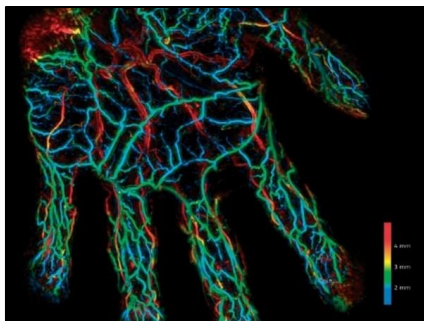


Figura 8. Imagen fotoacústica de los vasos sanguíneos de la palma de la mano. Los colores son una escala que muestra la profundidad de los vasos sanguíneos.

Ref. Matsumoto et al. (2018) Scientific Reports, CC BY 4.0

Aunque las aplicaciones biomédicas de la técnica fotoacústica son muchas, a continuación, se hace mención a dos de sus aplicaciones más fuertes:

Procesamiento de imágenes

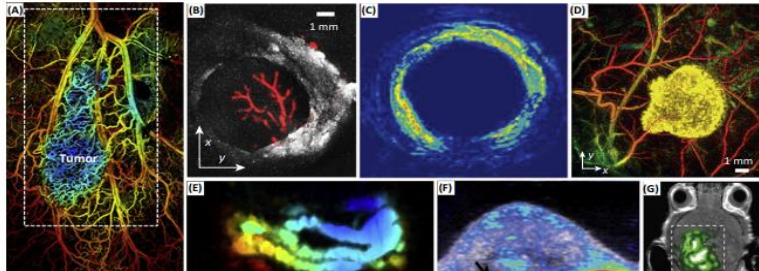


Figura 9. Imagen fotoacústica de:

A) Microvasculatura dentro de una región tumoral. La región azul indica disminución de SO_2 del tumor en estado temprano. B) Imagen fotoacústica 3D de los ganglios linfáticos a 530nm y 1210nm que muestran hemoglobina y contraste lipídico, respectivamente. C) Tomografía computarizada fotoacústica intravascular (PACT) de placas ricas en lípidos. D) PAI in vivo de xenoinjertos marcados con tirosinasa contra la vasculatura circundante. E) Proyección de intensidad máxima PAI (MIP) de un intestino marcado con nanonaps ZnBNc. F) Imagen de PA y ecografía (EE. UU.) Superpuesta de tumor dirigido a nano escalas de paladio. G) tumor cerebral de un ratón después de la inyección con nanopartículas de resonancia magnética trimodal/ PA/Raman (MPR) [39].

En el campo de la medicina las técnicas por imágenes son herramientas de diagnóstico e investigación fundamentales, sobre todo cuando se trata de casos clínicos donde lo que se busca es causar un mínimo de molestias al paciente y evitar posibles daños colaterales.

Muchas de las tecnologías actuales de imagen exponen a los pacientes a procedimientos dolorosos y a radiaciones ionizantes que pueden ser perjudiciales para la salud, como es el caso de los rayos X o la tomografía axial computarizada, además muchas de éstas tecnologías tienen algún tipo de limitante técnica, por ejemplo: la imagen por ultrasonido que tiene un contraste pobre, y las técnicas ópticas puras de la proyección de imagen que no pueden visualizar con eficacia las estructuras a varios centímetros de profundidad en el tejido, debido a la fuerte dispersión del mismo, entre otras características [1].

Debido a estas problemáticas, se desarrolla la técnica de imagenología fotoacústica, haciendo uso de los principios básicos de la fotoacústica y de las propiedades ópticas de los tejidos [8] se ofrece una

mayor definición en la imagen, con la habilidad de detectar hemoglobina, lípidos, agua y otros cromóforos que absorben luz (véase *Figura 9*), pero con una mayor trayectoria de penetración que la imagen obtenida ópticamente.

Las potenciales aplicaciones de esta técnica incluyen la evaluación del cerebro, enfermedades vasculares, anormalidades de la piel, así como quemaduras, detección temprana de cáncer prostático y de mama, de una manera no-invasiva y no-ionizante [15].

Distribución de una determinada droga en la piel

En algunos casos, es de gran interés conocer la distribución de algún fármaco, por ejemplo, de un analgésico[1][16]. La técnica fotoacústica en estos casos resulta ser muy útil, pues con ella se puede conocer la eficiencia del fármaco aplicado, mostrando qué tan profundo ha llegado en las capas más internas de la piel en estudios in vivo, esto es posible debido a que los cambios en la concentración de la difusión de la droga alteran la distribución de las fuentes de calor, y en combinación con la absorción de la luz modulada conducen a cambios en la señal fotoacústica detectada, la cual es directamente proporcional a la concentración del medicamento o droga aplicada. Los resultados observados de estos estudios indican también que el tipo de piel influye en la distribución del fármaco.

Como puede verse la fotoacústica tiene gran importancia en el ámbito médico, actualmente en México se cuenta con varios centros de investigación donde se llevan a cabo estudios de aplicación de esta tecnología fototérmica en diferentes campos de la Ciencia: ICAT-UNAM, la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Hospital General Eduardo Liceaga de la Ciudad de México, el CINVESTAV-Querétaro, CINVESTAV-Zacatenco, CICATA-Legaria y UPIBI, Universidad de Guanajuato, por mencionar algunos.

CAPÍTULO 3

LA SANGRE Y SUS COMPONENTES

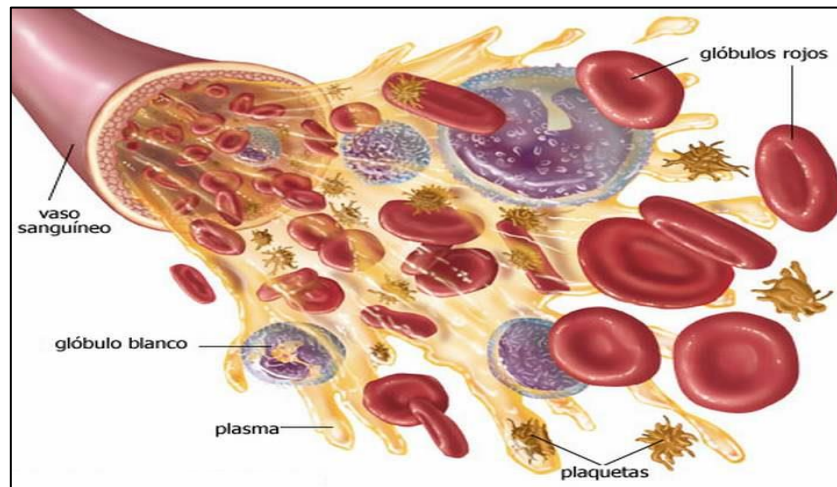


Figura 10. Imagen que muestra los componentes de la sangre
Ref.: <https://culturacientifica.com/2017/11/28/proteinas-plasmaticas/>.

La sangre es un fluido que circula por nuestro cuerpo a través del corazón, pulmones, arterias, venas y capilares [12][17]. Le corresponde el $10\pm 2\%$ del peso corporal, está compuesta principalmente por una solución acuosa conocida como plasma (le corresponde entre el 55% y el 65% de la sangre total); la cual contiene agua ($90\pm 2\%$), nutrientes, proteínas de coagulación, anticuerpos, hormonas, sales y desechos y el 45% restante contiene una serie de células especializadas esenciales para la supervivencia (Figura 10), las cuáles se describen a continuación:

- **Hematíes o Eritrocitos:** Es una célula cuyo contenido es un líquido conocido como hemoglobina (Hb). La hemoglobina es una proteína que ocupa el 33% del hematíe, es la sustancia que da vida a cada glóbulo rojo y es el componente encargado del transporte de oxígeno desde los alveolos⁷ pulmonares hacia los tejidos. Los eritrocitos tienen forma de disco bicóncavo y su tamaño es de

⁷**Alveolos:** lugar donde los pulmones y el torrente sanguíneo intercambian dióxido de carbono y oxígeno.

aproximadamente 7 a 8 μm de diámetro. La vida media de estas células es de aproximadamente 120 días.

- **Plaquetas:** son células que no tienen núcleo y poseen una forma irregular, la mayor reserva está en el bazo (aproximadamente el 33% del total). Juegan un papel fundamental en la hemostasia, así su función principal es participar en el proceso de detención de una hemorragia y coagulación de la sangre, su tamaño es de aproximadamente 2 a 3 μm de diámetro. La vida media de estas células va de 8 a 13 días.
- **Leucocitos:** son glóbulos blancos que llevan a cabo funciones de defensa del huésped. Existen 5 tipos de leucocitos divididos en granulocitos y agranulocitos, éstos son; neutrófilos que miden aproximadamente de 10 a 12 μm de diámetro, eosinófilos que miden aproximadamente 10-15 μm de diámetro y basófilos que miden aproximadamente 10 a 12 μm de diámetro, tras unas 8 o 10 horas en el torrente circulatorio migran a los tejidos donde sobreviven durante 1 o 2 días; también tenemos a los monocitos que miden aproximadamente 12 a 20 μm de diámetro y los linfocitos que miden aproximadamente 8 a 12 μm de diámetro, estas últimas células viven durante varios años.

La médula ósea es la encargada de la producción de éstas células, aquí es dónde se desarrollan, van madurando y distribuyéndose hacia las diferentes líneas celulares. En la *Figura 11* se presentan las células que componen la sangre en porcentaje y cantidad.

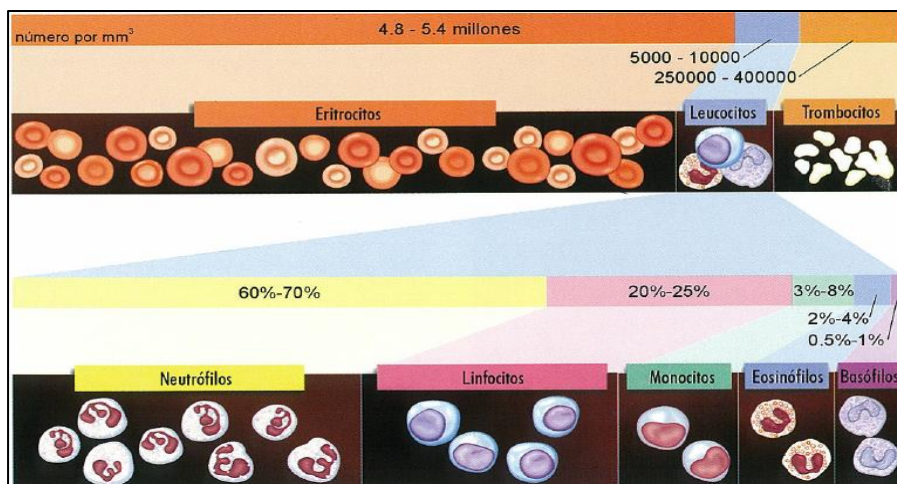


Figura 11. Diferentes células de la sangre.
Ref: Atlas de Hematología

La producción diaria de hematíes y plaquetas se aproxima a los 2.500 millones por kilo de peso, y la de leucocitos, a 1.000 millones/kg.

3.1 Biometría Hemática y Serología

En el banco de sangre el proceso de selección del donante es de vital importancia, se debe evaluar completamente la salud del donador de tal manera que se pueda asegurar, en la medida de lo posible, que la donación no tendrá efectos negativos en el donante y que no representará ningún riesgo para el receptor.

Para alcanzar este objetivo se cuenta con criterios de selección bien establecidos, desde la valoración clínica realizada por el médico hasta estudios de laboratorio como son: la biometría hemática, la serología y la química sanguínea. En este proyecto de investigación se contó con la valoración clínica, la biometría hemática y la serología de las muestras estudiadas.

Biometría Hemática

La biometría hemática o hemograma es una de las pruebas de laboratorio de más utilidad y frecuentemente solicitada para el estudio de la sangre, ya que aporta información al diagnóstico y seguimiento de diversas patologías que el paciente pudiera presentar, por ejemplo: presencia de infecciones agudas y crónicas, anemias, leucemias, síndrome febril, entre otras alteraciones del sistema.

Esta incluye contajes totales de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas; contajes porcentuales de los diferentes grupos de células de la serie blanca, valores de hemoglobina y hematocrito (véase *Figura 12*). Con la ayuda de fórmulas matemáticas se obtienen valores calculados de hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y volumen corpuscular medio (VCM).

Intervalo			Intervalo			Sospechas y mensajes
LEU	4.9	4.0 / 11.0	NE	46.4B	50.0 / 80.0	
ERIT	5.18	4.00 / 6.20	LI	43.8	25.0 / 50.0	
HGB	14.9	11.0 / 18.8	MO	8.4	2.0 / 10.0	
HCT	44.5	35.0 / 55.0	EO	1.0	0.0 / 5.0	
VCM	86	80 / 100	BA	0.4	0.0 / 2.0	
HCM	28.7	26.0 / 34.0	NE#	2.27	2.00 / 8.00	
CHCM	33.5	31.0 / 35.0	LI#	2.14	1.00 / 5.00	
ADE	12.8	10.0 / 20.0	MO#	0.41	0.10 / 1.00	
PLQ	321	150 / 400	EO#	0.05	0.00 / 0.40	
VPM	8.1	6.0 / 10.0	BA#	0.02	0.00 / 0.20	

Figura 12. Imagen obtenida de una biometría original proporcionada por el banco de sangre del Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga, en ella se observan los valores de los parámetros directos e indirectos, así como el recuento diferencial de glóbulos blancos.

En la actualidad existen dos parámetros que se analizan en la biometría hemática, los cuales se describen a continuación;

1.- Parámetros directos: los equipos automatizados miden directamente y reportan hemoglobina, recuento de leucocitos, glóbulos rojos y plaquetas (Tabla 3).

Tabla 3. Valores normales de parámetros directos de hombres y mujeres medidos para una población sana [18][19][20]

Parámetros directos		
Prueba	¿qué se mide?	Valores de referencia
Hemoglobina(HGB)	Cantidad de proteína que transporta el oxígeno en un volumen determinado de sangre. Se reporta en g/dl.	Hombres: 14 a 17 g/dl Mujeres: 12 a 16 g/dl
Recuento de glóbulos blancos [leucocitos(LEU)]	Número de glóbulos blancos en un volumen específico de sangre. Se reporta en unidad de volumen ($10^3/\mu\text{l}$).	Para hombres y mujeres: 4500 a 11 000 por microlitro
Recuento de glóbulos rojos [Hematías o eritrocitos(ERIT)]	Número de glóbulos rojos en un volumen específico de sangre. Se reporta en unidad de volumen ($10^6/\mu\text{l}$).	Hombres: 4,5 a 5,9 millones de células por microlitro Mujeres: 4,0 a 5,2 millones de células por microlitro

Hemoglobina corpuscular media (HCM)	Cantidad de hemoglobina en cada eritrocito. Se reporta en picogramos (10^{-12} gr)	28 a 32 picogramos por célula
Volúmen corpuscular de plaquetas (VPM)	Se mide el tamaño de las plaquetas en una muestra de sangre para determinar la media. Se reporta en fl.	5 a 15 femtolitros por célula
Amplitud de distribución de los eritrocitos (ADE)	Es una medida de la variación en el volúmen y el tamaño de los eritrocitos.	Tamaño: 6-8 micrometros de diámetro VCM: 80 a 100 femtolitros por célula En porcentaje llega a variar: 11,5% a 14,5 %

2.- Parámetros indirectos o calculados: Estos parámetros se calculan a partir de los parámetros directos, mediante análisis por los contadores hematológicos (Tabla 4).

Tabla 4. Se presentan los valores normales de parámetros indirectos de hombres y mujeres, medidos para una población sana [18][19][20].

Parámetros indirectos		
Prueba	¿qué se mide?	Valores de referencia
Hematocrito(HCT)	Porción de la cantidad total de la sangre (volúmen sanguíneo) compuesto de eritrocitos; la cantidad restante esta formada por plasma. Se reporta en porcentaje total.	Hombres: 41% a 51% Mujeres: 36% a 47%
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	Concentración promedio de hemoglobina dentro de los eritrocitos. Se reporta en porcentaje total.	32 a 36 gramos por decilitro de eritrocitos
Volúmen corpuscular medio (VCM)	Volúmen promedio de un eritrocito, es uno de los parámetros más estables, con poca variabilidad menos del 1% en el tiempo. Se reporta en fl.	80 a 100 femtolitros por célula
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	Cantidad de hemoglobina en cada eritrocito. Se reporta en picogramos (10^{-12} gr)	28 a 32 picogramos por célula

<p>Recuento de glóbulos rojos [Hematíes o eritrocitos(ERIT)]</p>	<p>Número de glóbulos rojos en un volumen específico de sangre. Se reporta en unidad de volumen ($10^6/\mu\text{l}$).</p>	<p>Hombres: 4,5 a 5,9 millones de células por microlitro</p> <p>Mujeres: 4,0 a 5,2 millones de células por microlitro</p>
<p>Recuento de plaquetas o trombocitos(PLQ)</p>	<p>Número de plaquetas en un volumen específico de sangre. Se reporta en unidad de volumen ($10^3/\mu\text{l}$).</p>	<p>Para hombres y mujeres: 140 000 a 450 000 por microlitro</p>

Serología

Las pruebas serológicas se realizan en todas las muestras de donantes ya que con ello se garantiza que no existan enfermedades que se puedan transmitir al paciente que recibe la donación. Un estudio serológico [21] puede emplearse fundamentalmente para diagnosticar la presencia de anticuerpos, siendo una forma fiable de conocer la reacción del organismo ante una infección o algún patógeno. Este estudio puede realizarse usando una muestra de la sangre total o tomando solo el suero el cuál se obtiene cuando la sangre se coagula y tiene una composición diferente al plasma.

Cuando en el examen serológico se encuentran valores anormales, significa que se ha detectado la presencia de anticuerpos en la sangre, si se sufre de alguna enfermedad mayor cantidad de anticuerpos habrá si el padecimiento es más severo. Con la detección de estos anticuerpos se puede saber si se trata de una infección activa, una infección que se tuvo en el pasado o si el paciente tiene latente el virus o microorganismo y puede desarrollar la enfermedad más adelante.

Entre las enfermedades que pueden detectarse a través de un análisis serológico son: la hepatitis, el sida, Chagas, sífilis, brucelosis, etc., pues son algunas de las enfermedades que pueden generar anticuerpos.

A continuación, en *la Figura 13* se muestra la imagen de un examen serológico, realizado en el banco de sangre del Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga;

	RESULTADOS ANALÍTICOS
Nivel de Hemoglobina	16.46
Hematocrito	47.23
Grupo	B
Rh	NEGATIVO
Du	NEGATIVO
Hepatitis B	NEGATIVO
Hepatitis C	NEGATIVO
HIV 1-2	NEGATIVO
Chagas	NEGATIVO
SIFILIS	NEGATIVO
BRUCELLA 1a Muestra	NEGATIVO

Figura 13. Se muestran los resultados de un examen serológico realizado en el banco de sangre del Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga, podemos observar los resultados del nivel de hemoglobina y hematocrito en la sangre del sujeto, así como su grupo sanguíneo, por otra parte, también observamos los resultados encontrados para distintas enfermedades evaluadas, como vemos el sujeto está completamente sano por tanto es candidato para donación.

CAPÍTULO 4

ENFERMEDADES PATOLÓGICAS EN LA SANGRE

Como se mencionó en el capítulo anterior, la sangre es un tejido vivo formado por líquidos y sólidos, cuando se le irradia con una longitud de onda determinada el principal componente absorbedor (cromóforo) es la hemoglobina, esta molécula absorbidora es quien genera la señal fotoacústica producto de la interacción de la luz y las partículas en la muestra. La forma de esta señal, estará determinada no solo por esta interacción, sino también por la densidad y morfología de las partículas presentes.

En este trabajo de investigación, se analizaron muestras de sangre de sujetos sanos, así como muestras de sangre de personas diagnosticadas con alguna patología, las cuáles fueron:

- *Anemia*: posee una característica importante que es la disminución del número de eritrocitos y por ende de hemoglobina.
- *Leucemia*: se caracteriza por un aumento excesivo en el número de leucocitos en la sangre. Probablemente la contribución de los leucocitos marque una influencia importante en la señal fotoacústica observada.

Como se ve estas patologías resultan interesantes a raíz de sus características particulares y brindan más margen de análisis y posibilidades de comparación entre ellas, como podrá verse más adelante en el capítulo 6.

4.1 Anemia

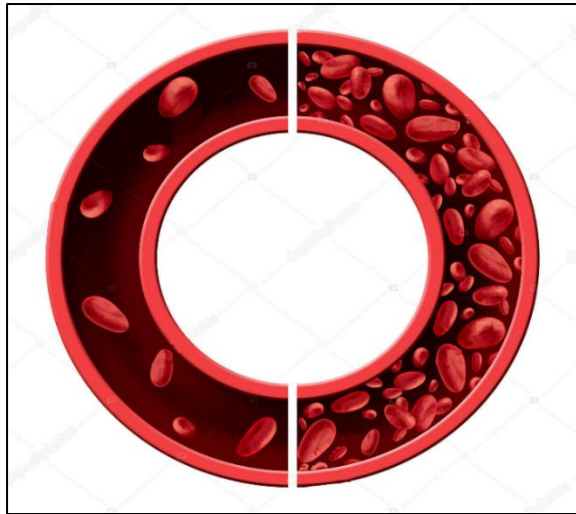


Figura 14. Diagrama en 3D de eritrocitos en una arteria o vena de sujetos sanos (lado derecho) y sujetos con anemia (lado izquierdo).

