



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ELÉCTRICA– INSTRUMENTACIÓN

RELACIÓN DEL PATRÓN ANGULAR DE ESPARCIMIENTO DE CÉLULAS
SANGUÍNEAS CON SU MORFOLOGÍA Y SU UTILIDAD CLÍNICA EN EL
DIAGNÓSTICO MÉDICO.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

TUTOR (ES) PRINCIPAL(ES)
DR. AUGUSTO GARCÍA VALENZUELA, ICAT-UNAM
DR. ROBERTO MÁRQUEZ ISLAS, UIDT - HGM “Dr. Eduardo Liceaga”

MÉXICO, CDMX., agosto 2022



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Sandoval Romero Gabriel Eduardo.

Secretario: Dr. Rodríguez Herrera Oscar Gabriel.

1er. Vocal: Dr. García Valenzuela Augusto.

2do. Vocal: Dr. Pérez Pacheco Argelia.

3er. Vocal: Dr. Márquez Islas Roberto.

TUTORES

Atentamente.

Atentamente.

Dr. Augusto García Valenzuela

TUTOR

Dr. Roberto Márquez Islas

TUTOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores: al **Dr. Augusto García Valenzuela** y al **Dr. Roberto Márquez Islas** por el apoyo, tiempo, dedicación y ser la guía durante la realización de este proyecto.

Así mismo quisiera agradecer al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de mi querida *alma máter* la UNAM, por permitirme llevar a cabo mi proyecto de maestría en la parte teórica dirigida por el Dr. Augusto García. Quisiera también agradecer al laboratorio de la UIDT-ICAT que se encuentra en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, por darme la oportunidad de realizar el trabajo experimental dirigido por el Dr. Roberto Márquez.

Mi agradecimiento se hace extensivo a la **Dra. Argelia Pérez Pacheco** que se encuentra en la UIDT-ICAT del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, por ser el apoyo incondicional y guía durante la formación de mi carrera profesional.

De igual manera, quiero agradecer al laboratorio de Hematología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Ya que con su autorización e intervención, se me proporcionaron las muestras de células sanguíneas, para realizar la investigación propuesta.

Agradezco también, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número CVU: 1086545, por el apoyo brindado durante los dos años de maestría.

DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres: **Magdalena I. Chávez** y **Francisco A. Álvarez**, por ser mi parte motora, mi impulso y el motivo para seguir con mi preparación profesional, así como hacerme ver que todo lo que me proponga lo puedo lograr. Mamá: gracias por pasar desvelos conmigo y dejarme maravillarte con mis pláticas de física; Papá: gracias por hacerte presente, aconsejando a través de libros o canciones. Los amo infinitamente.

A mis queridos hermanos: **Berenice, Francisco, Edgar y Jorge**, por brindarme sus consejos y motivación para seguirme preparando, gracias por tolerar mis innumerables ausencias en reuniones, me siento afortunada de tenerlos en mi vida, espero esta estafeta del saber se la den a sus hijos, mis queridos sobrinos.

A ti, mi querida “Científica” (**María de la Luz Chávez**), fuiste el impulso más grande en esta etapa de mi vida profesional, te dedicó este logro y donde quiera que estés, sé que me estás esperando con la bata y mi café. Mi amada abuelita.

A **Vidblain Prieto** por las charlas académicas llenas de emoción, por tus consejos tan certeros, por tu enorme paciencia en los momentos difíciles y por la ayuda incondicional. Mil gracias por tu presencia en mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN.

1. INTRODUCCIÓN. -----	1
1.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN. -----	2
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. -----	3
1.3 OBJETIVO. -----	3
1.3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS. -----	4
1.4 JUSTIFICACIÓN Y ALCANCE. -----	4
2. MARCO TEÓRICO. -----	5
2.1 PATRÓN DE ESPARCIMIENTO EN UNA MONOCAPA. -----	5
2.2 APROXIMACIÓN DE DIFRACCIÓN ANÓMALA (ADA). -----	7
2.3 SANGRE Y COMPONENTES. -----	7
2.4 PATOLOGÍAS DE LA SANGRE. -----	11
3. MODELO MATEMÁTICO PARA APOYO DE INTERPRETACIÓN DEL PATRÓN DE ESPARCIMIENTO. -----	17
3.1 DESCRIPCIÓN DEL CAMPO ESPARCIDO POR UNA PARTÍCULA. -----	17
3.2 PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UNA ESFERA. -----	19
3.3 PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UN ERITROCITO. -----	26
3.4 PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UN ELIPSOIDE. -----	28
3.5 PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UN DISCO. -----	29
4. DISPOSITIVO PROPUESTO PARA MEDIR EL PATRÓN DE ESPARCIMIENTO. -----	31
4.1 COMPONENTES DEL SISTEMA ÓPTICO. -----	31
4.2 METOLOGÍA. -----	33
4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS. -----	34
4.3.1 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS. -----	34
4.3.2 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO UTILIZANDO DISTINTOS TAMAÑOS. -----	35
4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS (ERITROCITOS). -----	36
4.4.1 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS SANAS. -----	37
4.4.2 MONOCAPA POR SOLUCIONES OSMÓTICAS. -----	37
4.4.3 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON ANEMIA. --	39
5. RESULTADOS. -----	40
5.1 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES. -----	40
5.2 PÉRFIL DE INTENSIDAD Y PATRÓN DE ESPARCIMIENTO DE MONOCAPAS. -----	42
5.2.1 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS. -----	42
5.2.2 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS UTILIZANDO DISTINTOS TAMAÑOS. -----	44

5.2.3	MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS SANAS. -----	47
5.2.4	MONOCAPA POR SOLUCIONES OSMÓTICAS. -----	48
5.2.5	MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON ANEMIA. --	50
6.	CONCLUSIONES. -----	53
	BIBLIOGRAFÍA. -----	55

RESUMEN

En este trabajo se presenta un arreglo experimental óptico y la metodología empleada para medir el patrón de esparcimiento producido por una monocapa de células sanguíneas. Se describe una técnica simple para obtener la imagen de la proyección de la luz esparcida en una pantalla. El procesamiento de la imagen del esparcimiento se realiza utilizando un programa escrito en MATLAB, el cual permite determinar la morfología y tamaño de éstas. Para describir el esparcimiento de la monocapa, así como obtener un patrón teórico y el perfil de intensidad característico para cada muestra, se utilizó un modelo matemático basado en la Aproximación de Difracción Anómala (ADA).

La motivación de este trabajo es proponer técnicas de prediagnóstico médico simples, con el potencial de desarrollar instrumentos portátiles para el monitoreo en casa del estado de células sanguíneas de un paciente, durante el tratamiento y recuperación de distintas patologías.

Para demostrar la viabilidad de la técnica propuesta, se presentan los resultados del patrón de esparcimiento de monocapas de: 1) partículas de poliestireno rojas con $10\ \mu m$ y $5\ \mu m$ de diámetro y 2) células de eritrocitos de donadores sanos con diámetro de $8\ \mu m$ y eritrocitos de pacientes con diagnóstico de anemia con un diámetro aproximado de $6\ \mu m$; proporcionados por el Laboratorio de Hematología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

Debido a que los eritrocitos contienen en su interior moléculas de hemoglobina, las cuales funcionan como cromóforos absorbedores y esparcidos de luz, pueden producir un patrón de esparcimiento al hacerles incidir un haz de luz con una longitud de onda cuando son depositados en monocapa. Considerando que son células bicóncavas de dimensiones de 6 a $9\ \mu m$, pueden determinarse patologías a partir de alteraciones en su tamaño y forma, tales como: anisocitosis (combinación de eritrocitos grandes y pequeños), microcitosis (eritrocitos más pequeños de lo normal menores a $6\ \mu m$) y

macrocitosis (eritrocitos más grandes de lo normal, mayores a $9 \mu m$). Este tipo de patologías podrían ser prediagnosticadas y llevar un monitoreo a partir de los patrones de esparcimiento de una monocapa de eritrocitos. Por esta razón es importante estudiar el patrón de esparcimiento de monocapas de eritrocitos. En esta tesis se buscó una correlación entre este patrón observado y patologías como la anemia, específicamente en este trabajo nos enfocamos en la anemia ferropénica.

1 INTRODUCCIÓN

La interacción de la luz con materiales complejos, depende de la microestructura y forma macroscópica del material [1-3], por lo que la luz esparcida en un material complejo con forma macroscópica simple y conocida, da información sobre su microestructura interna. El proponer metodologías que usen la interacción de la luz como sensor, actuando en tejidos biológicos para obtener información sobre las células abre una ventana para las aplicaciones a la biomedicina.

A pesar de los grandes avances tecnológicos relacionados con el análisis en sangre, el método de frotis o extendido de sangre y su inspección visual bajo el microscopio, sigue siendo el estándar de oro para la evaluación de distintas condiciones hematológicas de las células sanguíneas, con este método se puede observar alteraciones relacionadas con la morfología de los constituyentes de la sangre como, por ejemplo: eritrocitos, leucocitos y plaquetas [4-6].

Una técnica muy utilizada en la actualidad para el estudio de células basada en fenómenos ópticos, como el fenómeno de esparcimiento de la luz, es el citómetro de flujo. Con esta técnica es posible determinar el tamaño de la célula y la concentración de la hemoglobina, para distinguir entre eritrocitos sanos y los que presenten patologías que cambian su morfología. Debido a que la señal de esparcimiento está relacionada con el ángulo de esparcimiento, se puede asociar fácilmente con el tamaño y la morfología de los objetos esparcidos, en este caso con el tamaño y forma de los eritrocitos, por lo tanto, para estudiar este tipo de sistemas es importante desarrollar modelos teóricos que los describan y puedan complementarse con el análisis experimental [7,8].

La importancia de desarrollar sistemas ópticos en los cuales se pueda profundizar, ampliar y sistematizar el estudio del esparcimiento de luz para análisis de células, en este caso en monocapa, para el prediagnóstico médico,

es de sumo interés para la realización de este trabajo. Así como desarrollar nuevas tecnologías y generar un nuevo conocimiento en la adquisición y análisis del patrón de esparcimiento.

1.1. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN.

En las referencias [9, 10] se mostró que la transmisión de luz colimada a través de una monocapa desordenada de partículas de dióxido de titanio y alúmina polidispersa depositadas en un portaobjetos de vidrio, puede dar información de la morfología y composición de las mismas. En particular, en la referencia [10] se estudió el caso específico de una monocapa de partículas desordenadas análogas a células biológicas, sobre una superficie plana. Sin embargo, en esos trabajos solo se consideró la luz transmitida colimada, también conocida como la componente coherente de la luz esparcida. No se analizó el caso de la luz difractada o esparcida por una monocapa para obtener la información de la morfología promedio de las partículas. Teniendo el caso de una monocapa de células donde la luz esparcida está confinada a un cono, con un ángulo de abertura pequeño; típicamente del orden de unos cuantos grados, hace que la medición del patrón de la luz esparcida sea relativamente sencilla. Se han reportado varios trabajos en los que se mide la luz esparcida por eritrocitos en suspensión (ver por ejemplo [11-14]). No conocemos trabajos en los que se haya caracterizado la morfología de células sanguíneas depositadas al azar en una monocapa y que a partir de la luz esparcida por la monocapa se obtenga conocimiento de su morfología. En este trabajo se propone una técnica para evaluar parámetros promedio de la morfología de células sanguíneas por esparcimiento de luz en una monocapa aleatoria como herramienta auxiliar para el prediagnóstico médico haciendo uso de un haz de luz. Nuestra visión o una cámara CMOS (semiconductor de óxido metálico complementario) de un teléfono celular, pueden funcionar como un sensor óptico simple para la evaluación del patrón del patrón de esparcimiento de una monocapa de partículas o células sanguíneas (eritrocitos) y obtener información de su composición y morfología. Abriendo la posibilidad de desarrollar un dispositivo

portátil para monitorear en casa la evolución de una patología que afecte a las células sanguíneas.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como se mencionó anteriormente, existen distintas técnicas de análisis clínico para determinar la morfología y la estructura de las células, en especial para patologías como la anemia; algunas de estas técnicas se llevan a cabo utilizando instrumentos ópticos como el microscopio óptico y la citometría de flujo [4]. La morfología y el número de partículas son características que permiten identificar anomalías en las células, con base en esto continuamente están desarrollándose nuevos métodos a bajo costo que contribuyan para un análisis clínico y complementen las técnicas de hoy en día. En esta tesis se propone un sistema óptico que, a partir del patrón de esparcimiento de partículas depositadas en monocapa permita obtener información útil para el prediagnóstico clínico y en específico para analizar la anemia ferropénica, dejando abierta la posibilidad de extender este trabajo al análisis del patrón de esparcimiento en muestras de sangre de pacientes con otro tipo de anemias (talasemia, aplásica o falciforme).

1.3. OBJETIVO.

A pesar de los grandes avances tecnológicos relacionados con el análisis en sangre. El análisis por frotis o extendido de sangre sigue siendo el estándar de oro para la evaluación de las distintas condiciones hematológicas. El análisis se lleva a cabo visualmente, observando bajo el microscopio óptico alteraciones relacionadas con la morfología de las células sanguíneas [6]. Por esta razón, se tiene por objetivo diseñar un sistema óptico que ofrezca de manera rápida y simple, información sobre el tamaño y morfología promedio de las células sanguíneas, a partir del patrón de esparcimiento producido por una monocapa de éstas.

1.3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la configuración ideal, así como la cantidad requerida para observar el patrón de esparcimiento por una monocapa.
- Estimar el límite de detección del sistema.
- Identificar diferencias entre pacientes sanos y con anemia
- Establecer las bases para desarrollar modelos matemáticos del esparcimiento de luz, para las distintas morfologías que pueden tener las células utilizando el método de Aproximación de Difracción Anómala (ADA) como guía para interpretar las mediciones experimentales.

1.4. JUSTIFICACIÓN Y ALCANCE.

El método de frotis para identificar la morfología de los eritrocitos en patologías como la anemia, sigue siendo uno de los más usados debido a su simplicidad, pero dado que es un método muy subjetivo debido a que el análisis depende del experto del laboratorio que realiza la prueba de manera manual, lo que puede producir una variación en los resultados. Con base en estas observaciones y para mejorar el análisis en la morfología de los eritrocitos con el propósito de apoyar al prediagnóstico médico, se sugiere la medición del patrón de esparcimiento producido por una monocapa. Teniendo como finalidad que este método sea rápido, confiable y certero para poder determinar anomalías en la morfología promedio de los eritrocitos. La motivación es disponer de un método que pudiera aplicarse en el consultorio o la casa de un paciente, para prediagnosticar y dar seguimiento a pacientes que tengan alguna patología como la anemia.

2. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se desarrollarán teóricamente los principios físicos para modelar el comportamiento del patrón de esparcimiento producido por una monocapa de partículas o de células sanguíneas utilizando la Aproximación de Difracción Anómala (ADA), así como la descripción de las propiedades físicas de la sangre, sus componentes y sus distintas patologías, para correlacionarlo con el patrón de esparcimiento.

2.1. PATRÓN DE ESPARCIMIENTO EN UNA MONOCAPA

Para entender el concepto de esparcimiento es importante visualizar de manera atómica la materia, cuando un haz de luz incide sobre medios densos un gran número de partículas dan lugar a un número igualmente de ondas electromagnéticas esparcidas, estas ondas se superponen e interfieren entre sí [1,18].

Refiriéndose a partículas esféricas existen dos tipos de esparcimiento, los cuales se diferencian por el tamaño de la partícula, el primero es para partículas menores a la longitud de onda incidente y es descrito por la Teoría de Rayleigh y el segundo es para partículas mayores que la longitud de onda incidente descrito por la Teoría de Mie [1,2]. Ambas estudian la interacción de una onda electromagnética con partículas, su diferencia radica en un parámetro adimensional llamado parámetro de tamaño [7, 15]:

$$\alpha = \frac{\pi D_p}{\lambda} . \quad (1)$$

Dónde πD_p es la circunferencia de la partícula, con D_p = su diámetro y λ = longitud de onda de la radiación.

En el caso de que este parámetro sea menor que la unidad, se aplicará el modelo de Rayleigh, siendo habitual $D_p < \frac{\lambda}{10}$ (se considera un dipolo) [7]. Cuando α se aproxima a la unidad y $D_p > \frac{\lambda}{10}$, se tiende a usar el modelo de Mie (se considera un conjunto de múltiplos que originan ondas parciales). Sin embargo, con valores muy elevados estos, dejan de ser eficientes y se aplican las leyes de la óptica geométrica [1,7].