Ref.: <https://sp.depositphotos.com/142866123/stockphoto-anemia-anaemia-concept-diagram.html>

La anemia, es un trastorno de la sangre que puede manifestarse a partir de un conjunto de signos y síntomas, como podrían ser [22][23]:

- Fatiga y debilidad
- Piel pálida o amarillenta
- Latidos del corazón irregulares
- Dificultad para respirar
- Mareos o aturdimiento
- Dolor en el pecho
- Dolores de cabeza

Los síntomas empeoran a medida que se agrava la condición anémica.

La anemia es una afección en la cual el cuerpo presenta una disminución del número de eritrocitos circulantes en el organismo (véase Figura 14), lo que provoca una disminución del contenido de hemoglobina (Hb) por debajo de los límites considerados normales. Se debe tomar en cuenta que los niveles de hemoglobina varían en relación con la edad, el sexo y otras circunstancias. En la práctica se habla de anemia cuando la cantidad de Hb es:

Hb < 13 g/dl para hombres adultos

Hb < 12 g/dl para mujeres adultas

Es importante mencionar que se produce por varias causas, aunque se debe comúnmente a deficiencias de hierro, de ácido fólico y de vitamina B12 y proteínas (esto último se presenta con menor frecuencia), los defectos congénitos en la producción de hemoglobina, enfermedades parasitarias, también son causa directa e importante de anemia; además, las infecciones bacterianas pueden agravar una anemia persistente.

Cabe destacar que existen dos tipos de clasificación de las anemias: fisiopatológica y morfológica, cuyas diferencias se explicarán a continuación.

Clasificación Fisiopatológica

En este tipo de clasificación se realiza un recuento de reticulocitos⁸ lo que refleja la actividad de la médula ósea y proporciona una guía para el estudio y clasificación de las anemias, en función del índice de reticulocitos. Las anemias se clasifican en Arregenerativas (centrales) y Regenerativas (periféricas)[24].

Clasificaciones Morfológicas

Las alteraciones morfológicas de los eritrocitos pueden estar relacionadas con variaciones en el tamaño, la forma y la coloración, dichas variaciones se analizarán ampliamente en la *Tabla 5, 6 y 7*.

Tabla 5. Alteraciones en tamaño de los eritrocitos [25].

Alteraciones en el tamaño de los eritrocitos	
Anisocitosis	<i>En una misma muestra sangre hay coexistencia de hematies de distintos tamaños o diámetros.</i>
Microcitosis	<i>Los hematies serán más pequeños de lo normal con un diámetro inferior a 6.5 μm.</i>
Normocitosis	<i>Los hematies serán de tamaño normal, con un diámetro normal de 6.5 a 9.0 μm.</i>
Macrocitosis	<i>Los hematies serán más grandes de lo normal con un diámetro superior a 9.0 μm.</i>

⁸ **Reticulocitos:** se producen en la médula ósea y son glóbulos rojos que todavía se están desarrollando, es decir, se consideran glóbulos rojos inmaduros. Un conteo demasiado alto o bajo puede indicar un problema de salud grave como anemia o trastornos de la médula ósea, el hígado y los riñones.

Tabla 6. Alteraciones en forma de los eritrocitos [25]

Alteraciones en la forma de los eritrocitos			
Esferocitos	<i>Son hematíes pequeños de forma esférica, que han perdido su palidez central.</i>	Esquistocitos	<i>Son hematíes fragmentados, que pueden presentar formas muy variadas, son de tamaño muy pequeño (2-3) mm.</i>
Eliposito	<i>Son hematíes alargados de extremos casi simétricos y contorno regular.</i>		
Dianocitos	<i>Son hematíes con un exceso de superficie, se presenta mayor contenido de hemoglobina en el área central.</i>	Esquinocitos	<i>Son hematíes esféricas que poseen espículas cortas distribuidas regularmente por toda su superficie.</i>
Drepanocitos	<i>Son hematíes que presentan una forma semilunar, ya que son alargados y estrechos.</i>	Acantocitos	<i>Son hematíes de aspecto redondeado que tienen varias espículas alargadas y están distribuidas irregularmente en su superficie.</i>
Estomatocitos	<i>Son Hematíes con exceso de agua, por ello presenta una región en forma de boca en la zona central del hematíe.</i>	Excentrocitos	<i>En los hematíes la zona central está "vacía" de hemoglobina ya que esta se distribuye en los extremos. Tienen un aspecto como de silla de montar.</i>
Ovalocitos	<i>Son hematíes de forma ovalada.</i>	Dacriocitos	<i>Son hematíes con forma de lágrima</i>

Tabla 7. Alteraciones en color de los eritrocitos [25]

Alteraciones en el color de los eritrocitos	
Anisocromía	<i>En una muestra de sangre existe una desigualdad de coloración de los glóbulos rojos.</i>
Hipocromía	<i>Los eritrocitos tienen un menor contenido de hemoglobina, por lo que la zona pálida central es de mayor diámetro.</i>
Hipercromía	<i>Se manifiesta por un elevado contenido de hemoglobina en los eritrocitos, tal como se observa en los esferocitos.</i>
Policromasia	<i>Los eritrocitos jóvenes, que han abandonado recientemente la médula ósea, se tiñen de un color azul pálido debido a su elevado contenido en ribosomas.</i>

4.2 Anemia Hemolítica

En una persona sana los eritrocitos son eliminados de la circulación de manera natural al final de su vida media (aproximadamente 120 días), sin embargo, en un paciente con anemia hemolítica hay un proceso de destrucción anormal elevada y prematura de los eritrocitos, que conlleva a la liberación de hemoglobina en el plasma alterando su composición. Si esta destrucción aumentada no es adecuadamente compensada por la médula ósea con un incremento en la producción de hematíes, se produce una anemia hemolítica (véase Figura 15). [27]

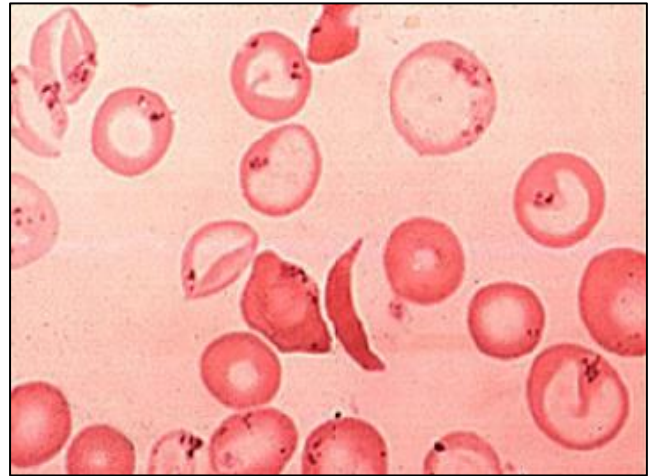


Figura 15. Fotografía que muestra cómo se ven las células con anemia hemolítica [26]

La hemólisis de los eritrocitos puede suceder por varias causas [23], entre ellas:

- Problemas autoinmunitarios en los cuales el sistema inmunológico equivocadamente ve a sus propios glóbulos rojos como sustancias extrañas y los destruye.
- Anomalías genéticas dentro de los glóbulos
- Exposición a ciertos químicos, fármacos y toxinas.
- Infecciones.
- Coágulos de sangre en pequeños vasos sanguíneos.
- Transfusión de sangre de un donante con un tipo de sangre que no es compatible con el suyo.

Las manifestaciones clínicas y analíticas dependen del lugar donde ocurre la hemólisis y de la cuantía y velocidad de la destrucción (véase Tabla 8).

Tabla 8. Se muestran las clasificaciones de la anemia hemolítica con sus características [28].

Clasificación de las anemias hemolíticas	
anemias congénitas	Son enfermedades hereditarias debidas a alteraciones en uno de los 3 componentes básicos del eritrocito; la membrana, el metabolismo y la molécula de hemoglobina.
anemias adquiridas	El causante de la hemólisis es fuera del eritrocito, puede ser a través de un mecanismo inmune, de una alteración ambiental o de una enfermedad en los vasos sanguíneos

4.3 Fragilidad osmótica de los eritrocitos

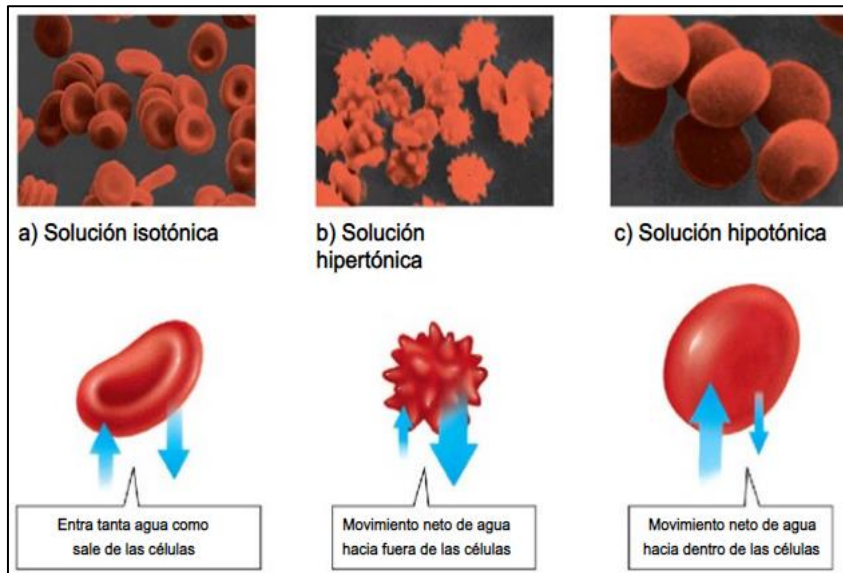


Figura 16. a) Al sumergir a los eritrocitos en una solución isotónica de sal, no habrá movimiento neto de agua a través de la membrana plasmática conservando así su forma característica de disco bicóncavo.

b) Al sumergir a los eritrocitos en una solución hipertónica (con mayor cantidad de sal que la que hay en las células), se ocasiona que salga agua de ellos provocando que se encojan y arruguen.

c) Al sumergir a los eritrocitos en una solución hipotónica (con menos sal que la que hay en las células), se ocasiona que, entre agua a éstos provocado que se hinchen, corriendo el riesgo de reventar.

Ref.: <https://slideplayer.es/slide/5472842/>

La fragilidad o grado de resistencia de los eritrocitos a una disminución del contenido de sal de su medio ambiente ha sido utilizado clínicamente como característica diagnóstica pues hace referencia a la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis (Figura 16). [29]

La membrana eritrocitaria forma una capa protectora entre la hemoglobina y otros componentes celulares y el medio extracelular. Facilita el transporte de agua, aniones, cationes y otras pequeñas moléculas, y su constitución dota al eritrocito de las características de estabilidad, resistencia, flexibilidad, deformidad y adaptabilidad a las distintas circunstancias circulatorias [28].

La membrana está formada por una bicapa lipídica plana donde se encuentran parcial o totalmente las proteínas integrales, también consta de proteínas estructurales que constituyen el citoesqueleto de la membrana que recubren la superficie interna de la misma.

En sujetos sanos, cuando el eritrocito alcanza su límite de elasticidad (se llega al volumen crítico), la hemoglobina de esa célula se difunde en equilibrio dentro y fuera de la misma, generalmente sin ruptura del citoplasma, sin embargo, los defectos en la composición proteínica de la membrana, producen una disminución en el cociente superficie/volumen del eritrocito lo que acarrea en ocasiones la pérdida de la forma bicóncava del mismo, la reducción de la deformabilidad para el paso por áreas de la microcirculación reducidas, en particular en el bazo. Así mismo, se producen cambios en la viscosidad citoplásmica como consecuencia de la entrada de agua y aumento del volumen, todo esto condiciona una reducción de la vida del eritrocito, pues la célula se revienta más rápido que un eritrocito normal.

Las anemias hemolíticas producidas por alteraciones en la membrana eritrocitaria constituyen un grupo de enfermedades congénitas, que tienen en común una alteración en la morfología del eritrocito y una fragilidad osmótica aumentada.

La fragilidad osmótica de los glóbulos rojos puede ser evaluada por medio de diferentes métodos, el método tradicional es la prueba de fragilidad (OFT), se requiere de la preparación de una serie de soluciones hipotónicas con un contenido de NaCl que va del 0.1 % al 0.9 %, a las que se añade una pequeña cantidad de sangre fresca. Después de la centrifugación y la lectura de absorbancia a 540 nm, el porcentaje de hemólisis se calcula para cada solución y se compara con las concentraciones de

NaCl. El resultado de la curva de fragilidad osmótica se compara entonces con la obtenida con los controles normales.[30]

Hay que recordar que cualquier muestra de glóbulos rojos posee células individuales que difieren unas de otras en volumen, es por ello que la resistencia osmótica de dichos glóbulos rojos sigue una distribución de probabilidad normal. Esta es una suposición razonable para una muestra proveniente de un sujeto sano.

4.3 Leucemia

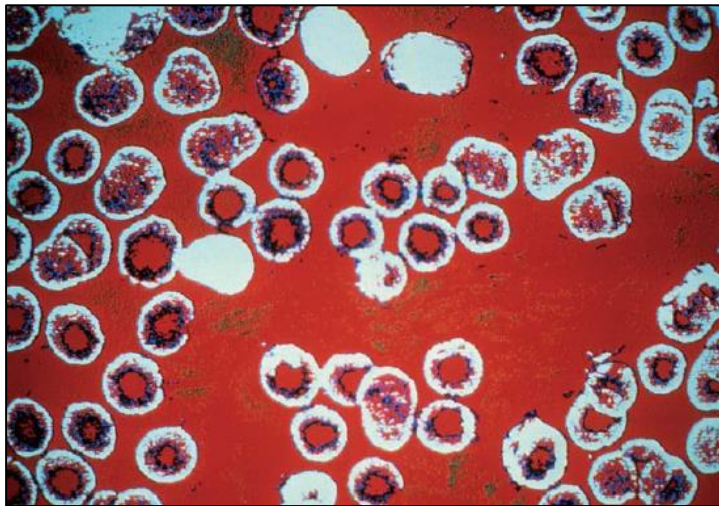


Figura 17. Fotografía que muestra cómo se ven las células leucémicas.[29]

La leucemia, es un tipo de cáncer que se produce en la médula ósea y el sistema linfático, se caracteriza por el aumento permanente y anormal del número de leucocitos (glóbulos blancos) en la sangre (*Figura 17*) [31][32]. El leucocito sufre un cambio genético que hará que se produzca sin control una colonia anormal de sí mismo, estas nuevas células van ocupando paulatinamente el espacio de la médula

ósea e impiden a su vez el desarrollo normal del resto de las células de la sangre, como son los glóbulos rojos y plaquetas.

Esta situación provoca que el cuerpo de la persona que padece esta enfermedad quede expuesto a un gran número de enfermedades sin posibilidad de que el organismo pueda luchar contra ellas por la carencia de defensas.

Algunas consecuencias más severas se dan cuando las células anormales invaden otros tejidos, puesto que producirán fallas en el funcionamiento del órgano que ocupen, por ejemplo, la infiltración al sistema nervioso central que ocurre en la leucemia aguda linfoblástica (LAL). Esto se podría manifestar con cefalea, crisis convulsivas, alteraciones motoras focalizadas, aumento de la presión intracraneana, y de no hacer el diagnóstico temprano y proporcionar el tratamiento adecuado, presentará consecuencias irreversibles.

Las leucemias originalmente se denominaban agudas o crónicas basándose en la expectativa de vida, pero ahora se clasifican según el fenotipo celular⁹ y el grado de diferenciación celular¹⁰ con respecto a los glóbulos blancos sanos (Figura 18).

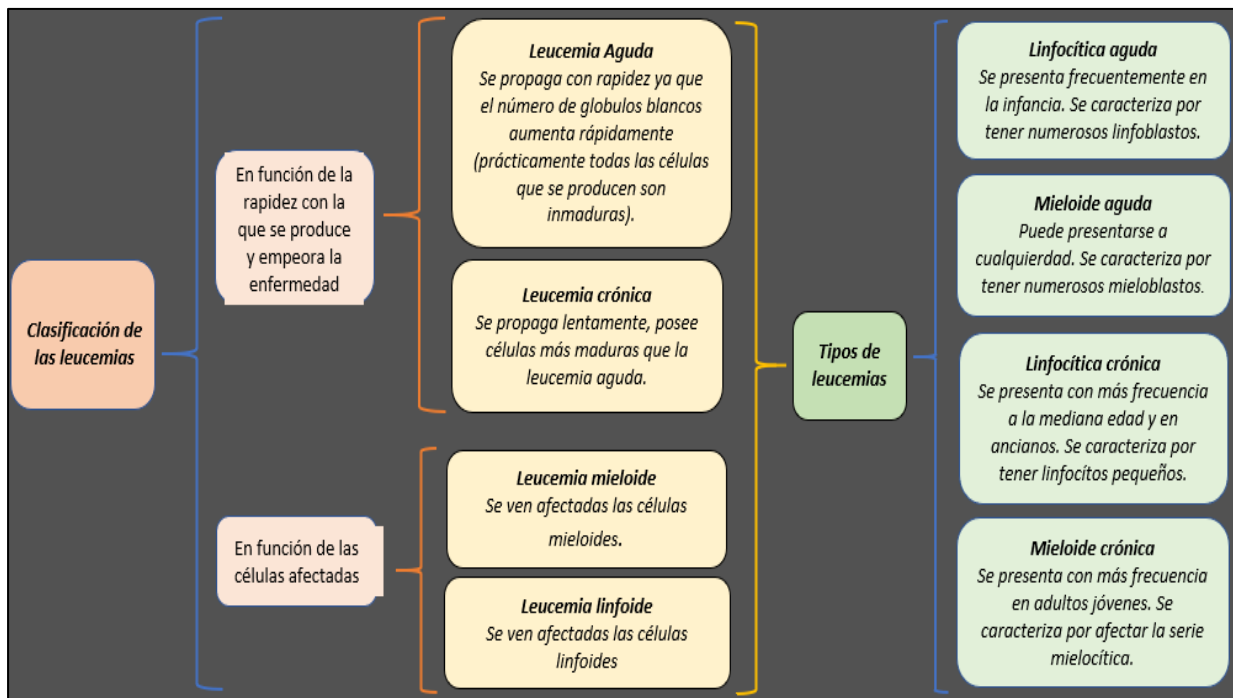


Figura 18. imagen que muestra la clasificación y los tipos de leucemias que existen. [33]

⁹ **Fenotipo celular:** se refiere a la forma que adopta la célula y la función que posee dentro del organismo (en este caso los glóbulos blancos).

¹⁰ **Grado de diferenciación celular;** Nos dice que tan diferente es una población de células (en este caso de glóbulos blancos) que ha sufrido modificaciones en su expresión genética con respecto a las células de la misma población que no han sufrido cambios.

CAPÍTULO 5: METODOLOGÍA

5.1 Reglas de seguridad para el uso de sustancias biológicas




TIPOS DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO / COLOR
Punzocortantes: Agujas de jeringas desechables, navajas, lancetas, agujas de sutura, bisturís y estiletes de cateter. EXCEPTO MATERIAL DE VIDRIO ROTO DE LABORATORIO.	sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno / Rojo 
No anatómico: Materiales de curación empapados en sangre o líquidos corporales.	sólidos	Bolsas de plástico / ROJO 
Materiales desechables: Materiales que contengan secreciones pulmonares de pacientes sospechosos de tuberculosis o sospecha / diagnóstico de fiebres hemorrágicas o enfermedades emergentes.	sólidos	Bolsas de plástico / ROJO 

Figura 19. Se muestra cómo se clasifican los tipos de residuo y recipientes adecuados que deben utilizarse para desecharse.

Ref: <http://modulo1laboratoristaclinico.blogspot.com/2016/10/>

Previo a presentar la metodología utilizada en el presente trabajo, en esta sección se hablará de las reglas de seguridad básicas para el manejo de sustancias biológicas, en particular sobre el manejo de la sangre.

Es importante recordar que al trabajar con sangre, tejido o fluidos biológicos se debe tener mucha precaución, debido a que en una muestra pueden encontrarse suficientes agentes patógenos como para transmitir alguna infección, por ejemplo; el virus de la hepatitis B (HBV) o el virus de la inmunodeficiencia

humana (VIH), por mencionar algunas. La vía de acceso más común para estos patógenos son las heridas en la piel que muchas veces pueden no ser evidentes.

En el pasado se rotulaban las muestras de los pacientes que se sabía que padecían enfermedades infecciosas, pero con el tiempo y la experiencia se logró demostrar que incluso los pacientes “sanos” pueden padecer enfermedades infecciosas y no mostrar síntomas visibles.

Las siguientes normas de seguridad, son aplicables en cualquier laboratorio, sin embargo, se hace énfasis en que deben ser implementadas sobre todo con el manejo de sustancias infecciosas [34]:

1.- *Lavarse las manos*; Debe utilizarse jabón y agua. En caso de no disponer con facilidad de agua, se sugiere utilizar limpiadores de manos antisépticos con toallas de papel. Las manos deben lavarse siempre que:

- a. Haya contacto con sangre o líquidos corporales.
- b. Después de finalizar el trabajo realizado.
- c. Después de quitarse los guantes y entre los cambios de guantes.
- d. Antes de salir del laboratorio.
- e. Antes y después de todas las actividades que implican el contacto de las manos con las mucosas, ojos o lesiones en la piel.