Ambos modelos se basan en la teoría ondulatoria, de manera que su objetivo es dar solución a las ecuaciones de Maxwell, sin embargo, el principal inconveniente, como se mencionó al principio, es que son aplicables solamente a esferas isotrópicas, para medios con superficies irregulares se utilizan métodos de elementos finitos para resolver las ecuaciones. Por otro lado, considerando que las partículas son mayores que la longitud de onda incidente, se van a originar diferencias de fase, espaciales y temporales, entre dichas ondas, de esta forma cuando se superponen para formar una onda secundaria dispersada, aparecen interferencias que dependen de la longitud de onda incidente, del tamaño y del índice de refracción de la partícula, por eso el interés de estudiar este tipo de fenómenos en una monocapa [7, 11, 15]. Para análisis óptico detallado de una monocapa generalmente se aplican modelos matemáticos teóricos, tales como la Teoría de Mie o la Aproximación de Difracción Anómala (ADA). En este proyecto se utilizó la teoría de ADA para realizar el análisis de la monocapa de sangre propuesta [12, 15].

Desde un punto de vista óptico las células se pueden visualizar como partículas en un medio homogéneo. Cuando un rayo de luz, es decir, una onda electromagnética incide sobre medios densos; un gran número de moléculas o partículas dan lugar al fenómeno de esparcimiento. Este fenómeno se refiere al cambio de trayectoria que sufre la luz cuando interacciona con un medio cuyas partículas tienen un tamaño mucho menor a la longitud de onda incidente [7, 15]. Para describir este tipo de interacción se considera una onda plana que incide en una película de partículas colocadas al azar, se puede pensar entonces que el esparcimiento de la luz por un conjunto de células consiste en la suma de la luz esparcida por cada una de las células de forma individual, tomando en cuenta la fase relativa de la luz esparcida de cada una de las células, por lo que el campo esparcido por cada partícula es idéntico entre sí, excepto por un factor de fase que depende de la posición de cada partícula en el espacio [19].

2.2. APROXIMACIÓN DE DIFRACCIÓN ANÓMALA (ADA) .

Esta teoría fue presentada en 1957 por el astrónomo holandés van de Hulst, es una aproximación complementaria a la teoría de Mie, permitiendo describir el comportamiento del esparcimiento de luz en esferas ópticamente tenues, es decir, de bajo contraste de índice de refracción, modelando la partícula independientemente de la forma que posea [8, 11, 15], característica que no comparten otro tipo de aproximaciones como el Modelo de Esparcimiento Múltiple (MME) [35], y en las que se toman en cuenta dos condiciones: partículas de bajo contraste, es decir, transparentes y con tamaño mayor a la longitud de onda incidente. Esta teoría es aplicada para esferas isótropas, asumiendo que la partícula es esférica, la expresión del tamaño y la longitud de onda se describen por el parámetro de tamaño (ver expresión (1)), que es el factor fundamental que interviene en el esparcimiento de Mie. Donde a partir del diámetro de la partícula (D_p), la longitud de onda (λ) y asumiendo además que el índice de refracción es real, por lo que no hay absorción, se puede considerar el factor de eficiencia de extinción definiéndolo como la relación entre la sección transversal de extinción (Σ_{ext}) y la sección transversal geométrica, es decir, la suma de las secciones transversales de esparcimiento (Σ_{sca}) y de absorción (Σ_{abs}) [8, 19].

$$\Sigma_{ext} = \Sigma_{sca} + \Sigma_{abs}. \quad (2)$$

Considerando lo anterior para describir el modelo propuesto del patrón de esparcimiento producido por una monocapa, se supondrá una orientación de manera ordenada en el sustrato, tomando como guía una sola partícula para obtener una expresión aproximada para el patrón de esparcimiento.

2.3. SANGRE Y COMPONENTES

La sangre tiene como particularidad ser el único tejido líquido que fluye por el organismo, moviéndose a través de los vasos sanguíneos del sistema circulatorio. Sus principales funciones son: transportar oxígeno y sustancia nutritivas a todo el organismo, está encargada de la hemostasia, es decir, de

mecanismos que permiten que se mantenga fluida dentro de los vasos sanguíneos y en caso de alguna rotura en un vaso sanguíneo, contiene los elementos necesarios para llevar a cabo la coagulación (formación de un tapón para detener la hemorragia y facilitar los procesos de reparación del vaso dañado), de igual manera participa en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico del organismo a través de los eritrocitos los cuales tienen la capacidad de regular los niveles de bicarbonato en el plasma, el cual funciona como un tapón o amortiguador, que mantiene el pH en los valores normales. Finalmente, participa en la regulación de la temperatura corporal, ya que cuando sube la temperatura en el cuerpo, se pierde energía calórica por lo que produce una dilatación vascular y se incrementa con esto el flujo de sangre en la superficie cutánea y en el caso del frío pasa de manera inversa se hace una vasoconstricción, es decir, los vasos sanguíneos se estrechan haciendo que el flujo sanguíneo sea más lento conservando el calor [20, 21]. Está conformada principalmente por dos elementos: **medio acuoso** que es el *plasma* denominado matriz extracelular que contiene sustancias disueltas en un 55% y **elementos formes o células**: *eritrocitos* (glóbulos rojos) en un 45%, *leucocitos* (glóbulos blancos) y fragmentos de células llamados *plaquetas* casi un 1%. En un adulto la cantidad de sangre que se encuentra en su cuerpo es de aproximadamente cinco litros [16,17]. En la Fig. 2.1 se ilustran y señalan las componentes de la sangre.

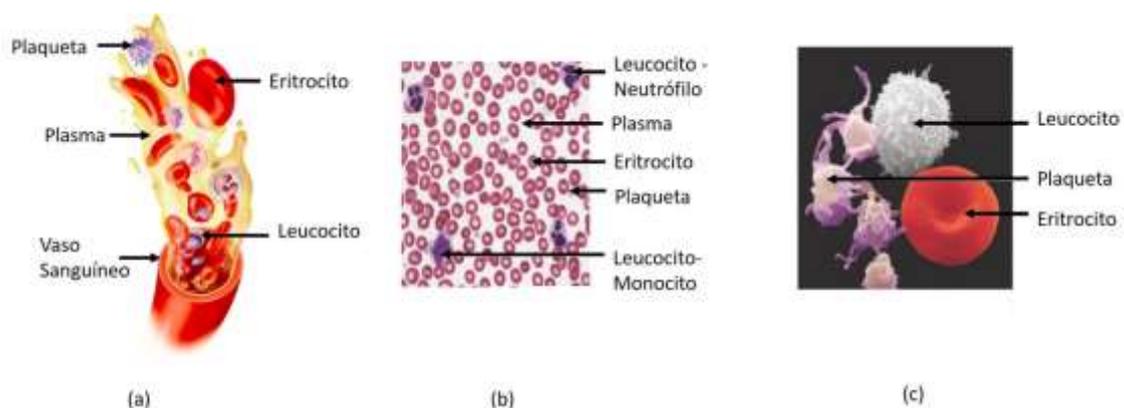


Figura 2.1. (a) Vaso sanguíneo, con componentes de la sangre, (b) frotis o extendido de sangre donde se observan las componentes de la sangre (eritrocitos, leucocitos, plaquetas, plasma) y (c) micrográfica de los elementos corpusculares de la sangre [16,17].

Medio acuoso.

- **Plasma:** componente principal de la sangre que corresponde al 55%, es un líquido amarillento que está compuesto por 90% de agua, 9% de proteínas y 1% de sales, gases disueltos, glucosa, entre otros compuestos. Las proteínas son una parte importante para la conformación del plasma, las cuales están conformadas por: **albumina**, proteína más abundante del plasma producida por el hígado y tiene como función mantener la presión coloidosmótica, es decir, mantener el líquido dentro los vasos sanguíneos y **globulinas**, proteínas producidas por el hígado las cuales se denominan globulinas alfa y beta, estas se encargan del transporte de iones metálicos, vitaminas liposolubles y lípidos. El plasma presenta un medio isotónico para las células, es decir, un medio ideal para que vivan [16,17, 20].

Elementos formes o células.