2.- *Está prohibido comer, beber y fumar en el laboratorio.*

3.- *Las manos, lápices o plumas que se manipulan en el laboratorio deben mantenerse alejados de la boca y de las mucosas del personal que trabaje en el mismo.*

4.- *Los alimentos y bebidas nunca deben mantenerse en el mismo refrigerador que las muestras del laboratorio o en donde se guardan o prueban los materiales potencialmente infecciosos.*

5.- *Los elementos punzocortantes contaminados (se incluyen, pero no están limitados a agujas, hojas de bisturí, pipetas, jeringas con agujas, portaobjetos) deben colocarse en un recipiente resistente a la perforación que se rotula con el símbolo universal de residuo biopeligroso o un recipiente rojo que se adhiera a las normas (véase Figura 19.)*

6.- *El personal debe portar ropa y equipo protector, como el que se describe a continuación;*

- a. *Uso de batas, chaquetas y protectores de mangas o cualquier combinación: Deben utilizarse puesto que hay posibilidades de salpicaduras o derrames de la sustancia con que se trabaja.*

- b. *Uso de guantes:* Nos ayudan a prevenir el contacto directo con la sangre o líquidos corporales incluso deben utilizarse en la manipulación del material biopeligroso empaquetado y cuando se desinfectan las superficies que estuvieron en contacto con este tipo de sustancias. El cambio de guantes se realiza cuando hay contaminación visible o si se produce una lesión física. Es importante mencionar que bajo ninguna circunstancia deben ser reutilizados ni lavados y deben desecharse en un recipiente para material biopeligroso.

- c. *Uso de gafas para los ojos y cubrebocas:* Con ellos se protegen boca, ojos y nariz, en caso de posibles salpicaduras provenientes de la muestra.

7.- *Limpieza del laboratorio:* los equipos e instrumentos utilizados para procesar las muestras deben desinfectarse inmediatamente después de ser utilizados, la limpieza debe ser interna y externa. A su vez debe verificarse que el área de trabajo y el piso se encuentren libres de algún residuo, de no ser así deberán desinfectarse también estas áreas.

5.2 Arreglo experimental

El equipo y arreglo experimental utilizado en este proyecto para a la obtención de las señales fotoacústicas fue el siguiente;

Se trabajo con un láser de Nd: YAG (*Quantel, brilliant B*), con modo de operación Q-switch el cual permite tener pulsos cortos del orden de 5 ns a una frecuencia de repetición de 10 Hz, así como variar la energía por pulso mediante la variación del tiempo de retardo del Q-switch o delay. A este láser se le acoplo su segundo armónico obteniendo de esta manera la longitud de onda de 532 nm, para irradiar la muestra se controló la energía por pulso mediante el delay del láser con un valor fijo en 425 μ s que corresponde a una energía de 1.8 mJ/pulso y a una fluencia de 14.32 mJ/cm² (*ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Es importante mencionar que el equipo se encendió previamente para permitir el calentamiento de la lámpara y se estabilizara la energía.

Como transductor se utilizó un sensor polimérico piezoeléctrico de PVDF (modelo LDT1-028K), el cual fue adherido con cinta doble cara a una de las caras de una celda de cuarzo de dimensiones de 1 cm x 1 cm x 5 cm donde se introdujo la muestra de sangre previamente homogenizada. Esta celda a su vez se colocó al interior de un soporte de plástico que permitió mantener fija la posición de la celda. Dicho sensor y un fotodetector (*Thorlabs*) con rango de 200 nm a 1100nm, fueron usados para detectar las señales acústicas producidas al ser irradiada la muestra con los pulsos láser, ambos se conectaron a un osciloscopio digital (*Tektronix DPo5204 Digital Phosphor*) que sirvió para el registro de los datos de las señales eléctricas producto de la detección del sensor, los cuales fueron salvados y exportados a una computadora para su posterior análisis.

El arreglo experimental descrito anteriormente se ilustra en la *Figura 20*:

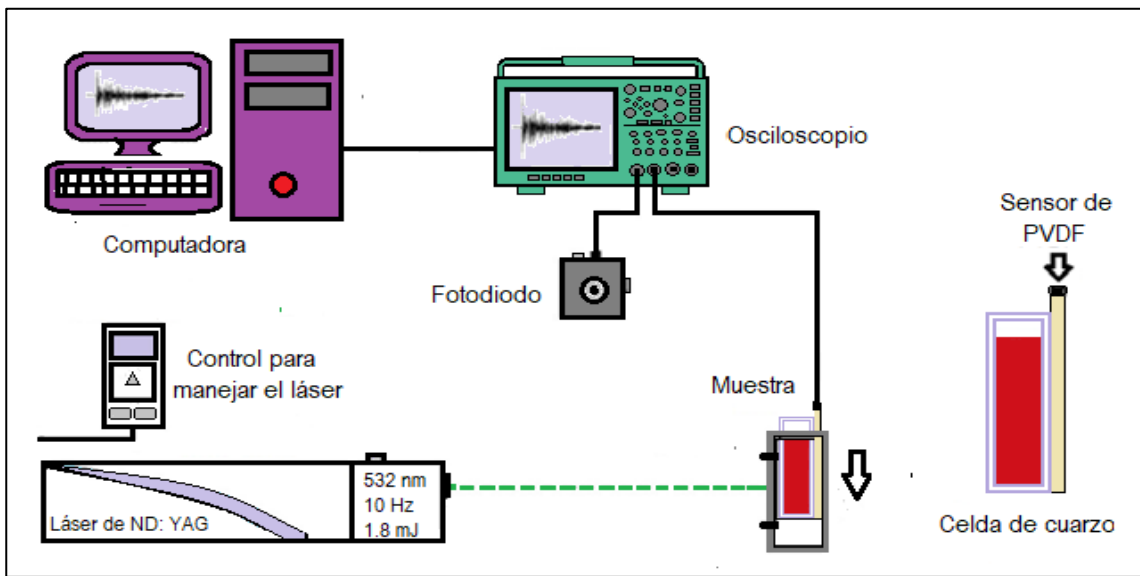


Figura 20. Se muestra el arreglo experimental, realizado para las mediciones de las muestras de sangre

Antes de iniciar con las mediciones de las muestras de sangre, se obtuvo la respuesta del sensor de PVDF, únicamente haciendo incidir un pulso. El sensor se conectó directamente al osciloscopio a unos 60 cm frente al láser pulsado de Nd:YAG, de tal manera que el láser incidiera directamente sobre la superficie del mismo, por otro lado, se utilizó el fotodiodo como mecanismo de referencia para indicar a partir de qué punto comenzaba la detección del sensor. Los datos obtenidos fueron salvados

directamente del osciloscopio y posteriormente graficados y procesados con el software OriginPro. Todas las capturas de datos se realizaron con una resolución de cien mil puntos.

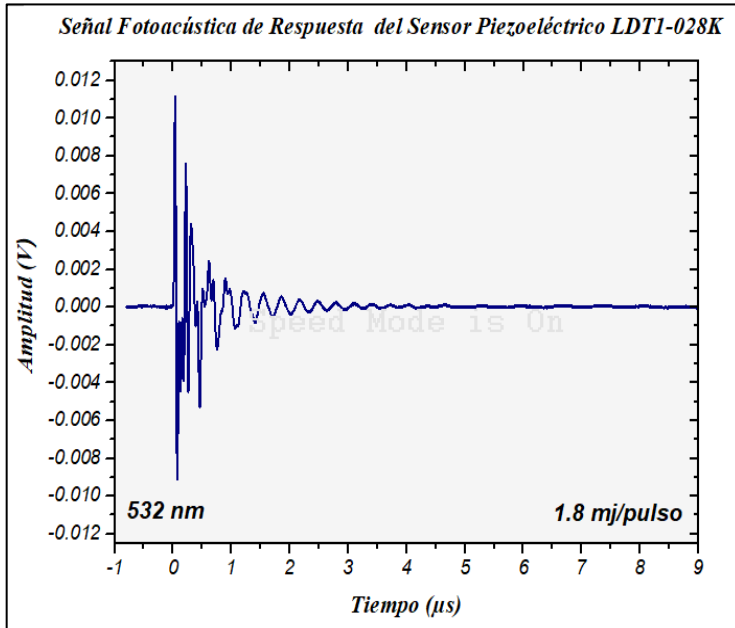


Figura 21. Señal fotoacústica de respuesta del sensor piezoeléctrico LDT1-028K

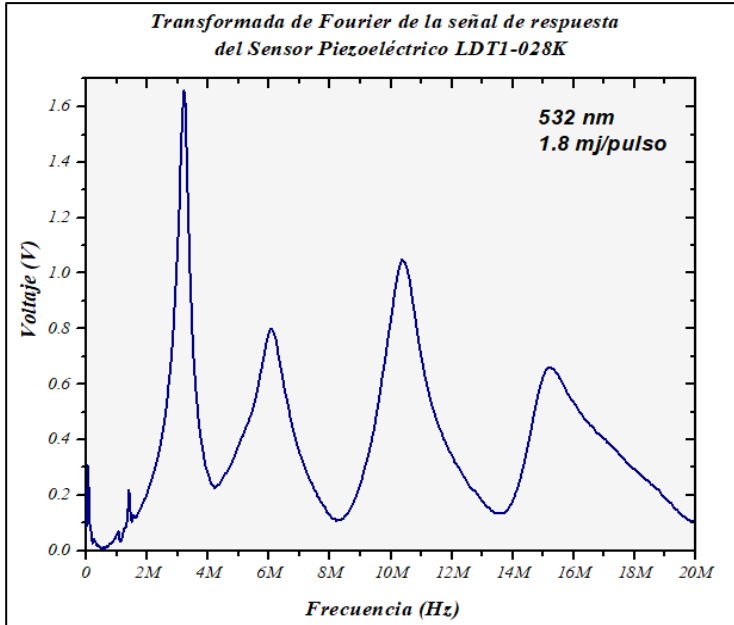


Figura 22. Transformada de Fourier de la señal de respuesta del sensor piezoeléctrico LDT1-028K

La *Figura 21* representa la respuesta del sensor piezoeléctrico, la *Figura 22* corresponde a su Transformadas de Fourier. En esta grafica podemos observar que la respuesta del sensor se encuentra

entre los 2.5 y 20 MHz, las frecuencias más representativas son 3.7 MHz y 9.25 MHz esto sucede para una longitud de onda correspondiente a 532nm. Los resultados de esta prueba indican que el sensor está detectando frecuencias que están en el orden de los MHz, que corresponden a frecuencias que se encuentran dentro del ultrasonido, es por ello que puede asegurarse que frecuencias más bajas no podrán ser detectadas y no alteraran los resultados de las mediciones posteriores dado que solo se registrará lo que se encuentre dentro de ese espectro y no frecuencias más bajas.

Una vez verificada la respuesta del sensor se procedió a la realización de las mediciones correspondientes para la obtención de las señales fotoacústicas de las muestras.

5.3 Procedimiento experimental

El desarrollo del procedimiento experimental se dividió en dos partes, que se describen a detalle a continuación.

Primera parte experimental

Para esta primera parte se obtuvo el espectro de absorción de la hemoglobina de sangre total sana. Esto se realizó con un espectrofotómetro UV-VIS de la siguiente manera: dado que la sangre es una sustancia muy opaca y los límites de detección del espectrofotómetro se saturan al no dejar pasar luz, se tuvo que preparar la siguiente solución: en una celda de cuarzo de 3ml se vertieron 3ml de solución isotónica¹¹ (suero 0.9% NaCl), usando una pipeta se tomaron directamente del tubo vacutainer 10µl de sangre total y se vertieron en la celda de cuarzo. Para tener una solución homogénea se revolvió con la punta de una jeringa.

¹¹ **Solución isotónica:** Se sabe que el hematocrito describe la fracción de células dentro una muestra completa de sangre. En solución isotónica—o la solución salina normal—el volumen celular tiende a permanecer constante a pesar de la partícula permanente y el flujo de agua existente entre las áreas intra y extracelulares. Dentro de la práctica clínica, se usan varios tipos de soluciones biocompatibles. 0.9% de NaCl es la solución (NaCl) que más se acerca a la isotónica. Se ha demostrado que el comportamiento del volumen celular bajo concentraciones altas de NaCl ocasiona un importante grado de hemólisis, efecto que no se presenta en soluciones salinas entre el 0.41% y 4.68%. [41]

Los resultados de este experimento se muestran en la *Figura 23*, como se observa, la hemoglobina contenida en la sangre tiene un rango de absorción entre los 320 y 600 nm, cuyas bandas principales se encuentran en los intervalos: (375-371) nm, (371-451) nm, (512-561) nm y (561-586) nm. Como se puede observar a 532 nm no se encuentra el máximo pico de absorción de la muestra, sin embargo, la técnica fotoacústica es suficientemente sensible para detectar una señal incluso en estos mínimos de absorción, es por ello que fue posible utilizar la longitud de onda de 532 nm (véase la *Figura 24*)

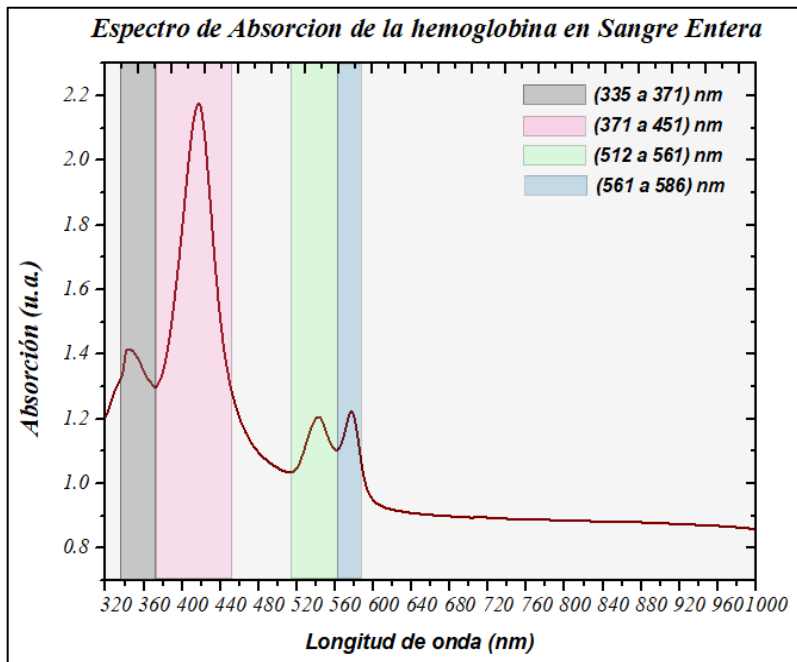


Figura 23. Espectro de absorción de la hemoglobina en sangre total, realizándose un barrido de 320 nm a 1000 nm.

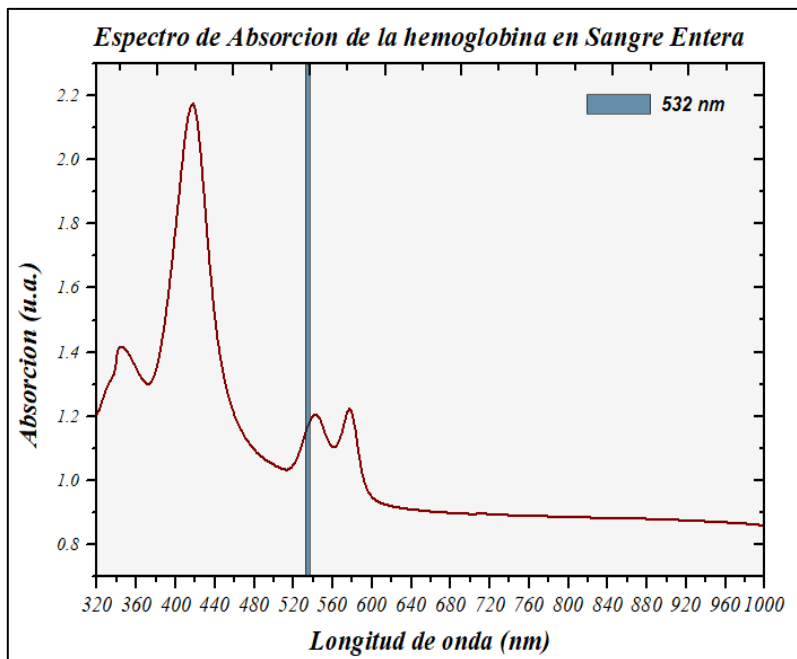


Figura 24. Se muestra el espectro de absorción de la hemoglobina en sangre total, mostrando específicamente cual es la absorción en la longitud de onda de 532 nm.

Segunda parte experimental

Una vez obtenido el espectro de absorción de la hemoglobina de la sangre y comprobado que absorbe en la longitud de onda de 532 nm, se pasó a la segunda parte de la experimentación que fue la obtención de la señal fotoacústica de la sangre. Es importante mencionar que las muestras de sangre utilizadas fueron recolectadas en un tubo Vacutainer® con un anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético, EDTA). Los tubos Vacutainer® con EDTA cuentan con la autorización de la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para ser utilizados en banco de sangre sin presentar riesgo o alteraciones. Las siguientes características básicas del anticoagulante son: no alterar el tamaño de los eritrocitos, no producir hemólisis, evitar la agregación plaquetaria y no alterar la morfología de los leucocitos.

Las muestras de sangre para estudios hematológicos deben ser analizadas tan pronto como sea posible tras su recolección. Si se prevé el retraso en su análisis se deben refrigerar a 4°C durante un período máximo de 24 h. No se deben realizar contajes celulares en muestras sanguíneas con más de 3 días de antigüedad. Las muestras sanguíneas para análisis hematológico no deben ser nunca congeladas, ni tampoco situadas en contacto directo con los acumuladores térmicos empleados para el envío en refrigeración.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la obtención de la señal fotoacústica de la sangre se realizó utilizando el siguiente método: Para homogeneizar las muestras e iniciar con las mediciones, se tomó el tubo vacutainer que contenía la sangre a utilizar y se homogeneizo utilizando el método 8x8x8 (véase la Figura 25.).

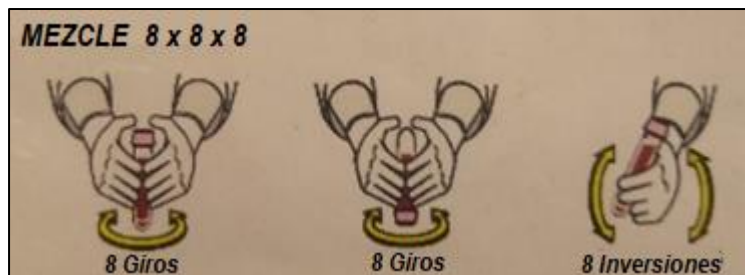


Figura 25. Se ilustra la forma correcta de homogeneizar la sangre dentro de un tubo vacutainer.

Terminado el proceso de homogenización se vació la sangre directamente del tubo cuidadosamente a fin de evitar la hemólisis de la muestra, en la celda de cuarzo hasta llenarse en su totalidad, es importante mencionar que previamente ya se le había adherido a la celda el sensor PVDF, garantizándose el buen acoplamiento entre ellos mediante una cinta adhesiva.

En seguida se colocó la celda de cuarzo dentro del soporte, se ajustó y se encendió el láser y la muestra fue irradiada directamente con la longitud de onda de 532 nm, se esperaron aproximadamente 10 segundos a que se estabilizara la señal fotoacústica visualizada en el osciloscopio, los datos recabados de la señal detectada fueron salvados con una resolución de cien mil puntos y finalmente exportados a una computadora para su posterior análisis con el software OriginPro y el software estadístico SPSS.

Cabe mencionar que en esta segunda parte experimental se trabajó con muestras de donantes, las cuales fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en tubos vacutainer¹² de tapa morada con aproximadamente 3ml. Todas las muestras contaron con los estudios de biometrías hemáticas y serologías.

A fin de tener muestras con alguna patología y comparar sus señales fotoacústicas con las sanas, se realizó una prueba piloto con muestras de sangre otorgadas por el laboratorio de hematología del Hospital General de México. Estas muestras fueron de pacientes con diagnóstico de anemia hemolítica y sujetos con leucemia.

A modo de ilustración se presentan en la *Figura 26*, 3 fotografías de las muestras que se recibieron;

¹² **Tubos Vacutainer:** Consta de un tubo de vidrio con un tapón de plástico blando, suficiente como para permitir que lo atraviere una aguja con un poco de fuerza. Existen varios tipos de Vacutainer que se diferencian por el color de su tapón, cuyo color indica que ese tubo tiene determinado aditivo o no [42]. El tapón morado posee EDTA, sirve para exámenes de sangre total (Grupo sanguíneo, Hemoglobina, Hematocrito, Recuento plaquetario, Coombs directo, Coombs indirecto, Hemoparásitos y VSG) y exámenes de hematología (Extendido de sangre periférico y recuento de reticulocitos [43].

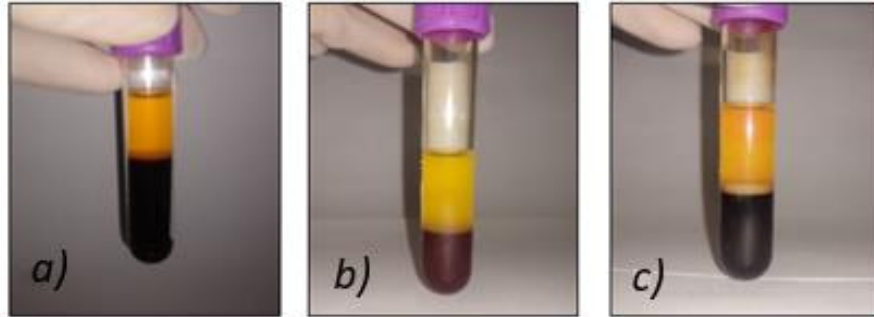


Figura 26. En las fotografías se pueden observar las distintas muestras analizadas en este trabajo, entregadas por el banco de sangre y el laboratorio de hematología, cabe destacar que todas las muestras están centrifugadas;

- a) El tubo vacutainer contiene una muestra de donante sano.
- b) El tubo vacutainer contiene sangre de un sujeto diagnosticado con anemia hemolítica, puede observarse el bajo nivel de hemoglobina que presenta la muestra.
- c) Este tubo vacutainer contiene sangre de un sujeto diagnosticado con leucemia, puede observarse una capa blanca formada por la producción anormal de leucocitos que separa el plasma de los eritrocitos.