- **Eritrocitos:** Son células de forma bicóncava que carecen de núcleo, tienen un promedio de vida de 120 a 140 días, miden aproximadamente entre 6 a 9 μm (Fig. 2.2-(a)), 2 μm de espesor en la periferia, 1 μm en su parte central y un volumen de $9 \times 10^{-9} \mu l$ [17, 20]. Están presentes en la sangre de 4.2 a 5.4 $M/\mu l$ en mujeres y de 4.5 a 6.3 $M/\mu l$ en hombres por lo que representa un 45% en la sangre. Tienen como función principal transportar oxígeno (O_2) y la retirada de dióxido de carbono (CO_2) en todo el cuerpo, para cumplir con esta función el eritrocito cuenta con una estructura básica constituida por tres partes que interactúan entre sí: la membrana, la hemoglobina y los componentes no hemoglobínicos; debido a esta constitución de estructura resistente y a su vez flexible, es posible que puedan deformarse sin romperse mientras realizan su recorrido por los vasos capilares sanguíneos [4, 5, 17]. Los eritrocitos contienen alrededor de 280 millones de moléculas de hemoglobina la cual es responsable de darle a la sangre su color rojo y la que transporta la mayor parte de oxígeno. Una molécula de hemoglobina está constituida por una proteína llamada *globina* (compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, es decir, dos cadenas alfa y dos beta); un pigmento no proteico de estructura anular llamado *Hemo* (Fig. 2.2-(b)) unido a cada una de las

cuatro cadenas, en el centro del anillo se puede observar un ion hierro Fe^{2+} que puede combinarse de manera reversible con una molécula de oxígeno (Fig. 2.2-(c)) [16].

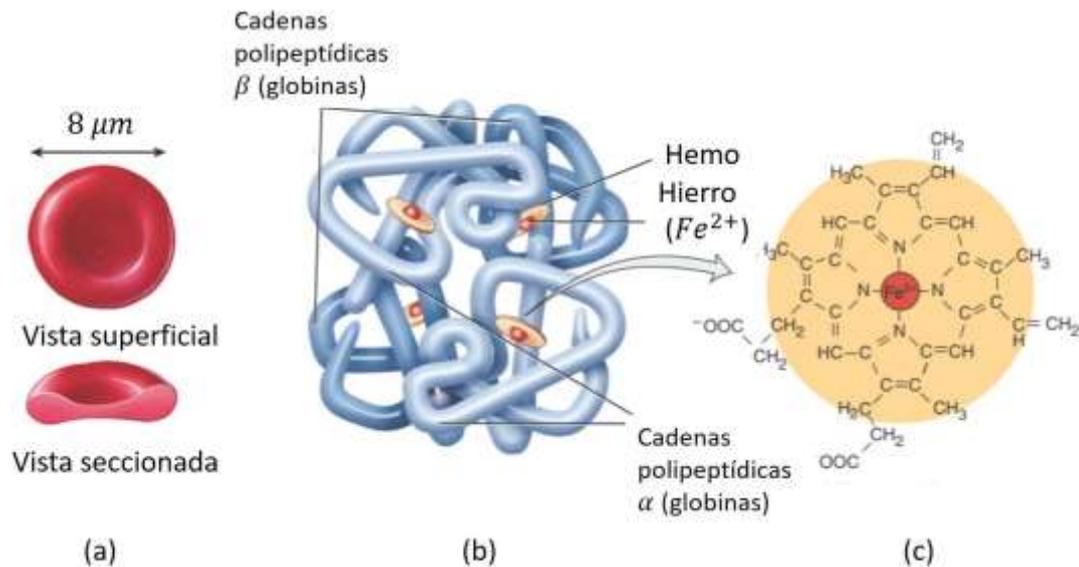


Figura 2.2. (a) Morfología del eritrocito, (b) molécula de hemoglobina y (c) Hemo con hierro [4,16].

- **Leucocitos:** Son células que contienen núcleo, miden aproximadamente entre $10 - 16 \mu m$, se forman en la médula ósea y tienen función en la respuesta inmune para reconocer y neutralizar invasores patógenos (virus y bacterias), conforman menos del 1% en la sangre en una cantidad de 5 a $10 M/\mu l$. Existen dos tipos de leucocitos: los **Granulocitos**, conocidos también como polimorfonucleares, en donde se encuentran los: *Neutrófilos* con un tamaño de $12 - 15 \mu m$ son las más abundantes representando un 60 % del total, tienen un periodo de vida de aproximadamente 48 hrs y son los primeros en reaccionar cuando se presenta alguna infección. *Eosinófilos* con un tamaño de $12 - 17 \mu m$ representan del 1 - 3 %, tienen un periodo de vida de aproximadamente 12 días y son los primeros en reaccionar cuando se presenta alguna infección inflamatoria. Y finalmente los *Basófilos* con un tamaño de $10 - 14 \mu m$, son los de menor cantidad en los leucocitos representan del 0.5 %, y son los primeros en reaccionar cuando se presentan alergias o asma; y los **Agranulocitos** donde se encuentran: *Monocitos* con un tamaño de $12 - 15 \mu m$ representan del 4 - 10%, con un periodo de vida de aproximadamente 3 días, tienen como función principal cuidar y proteger

al sistema inmune de bacterias y virus invasores, se pueden convertir en macrófagos eliminando microorganismos (gérmenes) y células muertas. Y los *Linfocitos* con un diámetro aproximado de 10 – 12 μm , representan del 30% del total, son más comunes en el sistema linfático, tienen como función principal defender al cuerpo contra infecciones, ya que pueden distinguir entre células del propio cuerpo y algún material extraño, produciendo sustancias químicas para destruir ese objeto extraño [16,17].

- **Plaquetas:** También llamadas trombocitos, son fragmentos celulares discoides y sin núcleo, que miden aproximadamente entre 2 a 4 μm , teniendo un papel importante en la participación de la coagulación en la sangre, es decir, en frenar la pérdida de sangre en los vasos sanguíneos dañados, formando un tapón plaquetario. Presentes en la sangre en una cantidad de 150 a 400 $M/\mu l$ tienen un promedio de vida de 8 a 10 días [5, 17].

2.4. PATOLOGÍAS DE LA SANGRE

Algunas de las patologías más frecuentes que se presentan en la sangre son la anemia, leucemia y el mieloma múltiple, todas estas enfermedades se caracterizan por alterar la morfología o el número (incrementando o disminuyendo) de los componentes de la sangre. Muchos de estas patologías son de carácter hereditario, por falta de algún mineral o vitamina y la baja producción de anticuerpos. Este trabajo se enfocará en el estudio de la anemia, siendo más específicos en la ***anemia ferropénica***.

- **Anemia**

La anemia es una patología en la sangre que se caracteriza por la disminución en la hemoglobina, proteína rica en hierro, encargada de transportar oxígeno por todo el cuerpo (*Fig. 2.2.*), si la concentración de hemoglobina cae por debajo de los rangos normales, que en mujeres se encuentra en 15 g/dl y en hombres en 11.6 g/dl , podemos decir que se tiene anemia. Como consecuencia se reduce el número de eritrocitos, por lo que el transporte de oxígeno de los pulmones a

otras partes del cuerpo se ve afectada [4, 6]. Las tres causas principales por las que se puede presentar anemia son: pérdida de sangre, baja producción de eritrocitos y destrucción de éstos a gran velocidad [22]. Algunos de los tipos de anemia son:

Anemia Ferropénica: es la anemia más frecuente en la sangre y tiene como causa principal una poca absorción de hierro, por lo que generará una alteración en la forma del eritrocito, en la mayoría de los casos se presentan de forma esférica (**esferocitosis**) y con tamaño pequeño (**microcitosis**) (*Fig. 2.3.*) [6,16, 22]. El hierro es un micronutriente esencial para el organismo humano, con habilidad para intercambiar electrones, interviene también en el transporte de oxígeno, en la respiración celular, en la síntesis de ADN y en la proliferación celular. Dada su gran capacidad para formar radicales libres, que son tóxicos en la sangre, debe estar siempre unido a proteínas. El déficit de hierro genera el agotamiento de sus reservas y una falta de disponibilidad para los eritroblastos (células precursoras de los eritrocitos), en caso de haber una afectación en estas células, ocasiona anemia ferropénica. La falta de hierro afecta también al desarrollo cognitivo durante la infancia, disminuye la actividad física e intelectual del adulto y su productividad, por lo que el hierro no solo es necesario para la eritropoyesis, sino también para el correcto funcionamiento de los músculos, del corazón, del sistema nervioso central y de otros órganos y tejidos. Considerando todo lo anterior las mujeres suelen ser más susceptibles a este tipo de patología, como consecuencia de la pérdida de sangre menstrual y el incremento en la demanda de hierro del feto en crecimiento durante el embarazo. Otra causa es la pérdida gastrointestinal como sucede por ulceraciones o cáncer [4, 6].