En el siguiente capítulo, se realizará un análisis cuidadoso de los resultados obtenidos en función de las señales fotoacústicas de cada uno de los grupos estudiados, a fin de resaltar las características más importantes en las señales encontradas para cada patología. Finalmente, se realizará un análisis estadístico de toda la señal fotoacústica que mostrará de manera global aquellos aspectos que hacen diferente a cada condición.

CAPÍTULO 6

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Recordemos que el efecto fotoacústico consiste en la generación de ondas acústicas producidas por la absorción de luz de un material determinado. Las ondas de sonido generadas contienen información que nos ayuda a determinar distintas propiedades de la muestra que desea estudiarse. Esta técnica es tan sensible que nos permite estudiar materiales en estado sólido, líquido o gas, inclusive se pueden estudiar materiales opacos, que otras técnicas espectroscópicas no podrían estudiar.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al aplicar la técnica fotoacústica para el estudio de la sangre total. Las muestras que se analizaron fueron: sangre total de sujetos donadores sanos y sangre total de sujetos diagnosticados con los siguientes trastornos: anemia hemolítica y leucemia, a fin de identificar características particulares o patrones asociados a cada condición a través de sus señales fototérmicas. A continuación, se muestra a detalle el análisis y los resultados encontrados para cada caso.

6.1 Análisis de sangre sana

Uno de los objetivos fundamentales que se buscó al emplear la técnica fotoacústica fue mostrar que los resultados obtenidos son reproducibles, para comprobarlo, se utilizaron dos sensores diferentes y se midieron un total de 47 muestras de sangre de las cuales se descartaron 19 debido a errores en la medición.

A continuación, se presentan en la *Figura 27*, los datos graficados de las señales fotoacústicas medidas con el sensor 1, de 10 muestras de sangre de sujetos donadores sanos; 5 hombres y 5 mujeres.

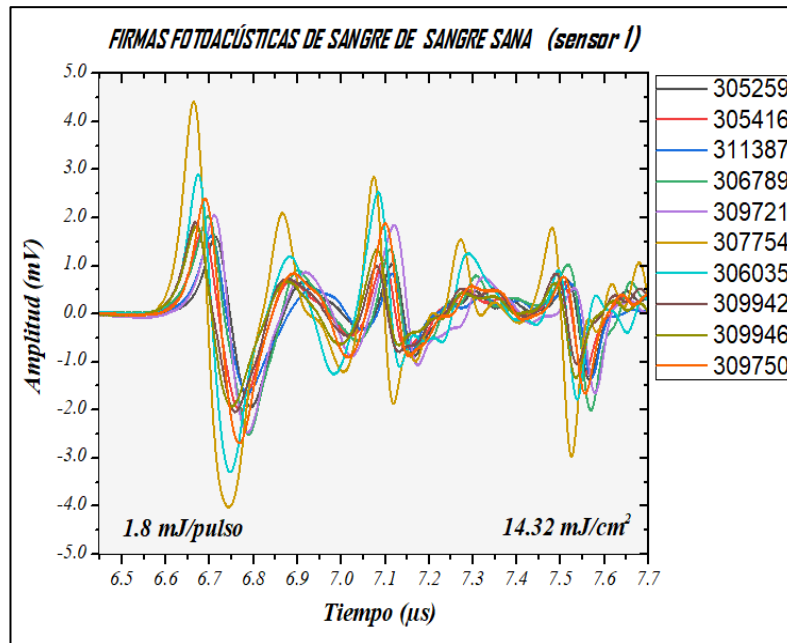


Figura 27. Señales fotoacústicas obtenidas de hombres y mujeres con el sensor 1.

Aunque se pueden apreciar ciertas similitudes entre las señales alrededor de valores específicos en el tiempo, para un mejor análisis se procedió a agruparlas por sexo tomando en cuenta las observaciones de los médicos pues existe diferencia en la cantidad de hemoglobina determinada por el sexo, así las gráficas correspondientes se muestran a continuación:

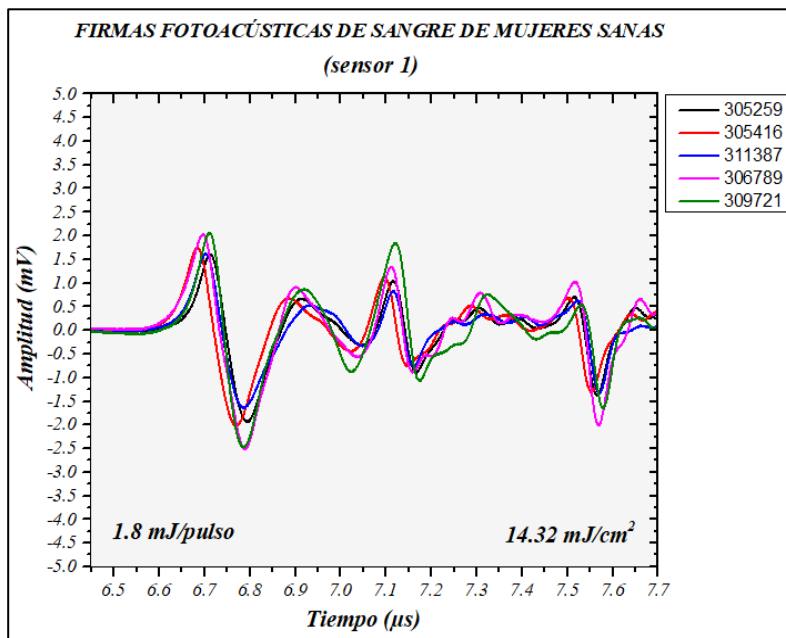


Figura 28. Señales fotoacústicas obtenidas para mujeres con el sensor 1.

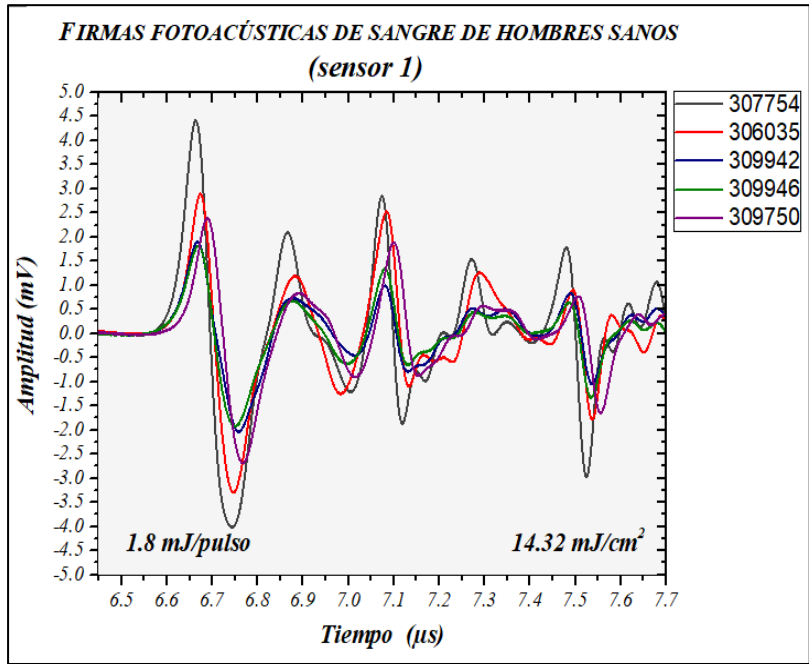


Figura 29. Señales fotoacústicas obtenidas para hombres con el sensor 1.

Con la agrupación de las señales en función del sexo como se muestra en las Figuras 28 y 29, se puede identificar de manera más clara un patrón asociado a muestras de sangre sana. Estos experimentos fueron realizados nuevamente empleando otro sensor (sensor 2), del total de muestras medidas se presentan nuevamente 10 de ellas agrupadas por sexo en las Figuras 30 y 31.

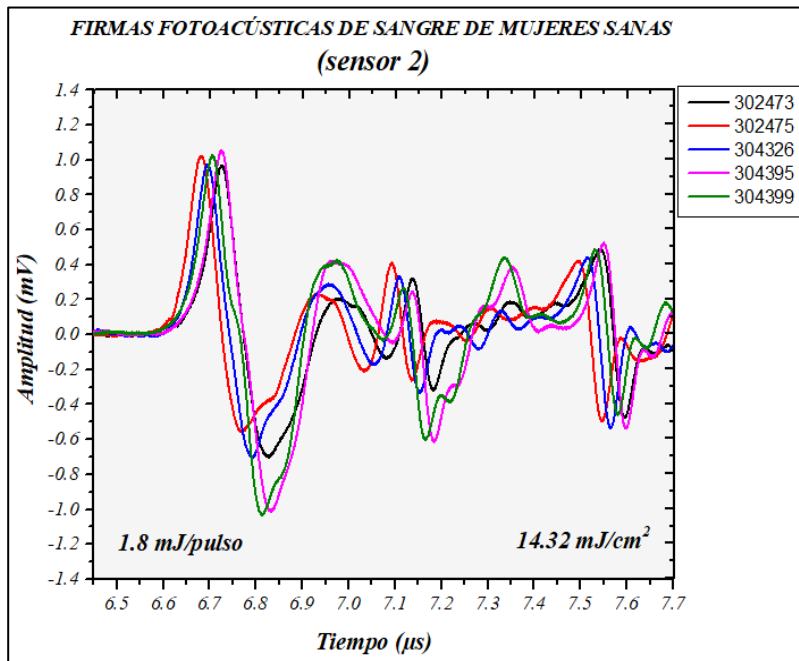


Figura 30. Señales fotoacústicas obtenidas para mujeres, usando el sensor 2.

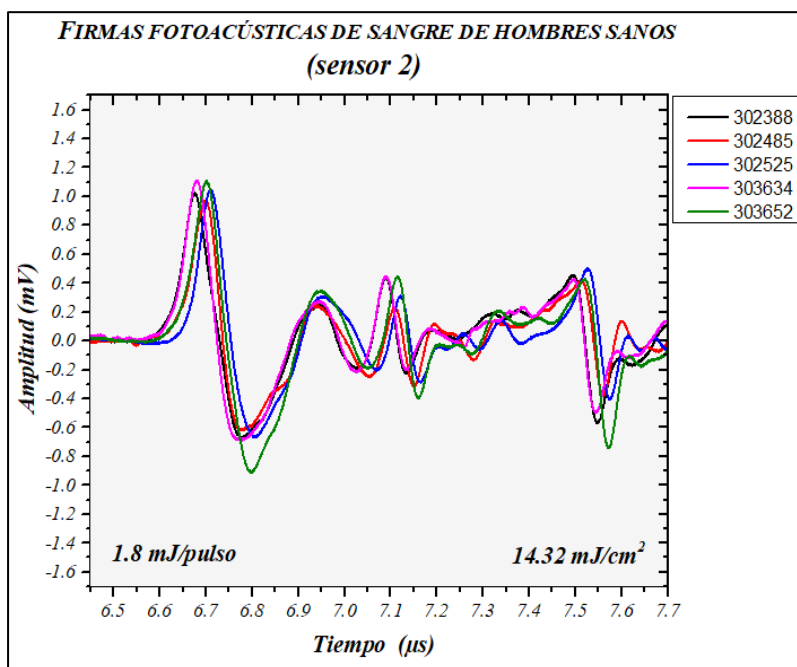


Figura 31. Señales fotoacústicas obtenidas para hombres, usando el sensor 2.

Estos resultados permiten afirmar que a pesar de la variabilidad propia que existe en muestras biológicas es posible identificar un patrón característico o propiamente dicho una firma fototérmica de muestras de sangre total de pacientes sanos clasificados por sexo. El viaje de la onda de sonido que se produce en la muestra de sangre es el resultado de la interacción de la luz con las células, principalmente de los eritrocitos, así la forma de la señal fotoacústica estará determinada por dicha interacción, la cual dependerá a su vez de la morfología y densidad de partículas presentes en la muestra.

Una observación importante a mencionar es que además de la variabilidad que existe en las señales dada su naturaleza biológica puede haber diferencias también debido a errores sistemáticos como la fuerza que se aplica para mantener la celda de cuarzo inmóvil y bien acoplada al sensor o fallas en la conexión entre el sensor y el osciloscopio y las variaciones en la energía del láser. De forma ideal, se piensa que al controlar estos factores las señales características de cada grupo no deberían tener tanta variabilidad en la amplitud.

Considerando esta variabilidad de las señales, se obtuvo el promedio de las 5 señales fotoacústicas agrupadas por sexo y su desviación estándar medidas con los sensores 1 y 2.

Los resultados se muestran en las Figuras 32, 33, 34 y 35.

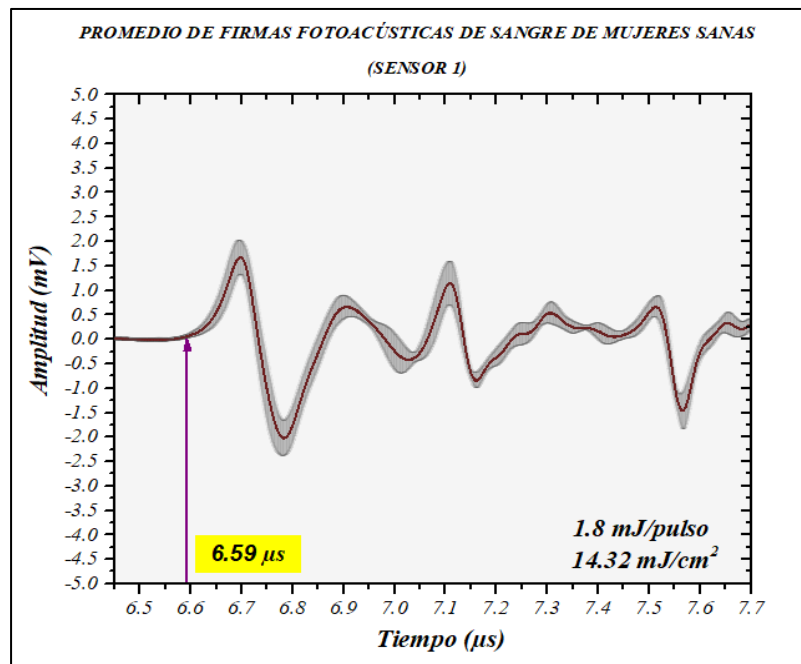


Figura 32. Gráfica del promedio de las señales fotoacústicas obtenidas con el sensor 1, para muestras de mujeres. La parte sombreada que rodea la señal indica la desviación estándar.

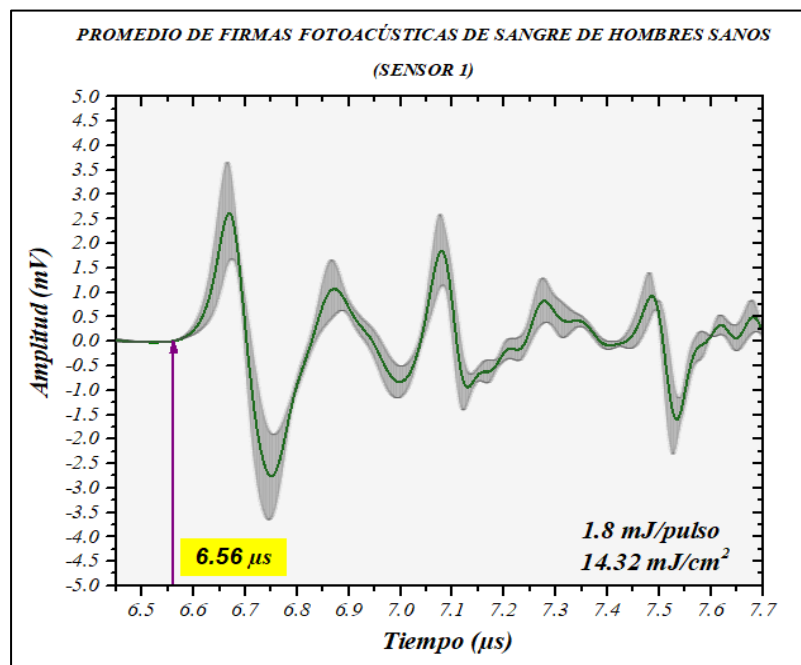


Figura 33. Gráfica del promedio de las señales fotoacústicas obtenidas con el sensor 1, para muestras de hombres. La parte sombreada que rodea la señal indica la desviación estándar.

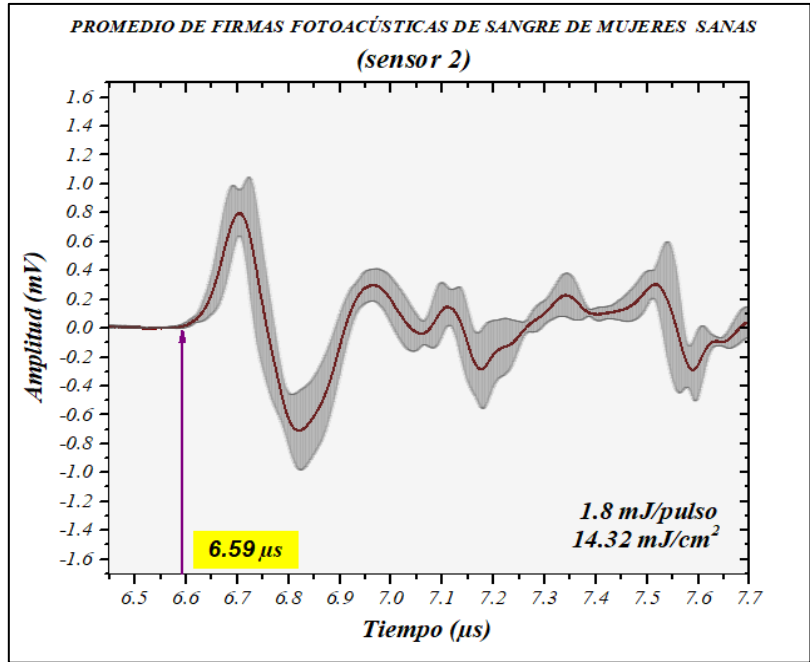


Figura 34. Gráfica del promedio de las señales fotoacústicas obtenidas con el sensor 2, para muestras de mujeres. La parte sombreada que rodea la señal indica la desviación estándar.

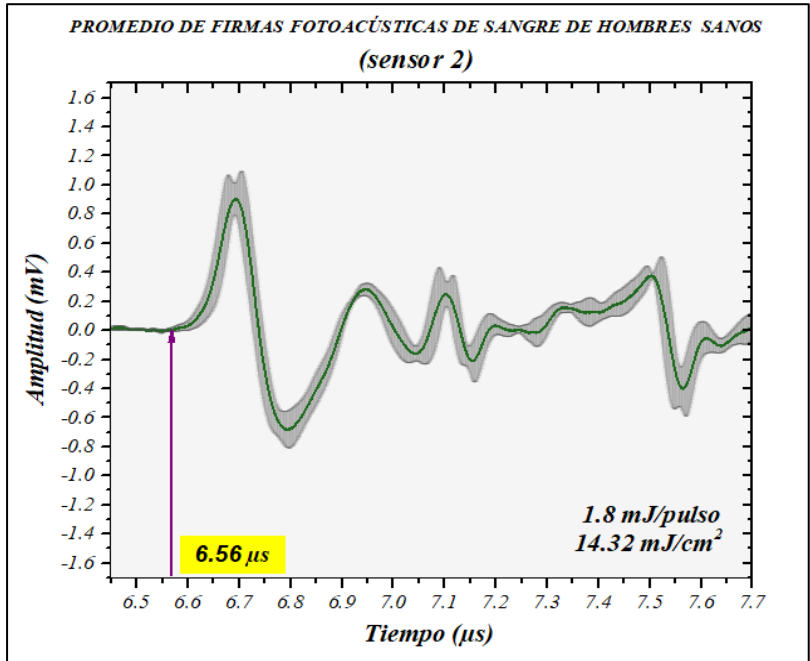


Figura 35. Gráfica del promedio de las señales fotoacústicas obtenidas con el sensor 1, para muestras de hombres. La parte sombreada que rodea la señal indica la desviación estándar.

Una de las características que se pudieron apreciar en las señales PA según el sexo es su relación con la amplitud. Como se observa en las Figuras 32, 33, 34 y 35 correspondientes al promedio de las señales medidas de hombres y mujeres con los sensores 1 y 2 respectivamente, la señal fototérmica de hombres sanos es diferente a la señal fototérmica de mujeres sanas fundamentalmente en la amplitud y el tiempo de arribo. La señal de hombres llega un poco antes que la de mujeres, así, el tiempo de arribo promedio de la señal de hombres es de $(6.56 \pm 0.01) \mu s$ y el de las mujeres de $(6.59 \pm 0.01) \mu s$ independientemente del sensor que se utilice, además la amplitud de la señal de hombres es ligeramente mayor que en el caso de las mujeres.

También gracias al promedio de las señales se logran apreciar 5 amplitudes máximas centradas en los siguientes tiempos y en los intervalos de mV como sigue:

Tabla 9. Máximos principales de las señales fotoacústicas para hombres y mujeres medidas con el sensor 1.