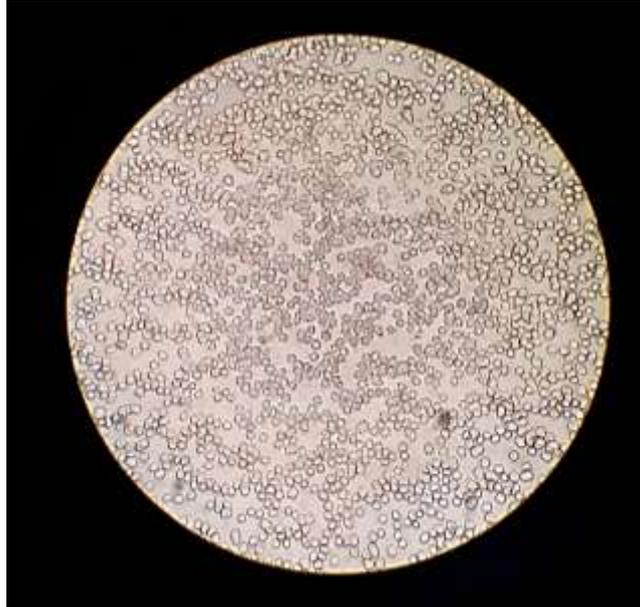


Figura 2.3. Muestra de paciente con anemia ferropénica (Con amplitud 100x).

Anemia por Talasemia: corresponde a un grupo de las anemias hemolíticas, esta se presenta cuando la hemoglobina se sintetiza de manera deficiente, es decir, hay una disminución o ausencia de síntesis en una de las cadenas de globina que forman la Hb (hemoglobina), presentando como característica principal **microcitosis**, es decir, los eritrocitos son pequeños, en forma de diana (**dianocitosis**), tienen hipocromía (pálidos) y son de vida media corta [4, 6]. Este tipo de anemia es por causa hereditaria y está presente principalmente en poblaciones con costas en el mar Mediterráneo [16,17].

Anemia Megaloblástica: se define por una síntesis defectuosa del ADN nuclear, que determina una hematopoyesis megaloblástica caracterizada por: el aumento de tamaño de los precursores de las tres series que afectan al citoplasma, asincronía madurativa nucleocitoplasmática, es decir, los núcleos tardan en madurar y su hematopoyesis es ineficaz con hemólisis intramedular que determina la liberación de LDH (lactatodeshidrogenasa) [22]. Este tipo de anomalía, es causada por la ausencia de ácido fólico y vitamina B₁₂, en la cual la médula ósea produce eritrocitos grandes (**macrocitosis**) y anormales, llamados megaloblastos [4]. Una de las posibles causas de este tipo de anemia es por efecto de consumo de fármacos que alteran la secreción gástrica o los que son utilizados para el tratamiento de cáncer [5].

Anemia Hemolítica: constituyen a un grupo de trastornos cuyo denominador común es el acortamiento de la vida media de los eritrocitos en la circulación sanguínea, ya que tienen un proceso de destrucción acelerada de eritrocitos, denominado hemólisis. Este aumento de eritropoyesis en la médula ósea, provoca que el tamaño de los hematíes sea mayor (**macrocitosis**), originando una salida de sangre periférica de formas no maduras de eritrocitos, por lo tanto, la característica fundamental de este tipo de anemia es presentar una cifra elevada de reticulocitos. La hemoglobina liberada tras la destrucción de los eritrocitos es catabolizada, aumentando bilirrubina e ictericia en la sangre, al ser un proceso tan rápido, la médula ósea no puede reemplazarlos de manera eficaz, provocando daños estructurales de filtración en los riñones [4]. Algunas de las causas de esta enfermedad son por defectos genéticos, por parásitos o anticuerpos provenientes de la transfusión de sangre incompatible [16].

Anemia Aplásica: es el resultado de una lesión en la médula ósea y se produce cuando el cuerpo no puede generar suficientes eritrocitos, es un tipo de anemia poco usual y potencialmente mortal [5, 17]. Es causada por daños al momento del nacimiento, por exposición de radiación (rayos gamma) y ciertos fármacos tóxicos o drogas; que inhiben las enzimas necesarias para la producción de células sanguíneas (hemopoyesis), teniendo como característica eritrocitos de mayor tamaño (**macrocitosis**) [6].

Anemia Falciforme o Drepanocítica: este tipo de anemia es de carácter hereditario ya que contiene Hb-S (hemoglobina S), es un tipo anormal de la hemoglobina y cuando está especie libera oxígeno al líquido intersticial, forma estructuras alargadas y rígidas que arquean a los eritrocitos y éstos toman la forma de hoz (**drepanocitosis**) [5, 17]. Estas células mueren de manera prematura ya que al deformarse se lisan y esta anomalía puede durar entre 10 a 20 días, teniendo como consecuencia escasez crónica de eritrocitos [20, 21].

- **Anomalías en los eritrocitos**

Algunas de las alteraciones de los eritrocitos son provocadas por los distintos tipos de anemia, que pueden alterar la morfología y con su forma, el

tamaño, color y distribución. Este tipo de clasificación tiene una importante utilidad clínica y se basa en cambios característicos que se dan en el tamaño de los eritrocitos y en su contenido de hemoglobina. Un grupo de anemias se caracteriza porque la mayoría de hematíes son más grandes de lo normal ($\approx 10 - 11 \mu m$), se denomina anemias *macrocíticas* en las que se caracterizan anemias como megaloblástica, aplásica, hemolítica o aquellas donde haya un aumento de la eritropoyesis, sin embargo, si la mayoría presenta hematíes de un tamaño menor de lo normal ($< 6 \mu m$) son anemias *microcíticas* en las que se caracterizan la anemia ferropénica y las talasemias. Finalmente cuando los hematíes muestran diferentes tamaños o diámetros en una misma extensión, se refiere a *anisocitosis* [22,23]. De manera esquemática y como resumen se describen en la *Tabla 1.1*.

Tabla 1.1. Anormalidades en los eritrocitos [22,23].

ANOMALÍAS EN LOS ERITROCITOS			
	ALTERACIÓN	DESCRIPCIÓN	
TAMAÑO	Anisocitosis	Eritrocitos de diferentes tamaños en una sola muestra.	
	Microcitosis	Eritrocitos pequeños con un diámetro $< 6\mu m$.	
	Macrocitosis	Eritrocitos grandes con un diámetro $> 9\mu m$.	
FORMA	Dianocitosis	Eritrocito con forma de sui-generis, es decir, en el centro, se encuentra con mayor concentración de hemoglobina. Provocando una forma de diana.	
	Eliptocitosis	Eritrocitos con forma elíptica, área pálida central y con hemoglobina en los extremos.	
	Esferocitosis	Eritrocitos con forma de esfera sin área central pálida.	
	Esquistocitosis	Eritrocitos con formas arbitrarias.	
	Drepanocitosis	Eritrocitos con forma de "hoz" o media luna.	
COLOR	Hipocromía	Eritrocitos con tinción débil, se presenta en anemias por baja concentración en hemoglobina.	
DISTRIBUCIÓN	Roleaux	Eritrocitos ordenados en forma de pilas de monedas, debido a proteínas plasmáticas anormales o en exceso.	
	Agregación	Conglomerados irregulares de eritrocitos.	

3. MODELO MATEMÁTICO PARA APOYO DE INTERPRETACIÓN DEL PATRÓN DE ESPARCIMIENTO.

Como se describió anteriormente en el Capítulo 2, para poder describir el patrón de esparcimiento producido por una monocapa se puede utilizar la Aproximación de Difracción Anómala (ADA). Esta es una aproximación válida para partículas mayores que la longitud de onda incidente y con bajo contraste de índice de refracción con el exterior. En este capítulo se hablará sobre los modelos matemáticos propuestos para la descripción del patrón de esparcimiento por partículas de poliestireno comparadas con células sanguíneas correspondientes a los eritrocitos.

3.1. DESCRIPCIÓN DEL CAMPO ESPARCIDO POR UNA PARTÍCULA.

Se considera una onda electromagnética linealmente polarizada en la dirección de los ejes x y y , propagándose en la dirección z . Esta onda está descrita de la siguiente manera:

$$\mathbf{E}^i = E_0 e^{-i(k_m z - \omega t)} \hat{\mathbf{e}}_x, \quad (3)$$

$$\mathbf{B}^i = B_0 e^{-i(k_m z - \omega t)} \hat{\mathbf{e}}_y. \quad (4)$$

Donde $k_m = n_m k$, es el número de onda del medio, dado por n_m que es el índice de refracción del medio que rodea a la partícula, k el número de onda en el vacío a la frecuencia radial ω y $(\hat{\mathbf{e}}_x, \hat{\mathbf{e}}_y)$ vectores unitarios en la dirección de los ejes cartesianos correspondientes.