Máximos de la señal fotoacústica	Sensor 1		Sensor 2	
	us	mV	us	mV
<i>Mujeres</i>				
1 ^{er}	6.69	-2.02 a 1.71	6.7	-0.71 a 0.80
2 ^{do}	6.90	-0.43 a 0.67	6.96	-0.04 a 0.30
3 ^{er}	7.11	-0.84 a 1.15	7.11	-0.28 a 0.14
4 ^{to}	7.30	-0.04 a 0.55	7.34	0.09 a 0.23
5 ^{to}	7.51	-1.46 a 0.67	7.51	-0.29 a 0.31
<i>Hombres</i>				
1 ^{er}	6.66	-2.76 a 2.62	6.69	-0.68 a 0.90
2 ^{do}	6.87	-0.84 a 1.08	6.94	-0.16 a 0.29
3 ^{er}	7.08	-0.93 a 1.85	7.1	-0.21 a 0.25
4 ^{to}	7.27	-0.07 a 0.81	7.33	0.11 a 0.16
5 ^{to}	7.48	-1.61 a 0.93	7.50	-0.40 a 0.37

De acuerdo con la Tabla 9, las señales tanto de hombres como mujeres se caracterizan por presentar 5 máximos bien definidos, cuyas amplitudes varían ligeramente entre ellas. Observadas estas diferencias de amplitud en las señales de hombres y mujeres se buscó una correlación entre estas señales y la biometría hemática.

Se sabe que la señal obtenida se debe principalmente a la absorción de los cromóforos, en este caso a la hemoglobina en la sangre cuyo pico de absorción máximo es en 416 nm (véase *Figura 23*), por otro lado, la cantidad de hemoglobina está directamente relacionada con la cantidad de eritrocitos que se encuentran en la sangre, aunado a esto se encontró en la literatura que los niveles de hemoglobina y hematíes o eritrocitos varían con la edad y el sexo del sujeto (véase *Tabla 10*), esta información es relevante ya que las muestras que se estudiaron tanto de hombres como mujeres fueron de sujetos de distintas edades.

Tabla 10. Valores estándar normales de Hemoglobina y eritrocitos para la población mexicana, de acuerdo a la edad.

Ref.: *Rev Latinoamer Patol Clin*, Vol. 59, Núm. 4, pp. 243-250 • Octubre - diciembre, 2012

Valores normales estándar de Hemoglobina y eritrocitos para la población mexicana de acuerdo a la edad.			
Género	Edad (años)	Eritrocitos (millones/μL)	Hemoglobina (g/dL)
Femenino	0 a 1	4.5 a 5.3	12.0 a 15.0
	2 a 5	4.0 a 5.2	11.5 a 15.0
	6 a 10	4.3 a 5.4	12.6 a 15.5
	11 a 15	4.3 a 5.4	13.0 a 15.5
	16 a 20	4.5 a 5.2	12.0 a 16.0
	> 20	4.5 a 5.2	12.0 a 16.0
Masculino	0 a 1	4.7 a 5.3	14.0 a 15.0
	2 a 5	4.0 a 5.2	11.5 a 15.0
	6 a 10	4.3 a 5.4	12.6 a 15.5
	11 a 15	4.3 a 5.4	13.0 a 15.5
	16 a 20	4.7 a 5.8	14.0 a 18.0
	> 20	4.7 a 5.8	14.0 a 18.0

De acuerdo a esta información los valores de la biometría hemática que se tomaron en cuenta en primera instancia fueron; el número de eritrocitos (ERIT) y los niveles de hemoglobina (HGB).

Es importante recalcar que los intervalos de referencia en hematología varían de acuerdo con la edad, sexo y altitud, por lo cual cada laboratorio establece sus propios límites, así los valores de referencia que el banco de sangre del Hospital General de México toma en cuenta para el tipo de población que atiende se muestran en las *Tablas 11 y 12*.

Tabla 11. Datos tomados de la biometría hemática de cada muestra de mujeres, proporcionada por el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

Datos de Mujeres Sanas			
		Intervalo	
		4.00/6.20	11.0/18.8
Edad	Muestra	Eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$)	Hemoglobina (g/dl)
29	305259	4.71	14.7
32	305416	4.69	15.5
18	311387	5.06	15.5
32	306789	4.42	14.7
44	309721	4.76	15

Tabla 12. Datos tomados de la biometría hemática de cada muestra de hombres, proporcionada por el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

Datos de Hombres Sanos			
		Intervalo	
		4.00/6.20	11.0/18.8
Edad	Muestra	Eritrocitos $10^6/\mu\text{l}$	Hemoglobina g/dl
30	307754	6.25A	18.2
22	306035	5.41	17.6
23	309942	5.14	16.6
41	309946	4.81	16.1
37	309750	5.42	17.1

Ahora bien, de acuerdo a las *Tablas 11 y 12*, más allá de que las edades de los sujetos con los que se trabajó no fueron las mismas, puede observarse a simple vista que los niveles de hemoglobina entre una población de hombres y mujeres son distintos, en promedio para las muestras de hombres que se estudiaron ronda los 17.12 g/dl y en las mujeres en promedio está en 15.08 g/dl, presentándose mayor cantidad de hemoglobina en la sangre de hombres.

Comparando los resultados del análisis anterior con las *Figuras 30, 31, 32 y 33* se puede comprobar que con la técnica fotoacústica es posible incluso hacer una distinción entre una señal que corresponde a un hombre sano y a una mujer sana, gracias a la diferencia de amplitudes que se presenta en las señales, manteniendo las mismas condiciones experimentales durante las mediciones que, como se ha podido ver, es producto fundamentalmente de los niveles de hemoglobina en cada muestra. Con lo que respecta a la diferencia en el tiempo de arribo de las señales, podría tener que ver con la densidad de partículas (células) que posee la muestra, es decir de acuerdo a lo observado, entre menor cantidad de eritrocitos existe menor intercambio de energía y por lo tanto más lenta es la propagación de la onda de sonido, por ello la señal fotoacústica promedio de mujeres tiene un tiempo de arribo mayor que la de los hombres.

No obstante, como complemento al análisis anteriormente presentado, se realizó un análisis numérico obteniéndose el valor RMS (valor eficaz) de la señal fotoacústica promedio de hombres y mujeres, que no es otra cosa que una magnitud promedio de una señal con valores positivos y negativos. Para este proyecto, esta información es importante dado que el valor eficaz nos dará un

promedio de la intensidad en una región de la señal, en otras palabras, esto podría interpretarse de la siguiente manera: si existe una mayor amplitud en una región de la señal se obtendrá un valor eficaz mayor y viceversa.

También se calculó la diferencia porcentual entre los valores RMS encontrados para las señales, de la siguiente manera;

$$Diferencia\ porcentual = \frac{(V_{RMSH} - V_{RMSM})}{V_{RMSH}} \times 100\%, \quad \dots (4)$$

donde V_{RMSH} = Valor eficaz de la señal fototérmica de hombres y V_{RMSM} = Valor eficaz de la señal fototérmica de mujeres.

Como aclaración se menciona que el análisis de la diferencia porcentual se realizó con los datos obtenidos para las señales fotoacústicas del sensor 1, ya que el sensor 2 presentaba menor resolución debido al tiempo de uso y daños en la película Maylar por pulsos de alta potencia, es también por esta razón que las señales en el osciloscopio fueron de amplitudes menores que las señales obtenidas con el sensor 1, a pesar de ello, las proporciones en las señales de acuerdo al sexo se presentaron independientemente del sensor utilizado.

A continuación, los valores RMS y la diferencia porcentual obtenidos para las señales fotoacústicas del sensor 1 se muestran en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Valor eficaz y diferencia porcentual de la señal promedio de hombres y mujeres del sensor 1

Sensor 1		
	Valor RMS	Diferencia porcentual (%)
<i>Señal fotoacústica de hombres</i>	<i>3.104E-04</i>	<i>27.12</i>
<i>Señal fotoacústica de mujeres</i>	<i>2.262E-04</i>	

Como primera observación en la *Tabla 13*, el valor eficaz de la señal fotoacústica de hombres es mayor al valor eficaz de la señal de mujeres lo que como se dijo anteriormente podría interpretarse como que existe una mayor amplitud en la señal de hombres, que es precisamente lo que se observa en las gráficas de las señales fotoacústicas, incluso observamos que la diferencia porcentual entre

éstos valores nos dice que la señal de hombres es mayor en amplitud que la señal de mujeres en un 27.12%.

Por otro lado, también se obtuvo la diferencia porcentual de la hemoglobina promedio presente en las muestras de la población de hombres y mujeres estudiadas (recordemos que el valor de la hemoglobina promedio fue calculada a partir de los datos de la biometría hemática de cada muestra que se presentan en las *Tablas 11 y 12*).

Los resultados se muestran en la *Tabla 14*.

Tabla 14. Hemoglobina promedio y diferencia porcentual de la población de hombres y mujeres estudiada.

Datos de la población de hombres y mujeres sanas		
	Promedio de Hemoglobina (g/dl)	Diferencia Porcentual (%)
<i>Población de hombres</i>	<i>(17.12 ± 0.62)</i>	11.92
<i>Población de mujeres</i>	<i>(15.08 ± 0.34)</i>	

Comparando los resultados de la diferencia porcentual de las *Tablas 13 y 14*, lo que particularmente llama la atención es que la diferencia porcentual obtenida a partir del valor RMS de las señales fotoacústicas es mayor que la obtenida con los datos de la biometría hemática. Una posible explicación a esto es que por un lado la biometría hemática solo nos está mostrando el dato de la cantidad de hemoglobina por lo que la diferencia porcentual entre hombres y mujeres se basa solo en ese dato y por ende es de esperarse una diferencia tan pequeña, sin embargo, la señal contiene no solo la información de la hemoglobina sino de la totalidad de la sangre, si bien es cierto que la hemoglobina es el principal cromóforo absorbedor, probablemente el que la diferencia porcentual haya salido tan grande tiene que ver también con la contribución de los otros elementos presentes en la sangre.

Finalmente podemos concluir de acuerdo con estos resultados, se está confirmando que existe una diferencia entre las muestras de hombres y mujeres, diferencia marcada principalmente por la cantidad de hemoglobina presente en la sangre de las muestras estudiadas y que además esta distinción está siendo visualizada en las señales fotoacústicas obtenidas.

6.2 Análisis de sangre con anemia hemolítica

Cabe aclarar que todas las mediciones que se presentan a continuación se realizaron con el sensor 1, pues mostró una mejor resolución en las señales fotoacústicas obtenidas a diferencia del sensor 2, ya que este presentaba un desgaste por el uso y daños ocasionados al utilizar el láser con altas potencias, además, en la sección 6.1 se demostró que independientemente del sensor utilizado, el patrón obtenido de las señales fotoacústicas era muy similar y las señales eran reproducibles.

Se midieron un total de 15 muestras de sujetos con diagnóstico de anemia hemolítica, proporcionadas por el laboratorio de hematología del Hospital General de México, dado que en mayor cantidad se tenían muestras microcíticas y pocas macrocíticas (más adelante se verá a qué se refieren estos términos), con el objetivo de comparar la misma cantidad de muestras solamente se eligieron las 6 más representativas de cada categoría. Haciendo uso del software *OriginPro*, se graficaron los datos de las 6 señales fotoacústicas obtenidas y los resultados se muestran en la *Figura 36*.

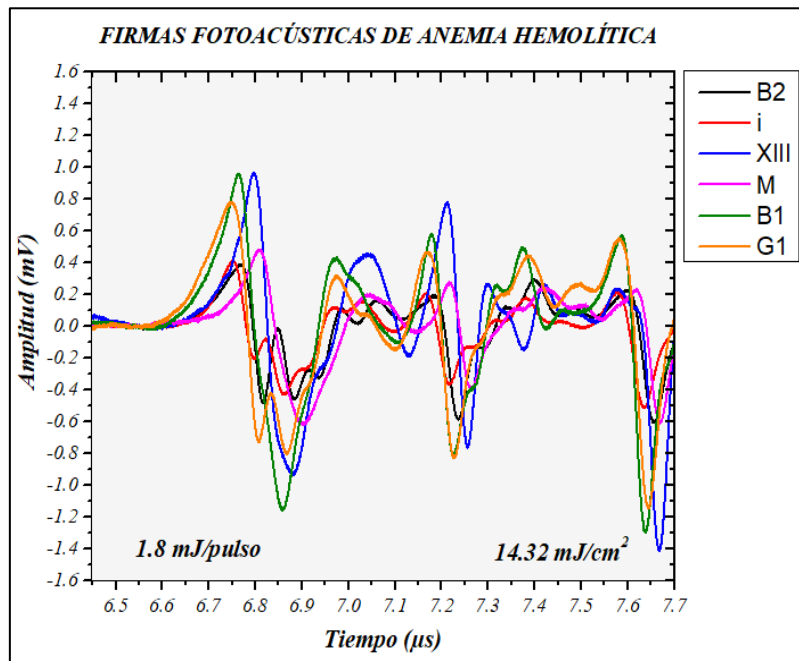


Figura 36. Señales fotoacústicas obtenidas de sangre de sujetos diagnosticados con anemia hemolítica.

Un dato curioso es que las muestras de anemia hemolítica que se presentan en la *Figura 36* son en su totalidad de mujeres, investigando un poco se pudo constatar que la anemia afecta en mayor medida a las mujeres que a los hombres y esto se debe principalmente a las pérdidas de sangre por la menstruación o la deficiencia de hierro en el embarazo, entre otros factores.

Lo primero que se puede destacar en la *Figura 36* es que la amplitud de las señales es muy pequeña con respecto a las muestras de sangre sana, en particular si se comparan con las señales de las mujeres, cuyos valores del primer máximo se encuentran entre -2.02 y 2.71 mV mientras que para estas muestras se encuentran entre -1.2 y 1 mV aproximadamente, recordemos que los niveles de hemoglobina en la sangre son bajos para un sujeto que es diagnosticado con anemia de cualquier tipo, pues la producción de eritrocitos en la sangre es menor que en el caso de una persona sana.

Para demostrar que la amplitud de la señal está relacionada con el nivel de hemoglobina en la sangre, se eligieron las señales fotoacústicas de 5 muestras con diferente contenido de hemoglobina (en *Figura 37* se ilustran ésta muestras con su respectiva cantidad de hemoglobina) y se tomó la amplitud del primer máximo de la señal que corresponde con la señal longitudinal, además se realizó esta consideración por qué la amplitud de la primera oscilación corresponde directamente a la absorción de los cromóforos absorbedores lo que se traduce a la cantidad de hemoglobina en las muestras, las oscilaciones subsecuentes se consideran rebotes de la señal dentro de la celda.

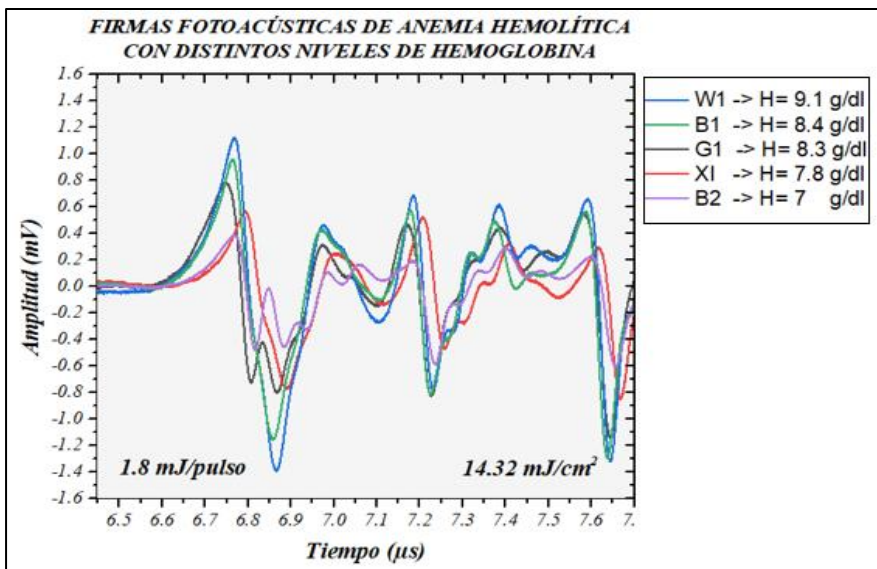


Figura 37. Señales fotoacústicas de sangre con anemia hemolítica elegidas con sus respectivos niveles de hemoglobina.

El primer máximo de amplitud se graficó con respecto a los niveles de hemoglobina (este dato se obtuvo de las biometrías de cada sujeto). Los resultados de este análisis se muestran en la *Figura 38*.

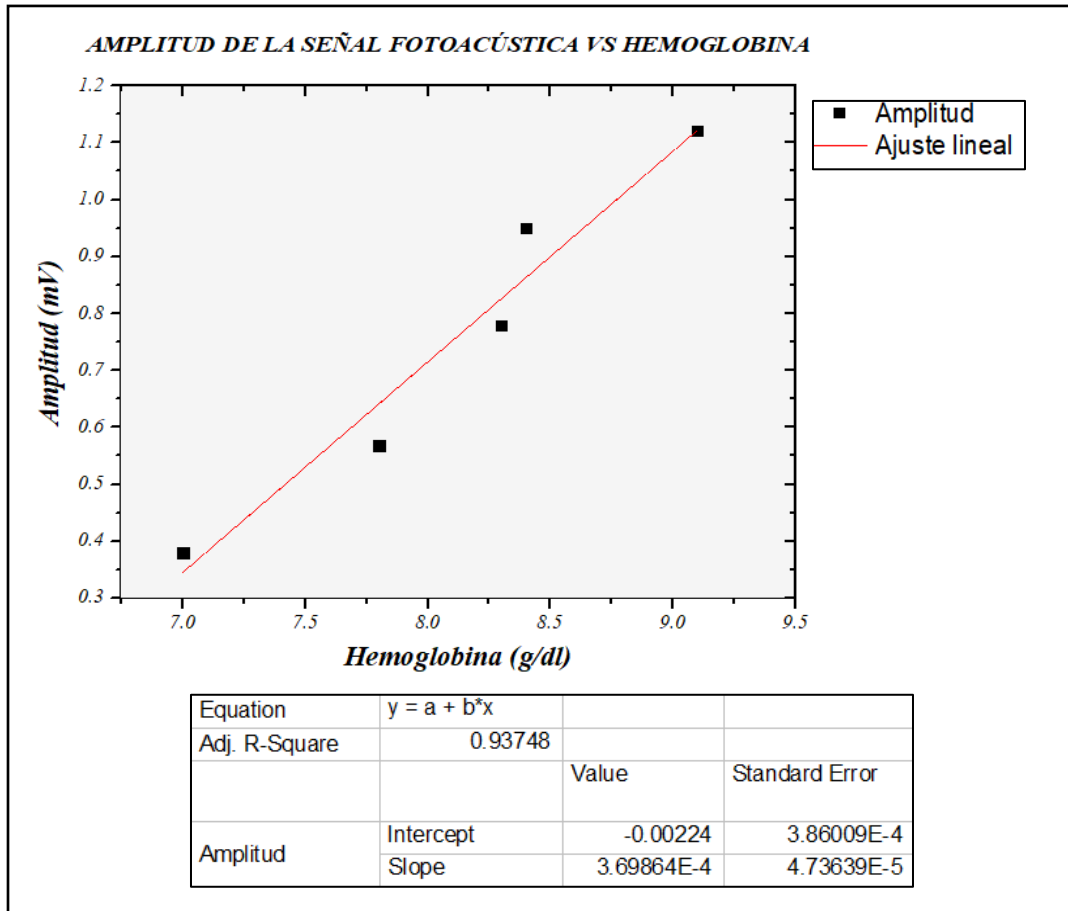


Figura 38. Gráfica de la relación lineal entre la amplitud de la señal fotoacústica y los distintos niveles de hemoglobina en cada muestra.

Se eligieron las señales fotoacústicas de 5 muestras con diferente contenido de hemoglobina, tomándose la medida de la amplitud del primer máximo de la señal. El resultado, que se tiene es una relación aproximadamente lineal, observándose que, la amplitud de la señal fotoacústica será mayor al incrementar la cantidad de hemoglobina en las muestras.

Para reforzar este resultado, se agregó a esta relación 4 muestras más, pero esta vez de sangre total sana: 2 de hombres y 2 mujeres, obteniéndose la gráfica de la *Figura 39*. Se observa, por un lado,

en la parte inferior de la gráfica, al grupo de sujetos con anemia hemolítica, que como ya vimos son quienes poseen menor cantidad de hemoglobina en la sangre, luego se puede ver un incremento abrupto en la amplitud cuando se presenta al grupo de mujeres con mayor cantidad de hemoglobina respecto al grupo de sujetos con diagnóstico de anemia y más arriba con un aumento en amplitud considerable respecto al grupo de anemia y mujeres, tenemos al grupo de hombres sanos.

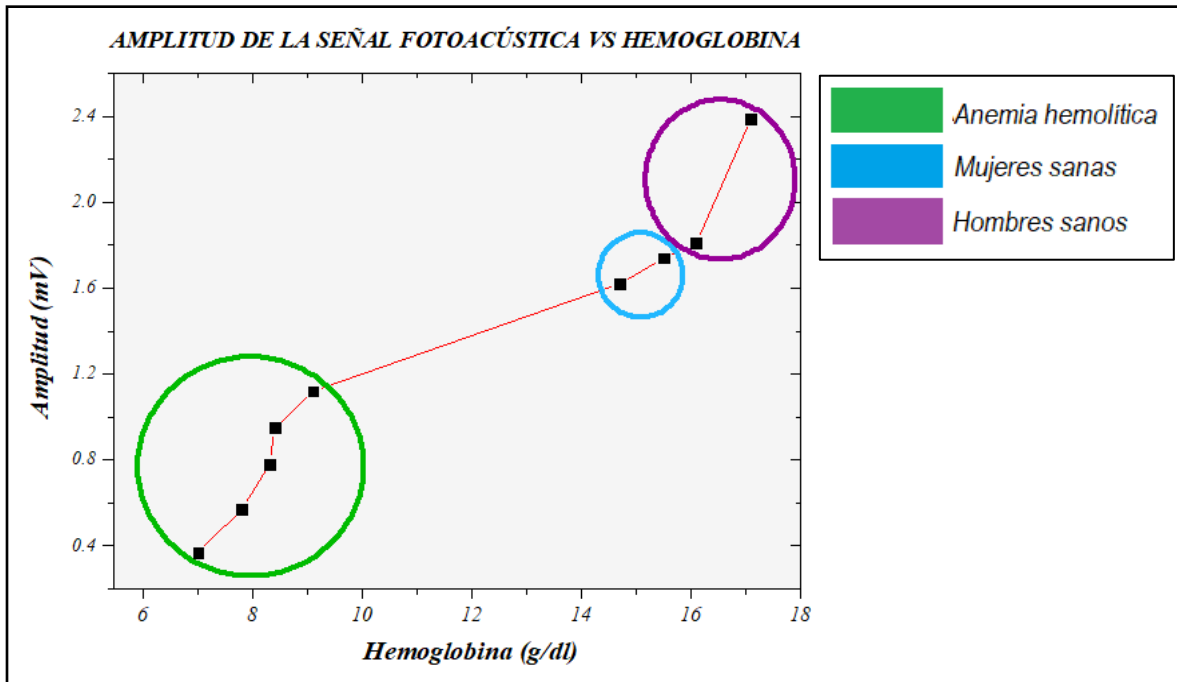


Figura 39. Gráfica de la relación lineal entre la amplitud de la señal fotoacústica y los distintos niveles de hemoglobina de muestras de anemia y sangre sana.

Este resultado es sumamente importante porque la técnica fotoacústica nos está permitiendo identificar esta disminución en la cantidad de hemoglobina en las muestras y esto podría ayudar a en caso de que no se supiera, que existe algún problema hematológico relacionado precisamente con la disminución de hemoglobina y por ende de eritrocitos.

Otro de los factores importantes de las señales fotoacústicas es el tiempo de arribo de la señal, dado que se tienen muestras de anemia hemolítica en su totalidad de mujeres, se realiza una comparación de los tiempos de arribo de la señal fotoacústica promedio de mujeres sanas obtenida en la sección 6.1 y las señales de anemia hemolítica presentadas en la *Figura 36*.

En primer lugar, en la *Figura 40*, se presenta la señal fotoacústica promedio de sangre de mujeres sanas donde se observa un tiempo de arribo de aproximadamente $6.59 \mu\text{s}$, sin embargo, las señales de anemia hemolítica de la *Figura 41*, presentan una variabilidad en el tiempo de arribo.

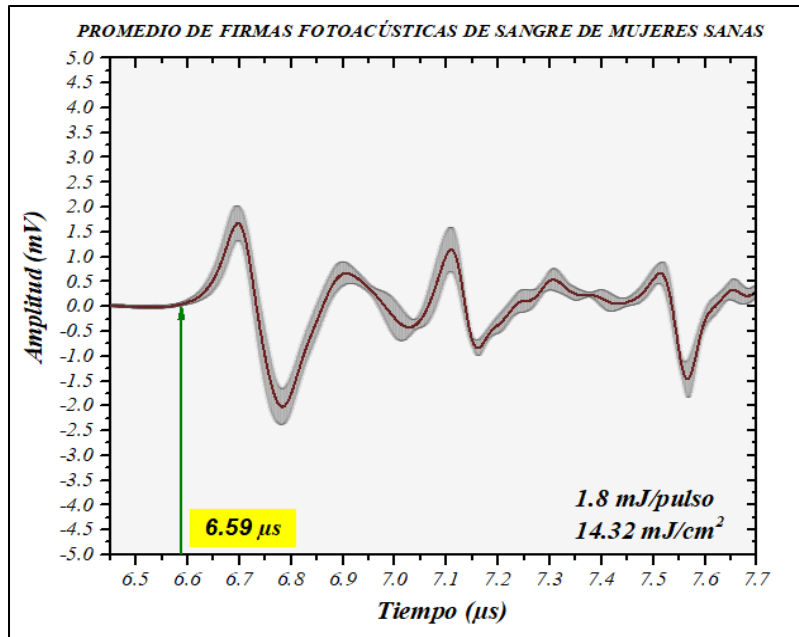


Figura 40. Gráfica del tiempo de arribo de las señales fotoacústicas de sangre de mujeres sanas tomadas con el sensor 1.

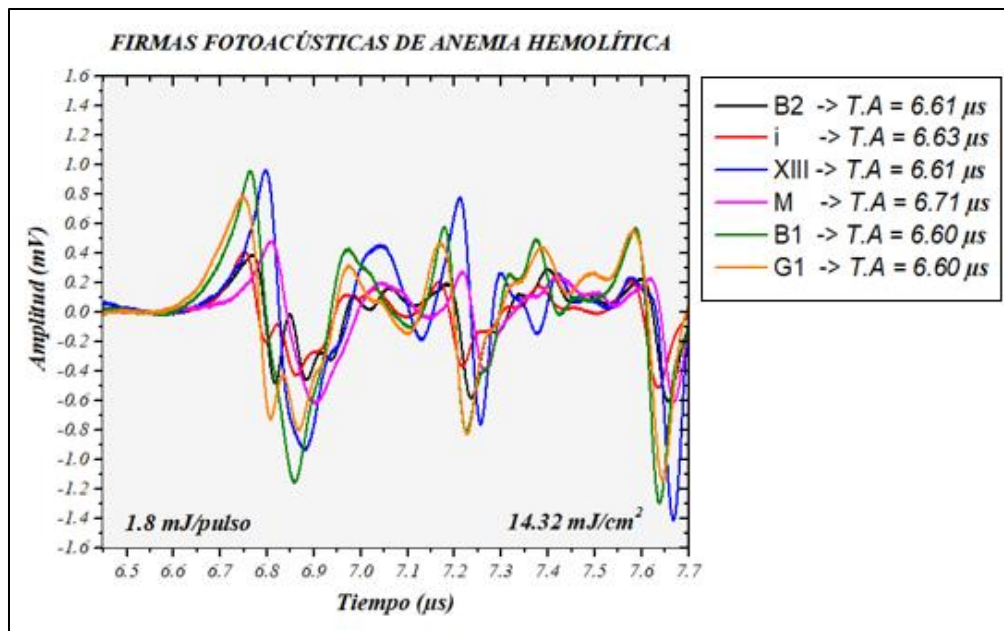


Figura 41. Gráfica del tiempo de arribo de las señales fotoacústicas de anemia hemolítica tomadas con el sensor 1.

Como puede verse existe, en general, un aumento en el tiempo de arribo de las señales de anemia con respecto al tiempo de arribo de las señales de sangre sana, esto implica que se está presentando una menor velocidad del sonido. Recordemos que la anemia hemolítica se caracteriza por una disminución en la cantidad de eritrocitos presentes en la sangre, lo que implica una disminución en la densidad de las células y como consecuencia el viaje de la onda de sonido a través de la muestra es más lento (Figura 42).

Propagación del sonido en muestras con diferentes densidades

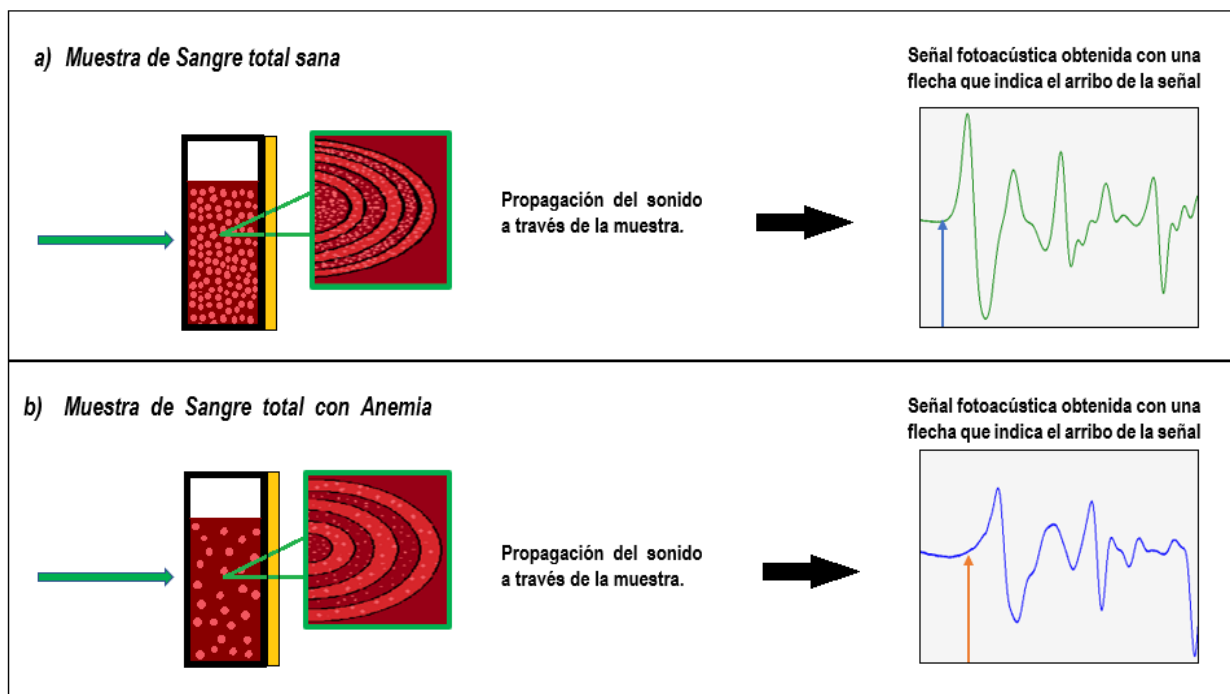


Figura 42. Se describe la velocidad de propagación de la onda sonora, para dos medios con distintas densidades, después de la incidencia del láser:

- a) En el caso de la sangre total sana, vemos que la velocidad de propagación de la onda sonora es mayor dada la densidad de las partículas eritrocitarias que permite un mayor intercambio de energía porque éstas se encuentran más cerca.
- b) En el caso de la sangre total con anemia hemolítica se observa una velocidad de propagación más lenta dado que la densidad de partículas eritrocitarias disminuye y por tanto el intercambio de energía es menor pues se encuentran más separadas.

Otra observación importante en la Figura 36 es que las señales no parecen seguir el mismo patrón como en el caso de las señales de sangre sana. Hay que recordar que como se describió en la sección 4.2 en medicina las anemias se clasifican por fisiopatología y por morfología, en este caso consultando

la información de las biometrías que fueron proporcionadas por el área de hematología se destacan además diferencias morfológicas de tamaño en los eritrocitos (véase *Tabla 15*).

Tabla 15. Clasificación morfológica en tamaño de los eritrocitos [23]

Anomalías en el tamaño de los eritrocitos	
<p>De acuerdo al tamaño promedio de los glóbulos rojos (VCM) presentes en la sangre se tendrán tres tipos de anomalías</p>	<p>Microcítica: en una anemia microcítica el VCM es menor a 80 fl, lo que significa que los eritrocitos serán más pequeños de lo normal con un diámetro inferior a 6.5 μm.</p> <p>Normocítica: En una anemia normocítica el VCM estará entre 80-100 fl, lo que significa que los eritrocitos serán de tamaño normal, con un diámetro normal de 6.5 a 9.0 μm.</p> <p>Macrocítica: En una anemia Macrocítica el VCM será mayor a 100 fl, lo que significa que los eritrocitos serán más grandes de lo normal con un diámetro superior a 9.0 μm.</p>

Relacionando la información de la *Tabla 15* con los valores VCM obtenidos de las biometrías de cada muestra y complementando con las observaciones producto del análisis de frotis, se identificó lo siguiente:

Tabla 16. Datos de la biometría hemática de las muestras estudiadas, donde;

- a) (+) indica que hasta el 25% de la población de células del frotis presenta variación en tamaño.
 b) (++) indica que hasta el 50% de la población de células del frotis presentan variación en tamaño.

Datos de las biometrías de cada muestra				
	Intervalo 80.4/95.9	Observaciones en frotis		
Muestra	VCM (fl)	Observaciones en frotis		
M	77.1	Anisocitosis+		
G1	94.3	Anisocitosis++		Macroцитos++
XIII	57.2	Anisocitosis+	Microцитos++	
B2	115.4	Anisocitosis+		Macroцитos+
i	109.1	Anisocitosis+		Macroцитos+
B1	76.8		Microцитos++	

En la *Tabla 16* se muestran los datos recopilados de la biometría de cada muestra, en primer lugar se tiene que el valor VCM para las muestras M, XIII y B1 está por debajo de los 80fl, lo que estaría

dando un indicio de que se tiene una anemia microcítica, es decir, el tamaño de los eritrocitos es menor al promedio de los eritrocitos normales, por el contrario, las muestras *B1* e *i* poseen un VCM mayor a 100 fl, lo que probablemente correspondería a una anemia macrocítica, finalmente respecto a la muestra *G1* el valor VCM se encuentra dentro del intervalo normal, es decir, el tamaño de los eritrocitos se encuentra dentro del rango normal (6.5 -9.0 μm de diámetro), correspondería a una anemia normocítica.

Sin embargo, la información del valor VCM no es suficiente para discriminar con precisión las diferencias morfológicas presentes en las células, por ello adicionalmente a los resultados que arroja la biometría hemática los médicos/técnicos examinan una muestra bajo un microscopio mediante frotis de sangre periférica. Esta técnica suele ser más exacta que las tecnologías automatizadas para reconocer alteraciones estructurales de los eritrocitos, a partir de estas observaciones se determinan variaciones generales (en caso de existir) en el tamaño, la forma e incluso la coloración de los elementos que conforman la sangre. Si bien es cierto que las observaciones de frotis son una estimación, son importantes dado que, la existencia de anomalías en una pequeña cantidad de muestra, es representativa de los mismos cambios en toda la sangre.

En la primera columna de la *Tabla 16*, se encuentra el término “Anisocitosis”, este es un término que significa que derivado de la observación en microscopio se han encontrado variaciones generales en tamaño en las células eritrocitarias, es decir, se observaron células de tamaño normal, pequeñas y grandes. Aclarado esto se procede a analizar las observaciones generales de cada muestra;

Análisis para las muestras con VCM < 80fl

- ***Muestra M:*** De acuerdo con las observaciones se tiene una variación en tamaño de los eritrocitos en el 25% de la muestra, dado que el valor VCM es menor a 80 fl, se puede concluir que los tamaños de eritrocitos que más abundan en la muestra son los microcitos, por lo que se confirma que se tiene una anemia microcítica.
- ***Muestra XIII:*** De acuerdo con las observaciones se tiene una variación en tamaño de los eritrocitos en el 25% de la muestra, pero se observa particularmente que en un 50% de la

muestra existe la presencia de microcitos, es decir, hay más microcitos que células de otros tamaños. El valor VCM esté por debajo de los 80fl, por lo que se confirma que se tiene una anemia microcítica.

- **Muestra B1:** De acuerdo con las observaciones se tiene particularmente que en un 50% de la muestra existe la presencia de microcitos, es decir, hay más microcitos que células de otros tamaños. Es por eso que tiene sentido que el valor VCM esté por debajo de los 80fl, por lo que se confirma que se tiene una anemia microcítica.

Análisis para la muestra con VCM dentro del rango normal de 80 fl a 100 fl

- **Muestra G1:** De acuerdo con las observaciones se tiene una variación en tamaño de los eritrocitos en el 50% de la muestra y además particularmente se identifica que en ese 50% existe la presencia de macrocitos. Esta observación es muy importante porque, aunque el valor del VCM de esta muestra está dentro del rango normal con 94.3 fl, se puede ver que está casi en el límite del rango y justo podría deberse a la contribución de los macrocitos en la muestra. Así que se podría considerar a esta muestra como una anemia macrocítica.

Análisis para las muestras con VCM > 100 fl

- **Muestra B2:** De acuerdo con las observaciones se tiene una variación en tamaño de los eritrocitos en el 25% de la muestra, pero se observa particularmente que en el 25% de la muestra existe la presencia de macrocitos, es decir, hay más macrocitos que células de otros tamaños. Es por eso que tiene sentido que el valor VCM de la muestra este sobre los 80fl, por lo que se confirma que se tiene una anemia macrocítica.
- **Muestra i:** De acuerdo con las observaciones se tiene una variación en tamaño de los eritrocitos en el 25% de la muestra, particularmente en el 25% de la muestra existe la presencia de macrocitos, es decir, hay más macrocitos que células de otros tamaños. Es por eso que tiene

sentido que el valor VCM esté sobre los 80fl, por lo que se confirma que se tiene una anemia macrocítica.

De acuerdo con el análisis anterior las muestras se reagruparon según el tamaño de los eritrocitos, graficándose como que se observa en las Figuras 43 y 44.

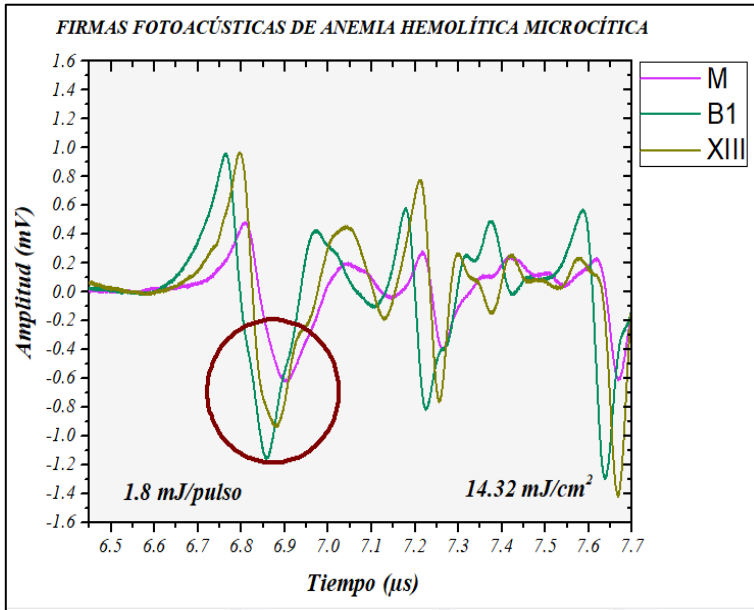


Figura 43. Señales fotoacústicas obtenidas de anemia hemolítica microcítica.

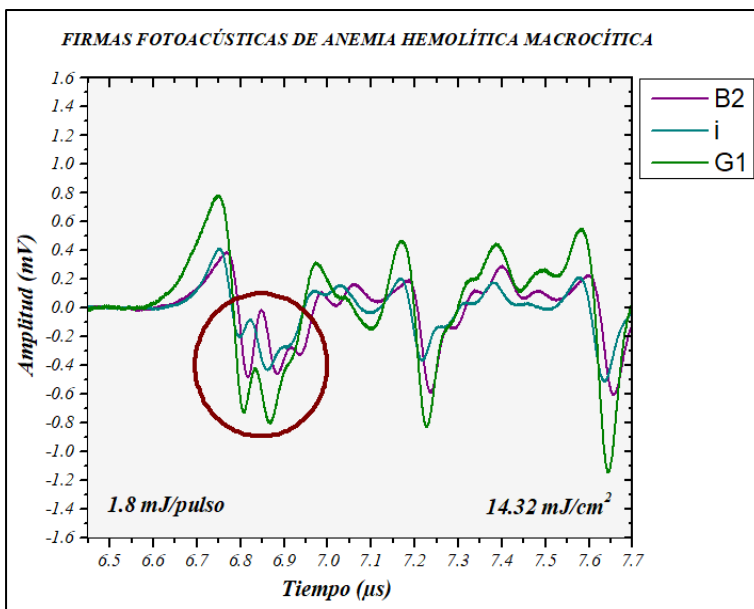


Figura 44. Señales fotoacústicas obtenidas de anemia hemolítica macrocítica.

Como puede verse en las Figuras 43 y 44, al realizar la clasificación de las anemias hemolíticas con respecto a la morfología eritrocitaria se pueden apreciar características-particulares en la señal de cada

grupo: la primera diferencia destacable es que en las señales de anemia macrocítica a diferencia de la microcítica, después del primer pico, se presenta en el valle una especie de “w”, señalada con un círculo en la *Figura 43*, esta oscilación podría estar asociada a los choques que sufre la onda acústica con las partículas, en este caso, los eritrocitos, cuyos tamaños varían entre sí. Es probable que ocurra una resonancia al interior de la muestra cuando las partículas aumentan su tamaño (en algunos casos puede ser un aumento del doble de su tamaño normal), lo que produce esta oscilación.

Hay que recalcar que las señales fotoacústicas incluyen toda la información relacionada con los cromóforos absorbedores, pero también influyen el tamaño y la distribución de las partículas que se encuentran en la muestra, todo ello define la forma final que tendrá la señal fototérmica y esto puede verse con la muestra G1 que a pesar de poseer un VCM de 94.3fl que está dentro del rango normal, este se encuentra en el límite por la presencia de macrocitos en la muestra, cosa que como puede verse afecto la forma final de la señal.

Si bien es cierto que la sangre es un fluido que está conformado por diferentes partículas (células), se considera que los eritrocitos están dando mayor contribución a la forma final de la señal, así los cambios en las señales fotoacústicas que se presentan en las *Figuras 43 y 44*, se atribuyen a la característica propia que presenta cada caso que es el tamaño de los eritrocitos.