El campo electromagnético que va en dirección del eje z , es un plano perpendicular al vector de onda incidente (k^i) justo después de la partícula, que llamaremos plano de expansión, éste plano está descrito por el campo incidente que es retrasado en fase, debido al producto de la diferencia entre el índice de refracción dentro de la partícula (n_p) y el índice de refracción fuera de ella, es

decir, el índice de refracción del medio (n_m), y la distancia recorrida dentro de la partícula a lo largo de la dirección del vector de onda incidente (Fig. 3.1).

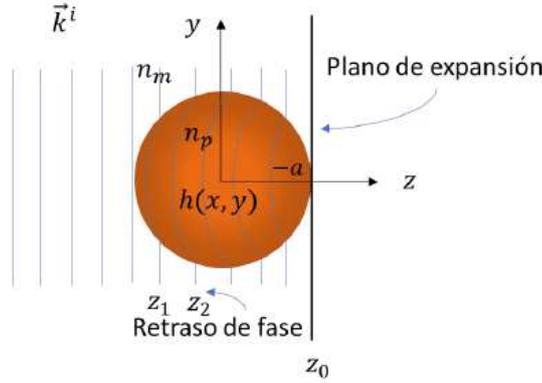


Figura 3.1. Diagrama del plano de expansión en $z=0$.

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que en el plano $z = 0$ tenemos que el campo electromagnético total está dado por:

$$\mathbf{E}_x(x, y, 0) = \begin{cases} E_0 \hat{\mathbf{e}}_x & \text{para } (x, y) \notin \text{sombra geométrica,} \\ E_0 e^{i[k_p - k_m]l(x,y)} \hat{\mathbf{e}}_x & \text{para } (x, y) \in \text{sombra geométrica.} \end{cases} \quad (5)$$

La sombra geométrica se refiere a la sombra de la partícula iluminada por rayos viajando en la dirección z (Fig. 3.1) y la función $l(x, y)$ es la distancia recorrida por un haz de luz viajando paralelamente al eje z , cruzando entonces el plano de expansión $E_y(x, y, 0) = 0$. Por lo tanto, el campo esparcido en el plano de expansión se puede describir como:

$$\mathbf{E}^s(x, y, 0) = \mathbf{E}(x, y, 0) - \mathbf{E}^i(x, y, 0),$$

de manera que la expresión quedaría:

$$\begin{cases} \mathbf{E}_x^s(x, y, 0) = \begin{cases} 0 & \text{para } (x, y) \notin \text{sombra geométrica,} \\ E_0 \left(e^{i([k_p - k_m]l(x,y))} - 1 \right) \hat{\mathbf{e}}_x & \text{para } (x, y) \in \text{sombra geométrica,} \end{cases} \\ \mathbf{E}_y^s(x, y, 0) = 0. \end{cases} \quad (6)$$

3.2. PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UNA ESFERA.

Considerando la expresión (6) para el campo esparcido, se observa que para el caso de una esfera se tiene que la función de la distancia recorrida $l(x, y)$ se obtiene a partir de considerar la superficie de una esfera centrada en $z = -a$ llegando a $x^2 + y^2 + (z + a)^2 = a^2$, si despejamos z para (x, y) constante, tenemos que:

$$z = -a \mp \left(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2} \right). \quad (7)$$

Existen dos posibles soluciones en la expresión (7), que se pueden denotar como z_1 y z_2 . La diferencia entre estas dos posibles soluciones es la que nos da la distancia recorrida dentro de la partícula para (x, y) constante:

$$l(x, y) = z_2 - z_1 = 2\sqrt{a^2 - x^2 - y^2}. \quad (8)$$

Si consideramos (x, y) distinto de la sombra geométrica a partir de la expresión (6) entonces la distancia recorrida $l(x, y)$ tiene un valor imaginario. Por la tanto, la función de esta distancia es cero fuera de la sombra geométrica de la partícula y se obtiene $l(x, y) = 2 \operatorname{Re}(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2})$. Sustituyendo este valor en la expresión (6) podemos escribir el campo esparcido como:

$$\begin{cases} \mathbf{E}_x^s(x, y, 0) = E_0 \left(e^{2i([k_p - k_m] \operatorname{Re}(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2}))} - 1 \right) \hat{\mathbf{e}}_x, \\ \mathbf{E}_y^s(x, y, 0) = 0. \end{cases} \quad (9)$$

Considerando está última expresión como una buena aproximación que se propaga en el plano de expansión, nos resta considerar ahora la propagación del campo en el semiespacio $z > 0$. Para describir está propagación utilizamos el método de transformadas de Fourier, por lo que la aproximación de difracción anómala consiste en aproximar el campo en el plano de expansión considerando la expresión (9). Indicando la transformada de Fourier bidimensional en el plano (x, y) del campo eléctrico esparcido $\mathbf{E}^s(x, y, 0)$, se tiene entonces que:

$$\begin{cases} \tilde{\mathbf{E}}_x^s(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_x^s(x, y, 0) e^{-ik_x x - ik_y y} dx dy, \\ \tilde{\mathbf{E}}_y^s(k_x, k_y) = 0. \end{cases} \quad (10)$$

Para la transformada inversa de Fourier, quedaría dada como:

$$\begin{cases} \mathbf{E}_x^s(x, y, 0) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{\mathbf{E}}_x^s(k_x, k_y) e^{ik_x x + ik_y y} dk_x dk_y, \\ \mathbf{E}_y^s(x, y, 0) = 0. \end{cases} \quad (11)$$

Aplicando el factor $e^{ik_z z}$ al Kernel donde $k_z = \sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}$, se tiene entonces que

$$\begin{cases} \mathbf{E}_x^s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{\mathbf{E}}_x^s(k_x, k_y) e^{ik_x x + ik_y y + ik_z z} dk_x dk_y, \\ \mathbf{E}_y^s(x, y, 0) = 0. \end{cases} \quad (12)$$

Esta expresión es una solución a la ecuación de Helmholtz para las componentes cartesianas de un campo vectorial: $(\nabla^2 + k_m^2)\mathbf{E}_{x(y)}^s(x, y, z) = 0$

Para que se pueda tener un campo vectorial como solución a las ecuaciones de Maxwell en el semiespacio $z > 0$, se necesita también considerar una solución para la ley de Gauss $\nabla \cdot \mathbf{E}^s(x, y, z) = 0$, para esto se tiene que agregar la componente z en el campo esparcido $z > 0$, es decir, se tendría que el campo esparcido estaría descrito por $\mathbf{E}_z^s(x, y, z)$. Con base en esto, tenemos que:

$$\mathbf{E}^s(x, y, z) = \mathbf{E}_x^s(x, y, z) + \mathbf{E}_y^s(x, y, z) + \mathbf{E}_z^s(x, y, z). \quad (13)$$

Por lo tanto, la transformada bidimensional de Fourier en el plano de expansión adquiere una componente z y se vería de la siguiente forma:

$$\tilde{\mathbf{E}}(k_x, k_y) = \tilde{\mathbf{E}}_x^s(k_x, k_y) + \tilde{\mathbf{E}}_y^s(k_x, k_y) + \tilde{\mathbf{E}}_z^s(k_x, k_y).$$

Con esto se puede completar el campo eléctrico vectorial y su transformada de Fourier vista en la expresión (12), se tiene que para $z > 0$, el campo quedaría como:

$$\mathbf{E}^s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{\mathbf{E}}^s(k_x, k_y) e^{ik_x x + ik_y y + ik_z z} dk_x dk_y. \quad (14)$$

De esta manera se puede compactar y escribirla como:

$$E^s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^s(k_x, k_y) e^{ik_m \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y. \quad (15)$$

Donde se puede utilizar $\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} = ik_x x + ik_y y + i\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2} z$, y aplicando la ley de Gauss igualando a cero, se llega a que:

$$\nabla \cdot \mathbf{E}^s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} (\nabla \cdot (\tilde{\mathbf{E}}^s(k_x, k_y) e^{ik_m \cdot \mathbf{r}})) dk_x dk_y = 0. \quad (16)$$

Dado que la transformada de Fourier es uno a uno, se concluye que:

$$\nabla \cdot \tilde{\mathbf{E}}^s(k_x, k_y) e^{ik \cdot \mathbf{r}} = 0, \text{ por lo tanto } \tilde{\mathbf{E}}_x^s(k_x, k_y) = \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) \hat{\mathbf{e}}_x,$$

con esto se puede llegar a que

$$\nabla \cdot \tilde{\mathbf{E}}^s(k_x, k_y) e^{ik \cdot \mathbf{r}} = ik_x \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) + ik_y \tilde{E}_y^s(k_x, k_y) + ik_z \tilde{E}_z^s(k_x, k_y) = 0,$$

y finalmente se obtiene:

$$k_x \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) + k_y \tilde{E}_y^s(k_x, k_y) + k_z \tilde{E}_z^s(k_x, k_y) = 0,$$

recordando entonces el caso en el que $\tilde{E}_y^s(k_x, k_y) = 0$, se obtiene que:

$$k_x \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) + k_z \tilde{E}_z^s(k_x, k_y) = 0,$$

de donde se puede despejar \tilde{E}_z^s y utilizando el Kernel $k_z = \sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}$ se puede escribir como:

$$\tilde{E}_z^s(k_x, k_y) = \frac{k_x \tilde{E}_x^s(k_x, k_y)}{\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}}. \quad (17)$$

Sustituyendo los valores correspondientes tenemos que:

$$\tilde{\mathbf{E}}(k_x, k_y) = \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) \hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_x \tilde{E}_x^s(k_x, k_y)}{\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}} \hat{\mathbf{e}}_z,$$

reescribiendo obtenemos la siguiente expresión:

$$\tilde{\mathbf{E}}(k_x, k_y) = \left(\hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_x}{\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}} \hat{\mathbf{e}}_z \right) \tilde{E}_x^s(k_x, k_y). \quad (18)$$

Retomando la expresión (15) y sustituyendo, tenemos que para $z > 0$ el campo esparcido está dado por:

$$\mathbf{E}^s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \left(\hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_x}{\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}} \hat{\mathbf{e}}_z \right) \tilde{E}_x^s(k_x, k_y) e^{ik \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y. \quad (19)$$

Teniendo entonces que la integral del lado derecho es de la forma:

$\frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{f}(k_x, k_y) e^{ik \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y$, ahora bien para calcular el campo lejano usamos el método de fase estacionaria, usando para esto coordenadas esféricas para expresar las coordenadas cartesianas del vector de posición: $\mathbf{r} = r \sin \theta \cos \phi \hat{\mathbf{e}}_x + r \sin \theta \sin \phi \hat{\mathbf{e}}_y + r \cos \theta \hat{\mathbf{e}}_z$, si se considera el límite cuando $r \rightarrow \infty$. [24, 25], se obtiene:

$$\frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{f}(k_x, k_y) e^{ik \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y \rightarrow -ik_m \cos \theta \frac{e^{ik_m r}}{2\pi r} \mathbf{f}(k_{xs}, k_{ys}). \quad (20)$$

Donde las coordenadas en fase estacionaria en el plano (k_x, k_y) están dadas por:

$$\begin{cases} k_x = k_m \sin \theta \cos \phi, \\ k_y = k_m \sin \theta \sin \phi. \end{cases} \quad (21)$$

Usando este resultado, tenemos entonces que el campo esparcido por una partícula está dado por:

$$\mathbf{E}^S(\mathbf{r}) = -ik_m \frac{e^{ik_m r}}{2\pi r} \cos \theta \left(\hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_x}{\sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}} \hat{\mathbf{e}}_z \right) \tilde{E}_x^S(k_m \sin \theta \cos \phi, k_m \sin \theta \sin \phi). \quad (22)$$

Donde finalmente utilizando aproximación de difracción anómala para una esfera descrita en la expresión (8), se tiene que el campo esparcido está dado por:

$$\tilde{E}_x^S(k_x, k_y) = E_0 \int_{-\infty}^{\infty} \left(e^{2i([k_p - k_m] \text{Re}(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2}))} - 1 \right) e^{-ik_x x - ik_y y} dx dy. \quad (23)$$

Sustituyendo valores, de la expresión (23) en (22), llegamos a:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}^S(r, \theta, \phi) &= -ik_m \frac{e^{ik_m r}}{2\pi r} \cos \theta \left(\hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_x}{\sqrt{k_m^2 - k_{xs}^2 - k_{ys}^2}} \hat{\mathbf{e}}_z \right) \times \\ &\times E_0 \int_{-\infty}^{\infty} \left(e^{2i([k_p - k_m] \text{Re}(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2}))} - 1 \right) e^{-ik_{xs} x - ik_{ys} y} dx dy. \end{aligned} \quad (24)$$

Usando (19) tenemos que

$$\begin{aligned} \mathbf{E}^S(r, \theta, \phi) &= -ik_m \frac{e^{ik_m r}}{2\pi r} \cos \theta \left(\hat{\mathbf{e}}_x + \frac{k_m \sin \theta \cos \phi}{\sqrt{k_m^2 - k_m^2 \sin^2 \theta}} \hat{\mathbf{e}}_z \right) \times \\ &\times E_0 \int_{-\infty}^{\infty} \left(e^{2i([k_p - k_m] \text{Re}(\sqrt{a^2 - x^2 - y^2}))} - 1 \right) e^{-ik_m \sin \theta \cos \phi x - ik_m \sin \theta \sin \phi y} dx dy. \end{aligned} \quad (25)$$

Finalmente suponiendo un como camino óptico por una esfera $L(x, y)$:

$$L(x, y) = \sqrt{a^2 - x^2 - y^2}. \quad (26)$$

Donde a corresponde al radio de la partícula.

Se tiene la expresión general que describirá el campo esparcido producido por una monocapa como:

$$\frac{|E^s(r, \theta, \phi)|^2}{|E_0|^2} = k_m^2 \frac{\cos^2 \theta}{(2\pi)^2 r^2} \left(1 + \frac{(\sin \theta \cos \phi)^2}{1 - \sin^2 \theta} \right) \times \left| \int_{-\infty}^{\infty} \left(e^{2i([k_p - k_m] \text{Re}(L(x,y)))} - 1 \right) e^{-ik_m \sin \theta \cos \phi x - ik_m \sin \theta \sin \phi y} dx dy \right|^2 . \quad (27)$$

El radio de la partícula, para fines de nuestra investigación es el que vamos a ir variando, así como la morfología de la célula, en este caso el camino óptico $L(x, y)$ (Fig. 3.2.).

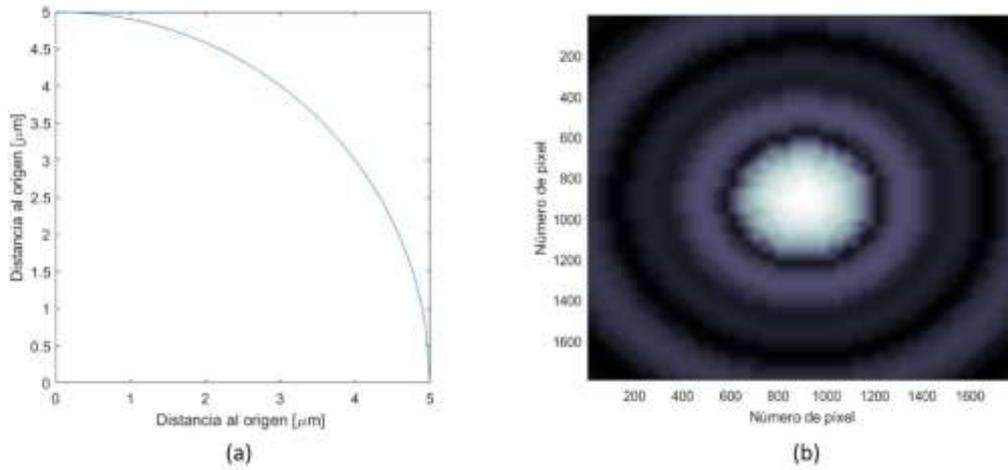


Figura 3.2. (a) Perímetro de un cuadrante de la sección transversal de una esfera con radio de $5 \mu\text{m}$ y (b) Patrón de esparcimiento.