Finalmente, se puede concluir que existe una correlación entre la amplitud de la señal fotoacústica y los niveles de hemoglobina de cada sujeto, de manera que, para las anemias hemolíticas, donde la cantidad de hemoglobina es menor con respecto a la sangre de personas sanas, las señales disminuyen en amplitud, por otro lado, se confirmó que el tamaño de las partículas, específicamente el de los eritrocitos modifica los patrones de estas señales. Por lo tanto, la forma, tamaño y distribución de las partículas es lo que determina la señal fotoacústica que corresponde con el viaje del sonido a través de la muestra.

6.3 Análisis de sangre con Leucemia

Se midieron un total de 7 muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia, proporcionadas por el laboratorio de hematología del Hospital General de México, de este total se analizaron 6 muestras y se descartó una ya que la señal fotoacústica no era clara. Haciendo uso del software *OriginPro*, se graficaron los datos de las 6 señales fotoacústicas obtenidas las cuales se muestran en la *Figura 45*.

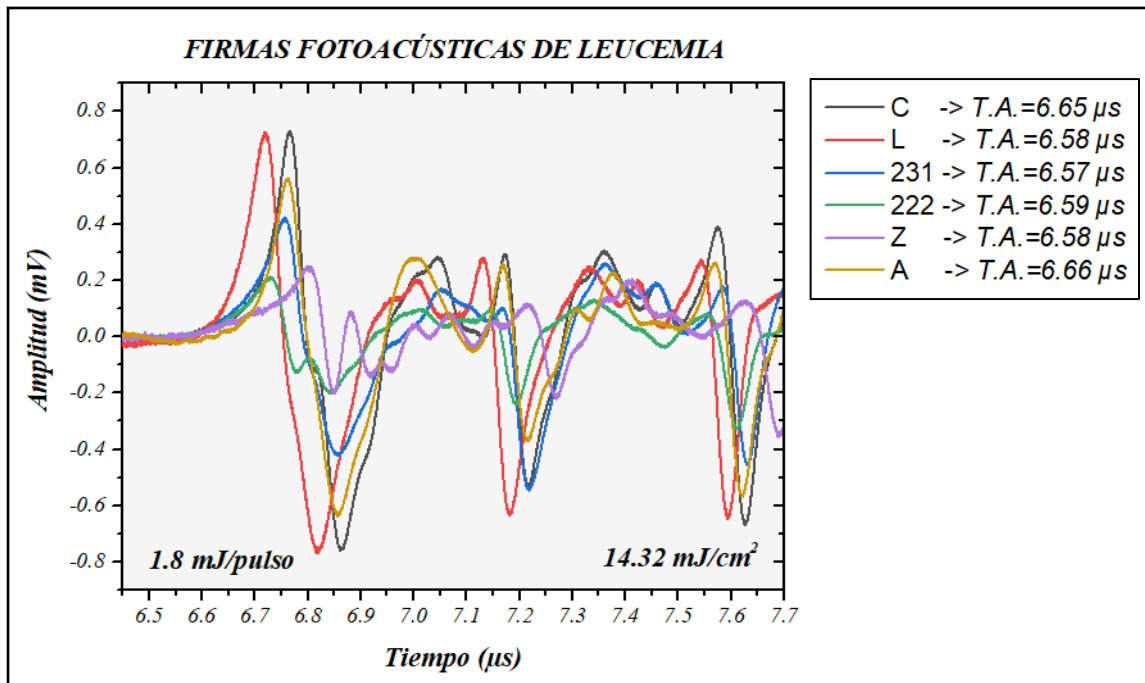


Figura 45. Gráfica de señales fotoacústicas obtenidas de sangre de sujetos diagnosticados con leucemia.

Se sabe que la forma de la señal fotoacústica está determinada por el tamaño y la morfología de las partículas, en la leucemia una de las características principales es la elevada cantidad de leucocitos, así que es de esperarse que el efecto de esta distribución es lo que estaría determinando la forma final de la señal.

En la *Figura 45* se presentan las señales fotoacústicas obtenidas de muestras de sangre de pacientes diagnosticados con leucemia, se observa que las señales de cada muestra varían unas de otras, tanto en amplitud y forma como tiempo de arribo. En este caso, no se ha encontrado un patrón

característico de la leucemia puesto que cada señal es diferente entre sí, a diferencia de los observado en las muestras de sangre sana en las que se encontró una firma fototérmica asociada a esta condición.

A pesar de que se cuenta con el diagnóstico y las biometrías hemáticas, hay que tener en cuenta que las señales fotoacústicas contienen toda la información referente a la muestra, tanto por la cantidad de cromóforos absorbedores como de los que no absorben, la morfología e interacción que resulten de las diferentes células y compuestos de la sangre por lo cual hace difícil identificar específicamente de qué manera se está afectando la forma de la señal fotoacústica en presencia de los leucocitos.

A modo de ilustración y para complementar las conclusiones expresadas anteriormente, en la *Figura 46* se presentan las señales fotoacústicas de muestras asociadas a: sangre sana, anemia hemolítica macrocítica y microcítica, se añade también una señal fotoacústica de la leucemia a fin de observar cómo se ve afectada la señal debido a la presencia de los leucocitos en combinación con la morfología e interacción de las diferentes células y compuestos de la sangre. Además, se presenta la *Tabla 17* con los valores correspondientes a la cantidad de eritrocitos, hemoglobina y leucocitos asociados a cada condición.

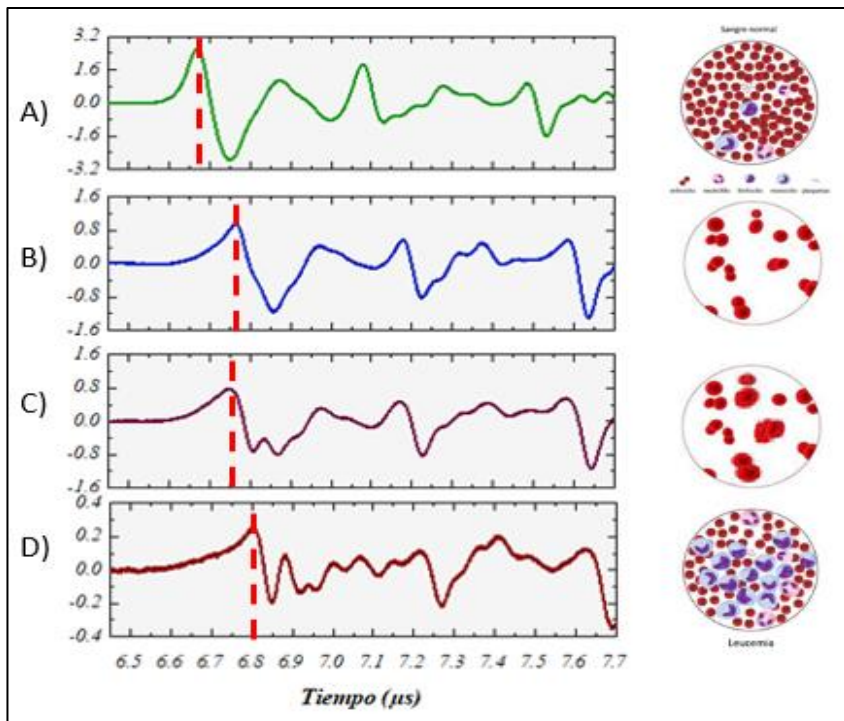


Figura 46. Datos de la biometría hemática y gráficas de las señales asociadas a:

- a) Sangre sana
- b) Anemia hemolítica con microcitos,
- c) Anemia hemolítica con macrocitos
- d) leucemia.

Alado de cada gráfica se visualiza la cantidad de células eritrocitarias de acuerdo a cada condición.

Tabla 17. Valores correspondientes a la cantidad de eritrocitos, hemoglobina y leucocitos asociados a cada condición.

	Eritrocitos	Hemoglobina	Leucocitos
Muestra	4-6.2	11.7-18.1	4.5-11.0
	$\times 10^6$ p/μl	$\times 10^6$ p/μl	$\times 10^3$ p/μl
A) 309750	5.42	17.1	5.1
B) B1	3.19	8.4	7.1
C) G1	2.69	8.3	3.5
D) Z	1.97	6.3	52.8

Se puede apreciar como la amplitud del primer máximo de la señal va disminuyendo según la gráfica, iniciando en sangre sana, hemolítica y con leucemia, mientras que los valores de voltaje obtenidos para la muestra de sangre sin ninguna patología se encontraron entre -3.2 y 3.2 mV para las anemias se redujo a valores entre -1.6 a 1.6 mV y para la leucemia de -0.4 a 0.4 mV, además se puede apreciar como el tiempo de arribo también va cambiando para cada condición.

Como meta a futuro se pretende realizar un análisis más minucioso de estas señales, apoyándonos de información más detallada e instrumentación que ayude a proporcionar una mayor información sobre lo que se está encontrando, sin embargo, para los fines establecidos para esta investigación basta con mostrar que como se ha visto en las gráficas de la *Figura 46*, la presencia de alteraciones en cantidad o forma de los componentes de la sangre debido a enfermedades patológicas está modificando por completo la forma, la amplitud e incluso el tiempo de arribo de la señal fotoacústica resultante.

6.4 Análisis de áreas de las señales fotoacústicas

Después de analizar las señales según la patología y observar que la forma de la señal se ve modificada principalmente por el contenido de hemoglobina y cantidad de células, una manera de poder cuantificar diferencias de las señales completas es mediante el valor absoluto del área bajo la curva, así al calcular el área se espera poder distinguir diferencias estadísticas entre las señales en función de la patología.

Con fines estadísticos y debido a que no se contaba con el mismo número de muestras por condición, se procedió a realizar el análisis de un total de 18 muestras: 6 de sanos, 6 de anemia hemolítica y 6 de leucemia. El intervalo de tiempo de la señal sobre el cuál se realizó el análisis del área absoluta bajo la curva fue el siguiente: [6.56 a 15] μs aproximadamente, para anemia hemolítica fue de [6.59 a 15] μs aproximadamente, para leucemia fue de [6.60 a 15] μs aproximadamente (Figura 47 y 48). Esta sección corresponde al intervalo en el que se encuentra la señal completa, detectada por el sensor piezoeléctrico, para cada condición. Una vez establecido este intervalo, haciendo uso de una herramienta del programa *Originpro*, se obtuvo el valor absoluto del área para cada señal, estos resultados se analizaron con el programa de análisis estadístico SPSS.

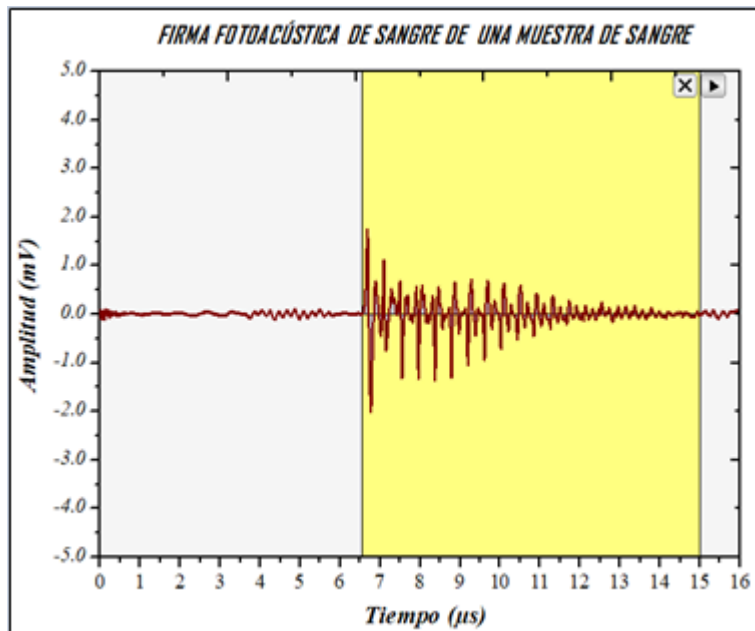


Figura 47. Se ilustra el intervalo de tiempo aproximado tomado para el cálculo del área bajo la curva de las señales fotoacústicas, de las distintas patologías estudiadas.

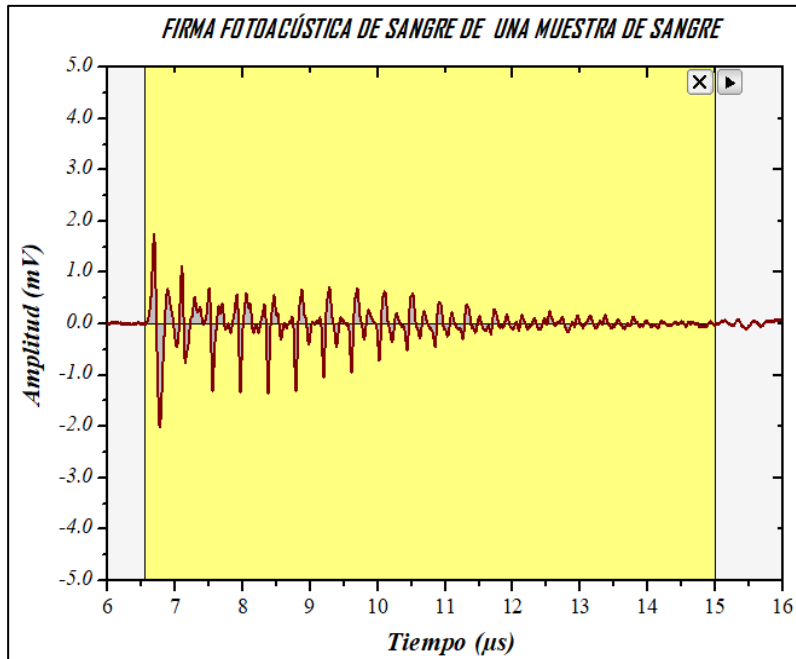


Figura 48. Se muestra una toma más cercana del intervalo de tiempo aproximado tomado para el cálculo del área bajo la curva de las señales fotoacústicas, de las distintas patologías estudiadas.

Con el programa SPSS [35][36], se aplicó una prueba paramétrica, en este caso un análisis de varianza (ANOVA) para muestras independientes, con el objetivo de realizar comparaciones entre los grupos de patologías que se estudiaron e identificar si existían diferencias significativas entre ellos. Hay que recordar que para aplicar la prueba ANOVA de un factor, se deben cumplir 2 supuestos fundamentales: normalidad y homocedasticidad (varianzas iguales), así que lo primero que se realizó fue una prueba de normalidad a los datos del área bajo la curva de los grupos de patologías.

Los resultados de estas pruebas se muestran a continuación;

Tabla 18. Se muestran los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Prueba de normalidad

		Shapiro-Wilk ^c		
		Estadístico	gl	Sig. (p)
Áreas bajo la curva	anemia	.890	6	.320
	leucemia	.909	6	.428
	sanos	.881	6	.275

* Existe significancia al nivel p mayor a 0.05

Dado que el tamaño de la muestra es menor a 30, se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk cuyo resultado se muestra en la *Tabla 18*, para poder interpretar estos resultados se hizo el siguiente análisis de contraste de hipótesis;

H_0 : Los datos del área bajo la curva se aproximan a la distribución normal

H_a : Los datos del área bajo la curva no se aproximan a la distribución normal

Se acepta la hipótesis nula H_0 si el valor de significancia $p \geq 0.05$, por el contrario, si el valor de significancia $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna H_a .

Como puede apreciarse en la *Tabla 18*, los valores de significancia para sanos, anemia hemolítica y leucemia resultan mucho mayores al nivel de significancia establecido del 0.05, lo que indica que se acepta la hipótesis nula que establece que la distribución de la variable “área bajo la curva” es igual a la distribución normal.

Probada la distribución normal de los datos, se decidió aplicar una prueba paramétrica, en este caso un análisis de varianza (ANOVA) para muestras independientes, esta prueba se aplicó para realizar comparaciones entre los grupos de patologías que se estudiaron e identificar si existían diferencias significativas entre ellos. Se consideraron significativas las diferencias a $p < 0.05$, los resultados de esta prueba se muestran a continuación;

Tabla 19. Se muestran los resultados del análisis de varianza ANOVA.

Prueba ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Inter-grupos	.000	2	.000	15.740	.000
Intra-grupos	.000	15	.000		
Total	.000 ^a	17			

.^aExiste significancia al nivel p menor a 0.05

Los resultados de la prueba ANOVA que se muestran en la *Tabla 19*, fueron interpretados haciendo el siguiente análisis de contraste de hipótesis;

H₀: Las medias poblacionales son iguales

H_a: Al menos dos medias poblacionales son distintas

Se acepta la hipótesis nula H_0 si el valor de significancia $p \leq 0.05$, por el contrario, si el valor de significancia $p > 0.05$ se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna H_a .

En la *Tabla 19* puede observarse que el nivel de significancia p que se está obteniendo es mucho menor al nivel de significancia establecido del 0.05, lo que significa que se rechaza la hipótesis nula H_0 y se acepta la hipótesis alterna H_a , que indica que al menos dos medias poblacionales son distintas, es decir, se están encontrando diferencias significativas entre las áreas bajo la curva de las señales fototérmicas de las patologías estudiadas. Sin embargo, hasta este momento no se sabe exactamente entre qué grupos de patologías se da esta diferencia y entre cuales no, es por ello que una vez que se determinó que existía esta diferencia, se realizó una prueba de rango post hoc la cual se encargó de hacer comparaciones múltiples entre los grupos estudiados y permitió conocer que patologías específicamente difieren entre sí.

Se concluyó que la prueba *post hoc* más adecuada era la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa), dado que esta prueba realiza un análisis estadístico de los datos más general, es conveniente utilizarla en principio porque se está trabajando con pocas muestras, solo 18, 6 por cada patología, para una prueba más robusta, por ejemplo Bonferroni, es preferible que el número de muestras por grupo sea mayor ya que el tratado de los datos es más minucioso, la tasa de error está más controlada, etc. Nuevamente se consideraron diferencias significativas a $p < 0.05$, los resultados de la prueba DMS se muestran a continuación:

Tabla 20. Se muestran los resultados de la prueba post hoc DMS.

Prueba post hoc DMS
Comparaciones múltiples

(I) Clasificación	(J) Clasificación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (p)
Sano	Anemia Hemolítica	5.064E-010 [*]	2.033E-010	.025
	Leucemia	1.138E-009 [*]	2.033E-010	.000
Anemia Hemolítica	Sano	-5.064E-010 [*]	2.033E-010	.025
	Leucemia	6.318E-010 [*]	2.033E-010	.007
Leucemia	Sano	-1.138E-009 [*]	2.033E-010	.000
	Anemia Hemolítica	-6.318E-010 [*]	2.033E-010	.007

*. Existe significancia al nivel p menor a 0.05

La *Tabla 20*, muestra los resultados de comparaciones múltiples que se hicieron, entre las patologías estudiada, iniciando con la interpretación de esta tabla se observa lo siguiente;

La primera columna muestra todas las posibles combinaciones dos a dos entre los grupos de patologías, posteriormente se muestran las diferencias entre las medias del área bajo la curva de cada dos grupos, se sigue con el error típico de esas diferencias y finalmente se llega a la columna que presenta el valor de significancia p, que junto con el análisis de medias refleja si existe o no una diferencia entre las patologías comparadas, esto se interpreta haciendo un análisis de contraste de hipótesis;

H₀: Las áreas bajo la curva no son distintas

H_a: Las áreas bajo la curva son distintas

Se acepta la hipótesis nula H₀ si el valor de p es mayor al valor de significancia establecido de 0.05, si por el contrario el valor p es menor al valor de significancia establecido se acepta la hipótesis alterna H_a.

Observando al primer grupo comparado (Sanos vs anemia hemolítica y leucemia), se encuentra que los valores de p obtenidos son 0.025 y < 0.05, valores menores al valor de significancia establecido, lo que lleva a concluir que se acepta la hipótesis alterna H_a que establece que las medias del área de las patologías de anemia hemolítica y leucemia son diferentes al área del grupo de sanos. El mismo caso

se tiene con el segundo grupo comparado (Anemia Hemolítica vs sanos y leucemia), dado que los valores de p obtenidos son 0.025 y 0.007, valores menores al valor de significancia establecido, nuevamente se acepta la hipótesis alterna H_a concluyéndose que las área de Leucemia y sanos son diferentes al área del grupo de la patología de anemia hemolítica.

Gracias al análisis de varianza ANOVA se sabía que existían diferencias entre las patologías, sin embargo, los resultados anteriormente expuestos han mostrado específicamente que las áreas bajo la curva de la señal fotoacústica de un paciente sano y de pacientes disgnosticados con anemia hemolítica o leucemia son diferentes entre sí. A modo de ilustración de los resultados anteriores se realizó la gráfica de barras y bigotes que se muestra en la *Figura 49*, así como un pequeño análisis de la misma.

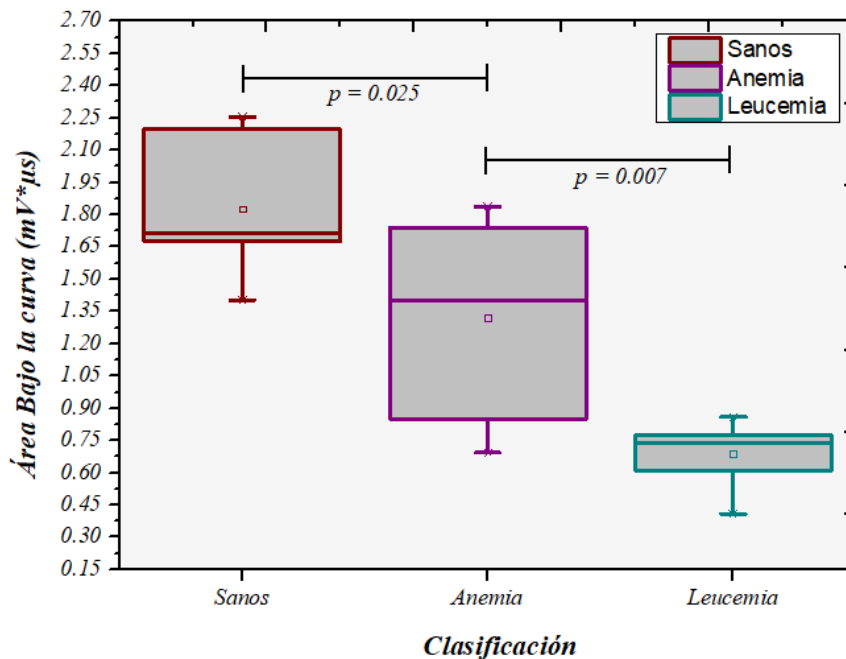


Figura 49. Gráfica de barras y bigotes en los que se ilustran los resultados encontrados asociados al área bajo la curva de la señal fotoacústica en función de las patologías estudiadas: Sangre sana, Anemia hemolítica y leucemia.

De la *Figura 49* a primera vista llaman la atención las medias de los diagramas de Sanos, Anemia hemolítica y leucemia ya que puede notarse que ninguna posee el mismo valor; para sanos se observa una mediana de 1.71×10^{-09} , para anemia hemolítica es de 1.40×10^{-09} y para leucemia de 7.38×10^{-10} . Esto nos indica que existe una diferencia importante del área bajo la curva de las señales fotoacústicas

de cada patología, con condiciones de medición iguales y controladas. Otro dato importante es el valor del rango intercuartil, para sanos es de 6×10^{-10} mientras que para las patologías de anemia hemolítica y leucemia es de 9.48×10^{-10} y 2.34×10^{-10} respectivamente, estos resultados nos ayudan a concluir que para sujetos sanos el área bajo la curva de la señal fotoacústica es mayor que para sujetos diagnosticados con anemia hemolítica y leucemia y además que la leucemia es la patología que posee menor área bajo la curva.

Finalmente, del análisis anterior se puede concluir que, aunque se asocia el primer máximo de amplitud de las muestras al principal cromóforo absorbedor, que en este caso es la hemoglobina, las diferencias estadísticas que encontramos no solo nos hablan de los niveles de hemoglobina presentes en la muestra, sino también están relacionadas con las características clínicas particulares de cada patología. Recordemos que lo que la señal fotoacústica está mostrando es una gráfica que contiene en su totalidad la información de los componentes de la sangre, así las diferencias estadísticas encontradas también están relacionadas con otros factores, como son en el caso de la anemia hemolítica, la disminución del número de eritrocitos pero también la variación del tamaño o coloración del mismo que estaría afectando de alguna manera la absorción de la muestra, tal como se ve en la *Figura 49*, presentando un valor menor al área de un sujeto donante sin ninguna alteración hematológica.

Para el caso de la leucemia al analizar las diferencias estadísticas de las áreas de las señales PA se observó que, en general, había una notoria disminución de la amplitud, esto llevo a realizar un análisis adicional con la biometría hemática, la cual arrojó que las muestras de leucemia presentan una disminución de eritrocitos y hemoglobina, incluso en mayor medida que las muestras de anemia. Esta disminución de acuerdo con la literatura se debe a que las células cancerígenas impiden la producción de glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos saludables. La leucemia provoca una proliferación anormal de leucocitos en la sangre, aunque no se sabe con exactitud como afecta la presencia de leucocitos a la señal fotoacústica debido a que no absorben la luz con la que se irradia, cambios considerables en la densidad pueden provocar interacciones con los eritrocitos modificando la señal e incluso afectando de alguna forma la absorción de la muestra que se traduce en un cambio en el viaje

de la onda de sonido al interior de la muestra, de ahí que el área total como se observa en la *Figura 49*, presente una diferencia estadística notable entre una muestra de un sujeto donante y de un paciente con anemia hemolítica.

CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación el objetivo principal fue demostrar que la técnica fotoacústica puede ser una herramienta complementaria en el campo de la medicina, particularmente para el estudio de biofluidos, en este caso al estudio de muestras de sangre total de sujetos sanos, de personas con diagnóstico de anemia hemolítica y leucemia.

Dentro del análisis experimental se encontraron resultados muy interesantes, en primer lugar, se lograron identificar las señales fototérmicas características de sujetos sanos, además realizando una clasificación de las señales por sexo, se encontró que los tiempos de arribo de las señales de mujeres en promedio fue de $(6.59 \pm 0.01) \mu s$ y de hombres en promedio fue de $(6.56 \pm 0.01) \mu s$. Por otro lado, trabajar con patologías como anemia hemolítica fue complicado pues es difícil encontrar un patrón, porque las señales fotoacústicas cargan consigo mucha información que se ve reflejada por el tipo de muestra que se tiene, sin embargo, a pesar de ello fue posible identificar diferencias y características entre anemia microcítica, macrocítica. En el caso de la leucemia se convirtió en una tarea aún más complicada, dadas sus características no fue posible asociar un patrón, pues todas las señales fotoacústicas obtenidas eran distintas, variando unas de otras en amplitud, forma y tiempo de arribo, pero gracias a esto y a las observaciones realizadas en las otras patologías se confirmó que la alta densidad de las células blancas al interactuar con las células rojas al interior del plasma determinan la forma final de la señal fotoacústica obtenida.

Respecto a los tiempos de arribo de las señales obtenidas cabe destacar que para cada patología se encontraron variaciones importantes: para sangre de sujetos sanos se observó un tiempo entre (6.56 ± 0.01) y $(6.59 \pm 0.01) \mu s$, para la anemia entre $(6.60 a 6.71) \mu s$ y para la leucemia entre $(6.59 a 6.65) \mu s$. Como se ve, existe un aumento en el tiempo de arribo de las señales de anemia y leucemia con respecto al tiempo de arribo de las señales de sangre sana, esto implica que se está presentando una menor velocidad del sonido, resultado de la disminución en la densidad de las muestras.

También se logró corroborar que existe una correlación entre la hemoglobina y la amplitud de la señal fotoacústica, es decir entre mayor cantidad de hemoglobina posea la muestra estudiada, mayor amplitud tendrá la señal y viceversa. Es por esto que se encuentra una mayor amplitud en la señal de muestras de sujetos sanos que en muestras de sujetos diagnosticados con anemia hemolítica e incluso que en muestras de sujetos diagnosticados con leucemia puesto que las células cancerígenas también afectan la producción de eritrocitos y por ende los niveles de hemoglobina bajan.

Logró observarse también que particularmente entre las señales fotoacústicas de sujetos sanos, existe una diferencia de amplitud del primer máximo cuando las señales se dividen por sexo, este resultado es sobresaliente porque se sabe por la literatura que los niveles de hemoglobina en hombres son mayores que en mujeres en aproximadamente un 12%. Para comprobar este hecho realizando un análisis RMS se obtuvo que el porcentaje de diferencia entre las señales de hombres con respecto a las de mujeres fue del 27.12%; se hace hincapié en que la señal fotoacústica contiene no solo la información de la hemoglobina sino de la totalidad de la sangre por lo que es probable que la diferencia porcentual haya salido tan grande debido a la contribución de los otros elementos presentes en la misma, sin embargo, se confirma que existe una diferencia marcada por la cantidad de hemoglobina entre las muestras de hombres y mujeres, y que además esta distinción está siendo visualizada en las señales fotoacústicas obtenidas.

Finalmente, con fines estadísticos se realizó un análisis del área bajo la curva de toda la señal detectada por el sensor piezoeléctrico de 18 señales fotoacústicas, de las cuales 6 correspondían a sujetos sanos, 6 a sujetos con diagnóstico de anemia hemolítica y 6 con diagnóstico de leucemia. Las diferencias estadísticas encontradas fueron: 0.025 para sanos vs anemia hemolítica, <0.05 para sanos vs leucemia y 0.007 para anemia hemolítica vs leucemia, estos resultados reflejan que la técnica fotoacústica pudo distinguir cambios en la señal, encontrando que las tres patologías muestran diferencias entre sí. Estas diferencias se atribuyen a las características clínicas particulares de cada patología, como son en primer lugar la cantidad de eritrocitos y hemoglobina, entre otros factores se destaca también la coloración y tamaño de los eritrocitos debido a la macrocitosis y microcitosis presente específicamente en las muestras de anemia hemolítica. La señal de leucemia provoca una

proliferación anormal de leucocitos en la sangre, aunque no se sabe con exactitud como afecta la presencia de leucocitos a la señal fotoacústica debido a que no absorben la luz con la que se irradia, cambios considerables en la densidad pueden provocar interacciones con los eritrocitos modificando la señal e incluso afectando de alguna forma la absorción.

Como trabajo a futuro se pretende ampliar este proyecto de investigación en el campo de la medicina, trabajando con un número mayor de muestras que permita aumentar el tamaño de muestra para realizar un análisis estadístico más exhaustivo. Por otro lado, se desea trabajar con otros biofluidos como por ejemplo el plasma e incluso con células o biopsias, pues quedo demostrado que la técnica fotoacústica funciona y es lo suficientemente sensible como para visualizar notorias diferencias entre las señales fotoacústicas obtenidas de distintas muestras, aunado a esto se destaca que una de sus mayores ventajas es que es un método no invasivo, de tal manera que puede ser de apoyo al ser utilizada como un sistema de diagnóstico.

REFERENCIAS

- [1] J. P. J. L. Lomelí Mejía P.A., Castellanos Ábrego N.P., Méndez González M.M., Cruz Orea A., “Aplicaciones biofísicas de la fotoacústica,” *Investigación en discapacidad*, vol. 1, no. 2, México, pp. 90–94, 2012.
- [2] M. Kinnunen and R. Myllylä, “Frequency spectrum analysis of pulsed photoacoustic signals in Intralipid,” Sep. 2007, p. 702215, doi: 10.1117/12.804103.
- [3] S. Manohar and D. Razansky, “Photoacoustics: a historical review,” *Adv. Opt. Photonics*, vol. 8, no. 4, p. 586, Dec. 2016, doi: 10.1364/AOP.8.000586.
- [4] E. Marin, “Escuchando la luz: breve historia y aplicaciones del efecto fotoacústico,” vol. 2, no. 2, pp. 209–215, 2008.
- [5] C. L. and M. Groth, “BIBLIOGRAPHY OF EARLY OPTICAL (AUDIO) COMMUNICATIONS,” Jun. 2005. <http://www.bluehaze.com.au/modlight/ModLightBiblio.htm>.
- [6] A. G. Bell, “On the production and reproduction of sound by light,” *Am. J. Sci.*, vol. s3-20, no. 118, pp. 305–324, Oct. 1880, doi: 10.2475/ajs.s3-20.118.305.
- [7] A. G. Bell, “THE PRODUCTION OF SOUND BY RADIANT ENERGY,” *Science (80-.)*, vol. os-2, no. 49, pp. 242–253, May 1881, doi: 10.1126/science.os-2.49.242.
- [8] Y. Liu, L. Nie, and X. Chen, “Photoacoustic Molecular Imaging: From Multiscale Biomedical Applications Towards Early-Stage Theranostics,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 5, pp. 420–433, May 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.001.
- [9] A. P. Pacheco, “Síntesis y caracterización fotoacústica de películas delgadas,” UNAM, 2009.
- [10] Q. S. R.M., “Estudio fotoacústico y óptico de LiNbO3: Nd3+ :MgO Monocristalino,” UNAM, 2009.
- [11] “Piezo film sensors, Technical Manual.” Measurement Specialties Inc, p. 86, 2008.
- [12] J. M. J.M., *Pregrado de Hematología*, 4°. Luzán, 2017.
- [13] O. T. R. C. D. Lázaro Lázaro, “Obtención de energía eléctrica por medio de piroeléctricidad,” IPN, México, 2016.
- [14] “LDT1-028K Piezo Sensor.” TE connectivity, p. 2, Jun. 2017.
- [15] M. Heijblom *et al.*, “The state of the art in breast imaging using the Twente Photoacoustic Mammoscope: results from 31 measurements on malignancies,” *Eur. Radiol.*, vol. 26, no. 11, pp. 3874–3887, Nov. 2016, doi: 10.1007/s00330-016-4240-7.
- [16] F. L. F. D. Silveira, P. R. Barja, and D. Acosta-Avalos, “Photoacoustic evaluation of the penetration of piroxicam gel applied with phonophoresis into human skin,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 214, pp. 1–5, Mar. 2010, doi: 10.1088/1742-6596/214/1/012022.

- [17] O. S. A. (Q.F.B.), *Atlas de hematología, con interpretación de histogramas y escatergramas*, 1°. Buenos Aires, Argentina: EC, 2002.
- [18] D. G. A. José Carlos Jaime Pérez, "Hematología, la sangre y sus enfermedades," 2° edición., Mc. Graw Hill, 2009, pp. 17–19.
- [19] P. L. C. Ulloa Rosero B., Tapia Cadena M., Toscano Gallardo C., *Fundamentos de hematología*. Quito, Ecuador: Editorial EDIMEC, 2017.
- [20] "Tabla: hemograma completo," *Manual Merck, versión para público general. Proveedor confiable de información médica desde 1899*. [En línea]. https://www.merckmanuals.com/es-us/hogar/multimedia/table/v12857021_es#.
- [21] "Serología," [En línea]. Disponible en: <https://sh-sci.org/serologia/>.
- [22] P. M. M. Maria de los Angeles Martínez Vázquez, "Anemias, Información Epidemiológica," *Gaceta Médica México*, vol. 134, no. 4, pp. 495–500.
- [23] F. J. y S. G. F. M. San Miguel, "Hematología, Manual básico razonado," 3° edición., Barcelona, España: ELSEVIER España, 2009, pp. 25–28.
- [24] J. A. Lozano, "Síndrome anémico," *ELSEVIER, OFFARM*, vol. 21, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2002.
- [25] C. M. Germán, "Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos," *Med. Lab.*, vol. 14, no. 7–8, pp. 311–357, 2008.
- [26] "Anemia Hemolítica." [En línea]. Disponible en: <http://eclinicalworks.adam.com/content.aspx?productid=39&pid=5&gid=000571>
- [27] J. A. C. Hidalgo, "Síndrome de anemia hemolítica (Revisión bibliográfica)," *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*, no. 583, pp. 85–90, 2008.
- [28] J. José Ortega, "Anemias hemolíticas," *An. Pediatria Contin.*, vol. 2, no. 1, pp. 12–21, Jan. 2004, doi: 10.1016/S1696-2818(04)71614-5.
- [29] A. K. Parpart, P. B. Lorenz, E. R. Parpart, J. R. Gregg, and A. M. Chase, "The osmotic resistance (fragility) of human red cells" *Journal of Clinical Investigation*, vol. 26, no. 4, pp. 636–640, Jul. 01, 1947.
- [30] M. A. Paleari R., "Controversies on the osmotic fragility test," *CIRME, Dept. Science and Biomedical Technology University of Milano, Milano*, Milano, p. 3, Sep. 2008.
- [31] L. J.A., "Leucemias agudas," *ELSEVIER, OFFARM*, vol. 21, no. 6, pp. 117–122, Jun. 2002.
- [32] V. V. P. Monrroy Hurtado Rafael, Estrada Solano Braulio, "Leucemia para el médico general," *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, vol. 55, no. 2, pp. 11–25, 2012.
- [33] U. of M. Ashkan Emadi , MD, PhD and U. of M. Jennie York Law , MD, "Generalidades sobre las leucemias," *Manual MSD versión para profesionales. Proveedor confiable de información médica desde 1899*, 2018. [Online]. <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/hematología-y-oncología/leucemias/generalidades-sobre-las-leucemias>.
- [34] F. B. Rodak, "Hematología, Fundamentos y aplicaciones Clínicas," 2° edición., Buenos Aires: Editorial Médica

Panamericana, 2004, pp. 3–8.

- [35] V. L. A. Guisande González Castor, Barreiro Felpeto Aldo, Maneiro Estraviz Isabel, Riveiro Alarcón I., Vergara Castaño Alba Ruth, *Tratamiento de Datos*. España: Ediciones Díaz de Santos, 2006.
- [36] B. F. A. Guisande González C., Vaamonde Lise A., *Tratamiento de datos con R, Estadística y SPSS*, Ediciones. España, 2013.
- [37] Y. Lin, Y. Huang, G. Wang, T.-R. J. Tzeng, and D. B. Chrisey, “Effect of laser fluence on yeast cell viability in laser-assisted cell transfer,” *J. Appl. Phys.*, vol. 106, no. 4, p. 043106, Aug. 2009, doi: 10.1063/1.3202388.
- [38] B. A. Fernández *et al.*, *El láser, la luz de nuestro tiempo*. 2010.
- [39] C. W. A. R. J. F. Agreda Delgado, “Estudio fotoacústico de los efectos del tiempo de ablación en la síntesis de nanopartículas de plata,” *Revista ciencia y tecnología*, vol. 12, no. 1, pp. 17–26, 2016.
- [40] J. N. Agreda-Paredes, J. F. Agreda-Delgado, and C. W. Aldama Reyna, “Fotoacústica pulsada aplicada a la determinación de umbrales de ablación láser en metales,” *MOMENTO*, no. 59, pp. 49–65, Jul. 2019, doi: 10.15446/mo.n59.75831.
- [41] A. M. Gacia, Mario J y Ardila, “La variación del volumen celular bajo diferentes concentraciones de solución salina (NaCl),” *Revista Colombiana de Anestesiología*, vol. 37, no. 2, pp. 106–109, 2009.
- [42] “Fundación cardioinfantil. Manual de toma de muestras.” Bogotá (Colombia), 2003.
- [43] “BD Diagnósticos sistemas preanalíticos. Recolección de muestras de sangre venosa, arterial y de orina,” vol. 1, no. 1, pp. 8–18, 2012.

ANEXO

Fluencia

Se debe tener en cuenta que la radiación láser pulsada sobre una muestra puede generar ondas elásticas de dos tipos: aquellas que involucran una modificación sobre la muestra irradiada (régimen de ablación) y las que no dañan ni modifican la muestra (régimen termoelástico o expansión termoelástica) [37][20] [38][39][40].

En esta tesis se trabajó en el régimen termoelástico donde la interacción láser-materia que involucra la transferencia de energía por medios ópticos no dio lugar a la sublimación y/o vaporización de la muestra. Por lo tanto, los valores de fluencia o densidad de potencia fueron mínimos a fin de evitar la remoción o ablación del material, es decir, sin dañar las células.

Considerando lo anterior, se realizó un barrido de bajas energías, con lo cual se buscó obtener una energía óptima que permitiera una visualización clara de las señales fotoacústicas. Con el barrido de energías se determinó que 1.8 mJ/pulso que corresponde a una fluencia de 14.32 mJ/cm² era una energía adecuada para estar en el régimen termoelástico y tener una buena señal fotoacústica para su posterior análisis. Además, como un plus para demostrar que la incidencia constante del láser a esta energía no afectaba de ninguna manera a las células de la sangre se realizó el siguiente experimento; se observó el efecto de la incidencia del láser en la muestra en función del tiempo, para verificar que no existían cambios en la forma de la señal fotoacústica, y por ende no se estaba dañando muestra (ver *Figura 1*).

En la *Figura 1* se observa el monitoreo sobre la muestra, iniciando con un registro de la señal desde los 0 min y a continuación registrando la señal por cada minuto, hasta llegar a 5 min, manteniendo la incidencia del láser constante.

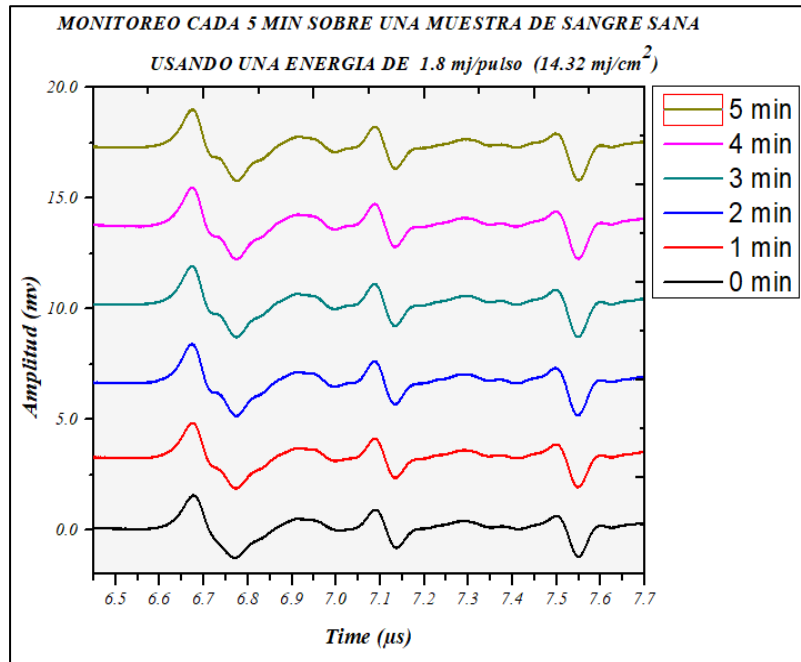


Figura 1. Gráfica del monitoreo de una muestra de sangre cada 5 min

Como puede apreciarse en la gráfica no existen cambios en forma de la señal fotoacústica en los primeros 5 minutos y por tanto la fluencia aplicada de 14.32 mJ/cm² no daña ni cambia las células.

Se verificaron los resultados de este experimento, realizando este procedimiento otras 3 veces obteniendo el mismo comportamiento, además, mediante un análisis de sangre por frotis de eritrocitos visualizados en el microscopio óptico, la membrana celular seguía intacta antes y después de la irradiación laser.