Utilizando el programa de MATLAB se calculó la expresión (27) para obtener un espectro o perfil de intensidad (Fig. 3.3) del patrón de esparcimiento producido por la monocapa de partículas de poliestireno rojas. Para este caso se toman los siguientes parámetros que describen el modelo teórico, $n_m = 1.33$ es el índice de refracción del medio correspondiente al agua, $n_p = 1.59$ el índice de refracción de la partícula, correspondiente a las partículas de poliestireno rojas [26], $\lambda = 532 \text{ nm}$ la longitud de onda y $a = 5 \mu\text{m}$ el radio de la partícula.

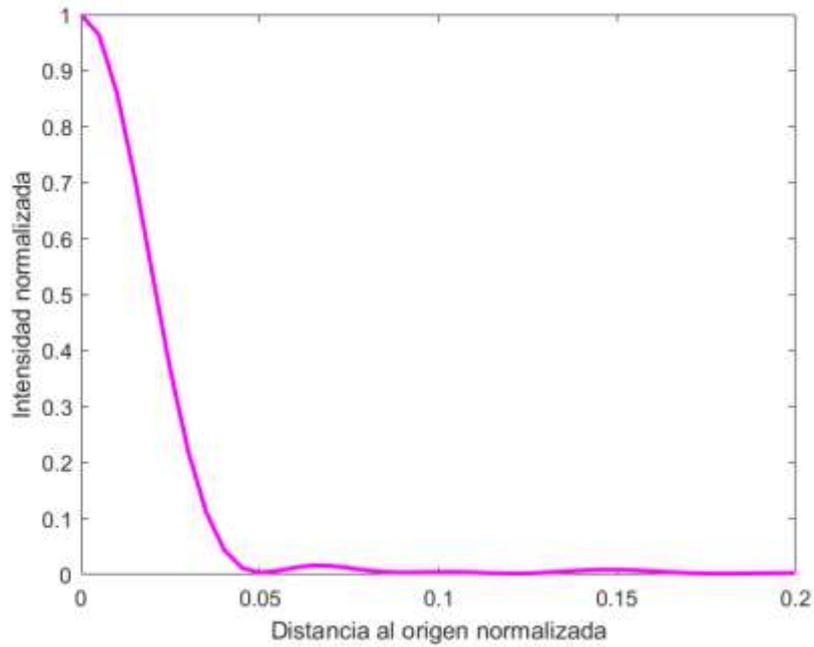


Figura 3.3. Perfil de intensidad del campo esparcido producido por una esfera de $10 \mu\text{m}$ de diámetro.

Con este mismo método se realiza otro cálculo en MATLAB, para modelar el patrón de esparcimiento (Fig. 3.4) y el perfil de intensidad (Fig. 3.5) producido por la monocapa de partículas de poliestirenos con un radio de $a = 2.5 \mu\text{m}$. Considerando los mismos parámetros longitud de onda, índice de refracción del medio y el índice de refracción de la partícula [26].

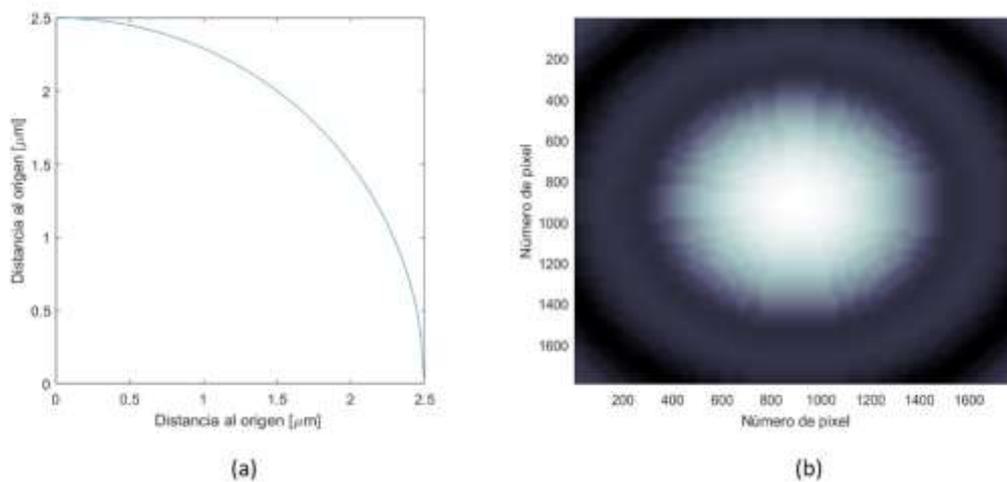


Figura 3.4. (a) Perímetro de un cuadrante de la sección transversal de una esfera con radio de $2.5 \mu\text{m}$ y (b) Patrón de esparcimiento.

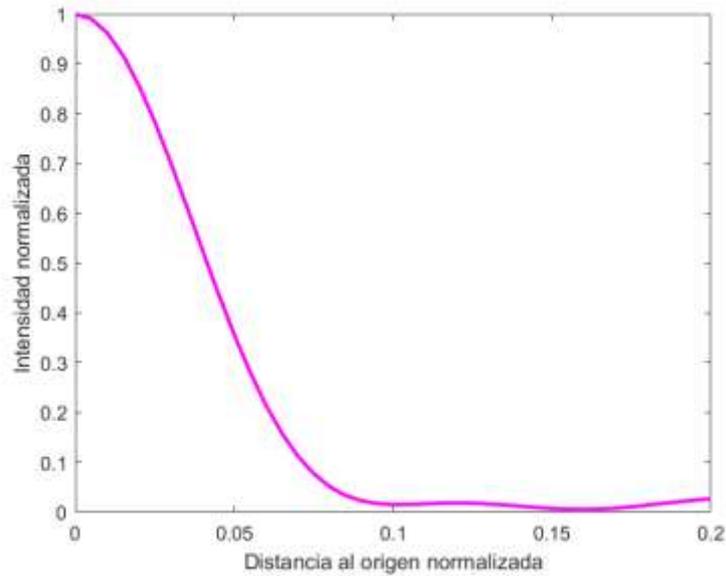


Figura 3.5. Perfil de intensidad del campo esparcido producido por una esfera de $5 \mu\text{m}$ de diámetro.

3.3. PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UNA ERITROCITO.

Para describir el campo esparcido por un eritrocito, se utilizó la expresión que se propone en la tesis “*Reflectividad óptica de películas inhomogéneas y su aplicación a sensores.*” [27], siguiendo el mismo procedimiento que se tomó anteriormente para describir el camino óptico $L(x, y)$ por un eritrocito bicóncavo [28, 29], está dado por:

$$L(x, y) = d \sqrt{1 - \frac{4(x^2 + y^2)}{d^2}} \left[c + \frac{c_1(x^2 + y^2)}{d^2} + \frac{c_2(x^2 + y^2)^2}{d^2} \right]. \quad (28)$$

Donde $d = 8 \mu\text{m}$ corresponde el diámetro de un eritrocito considerado de un persona sana, $c = 0.0518$, $c_1 = 2.0026$ y $c_2 = -4.491$ las constantes morfológicas del eritrocito [28, 29]. En la (Fig. 3.6-(a)) se puede observar la forma geométrica de una sección transversal del eritrocito.

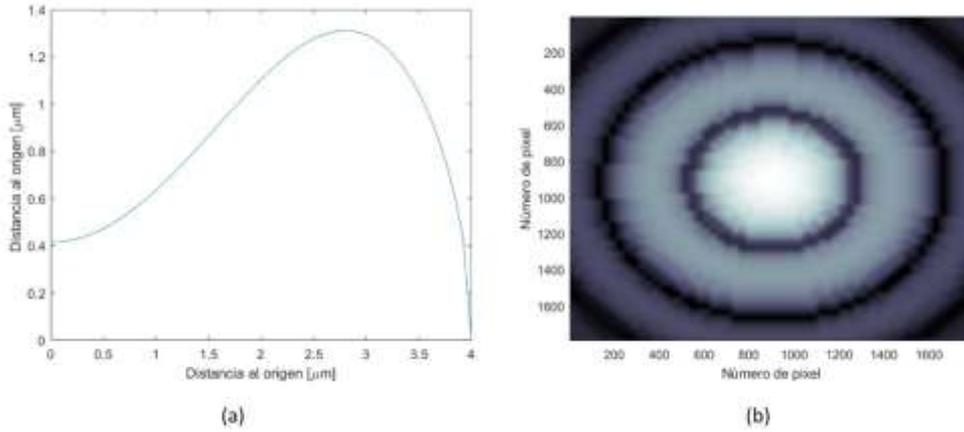


Figura 3.6. (a) Perímetro de un cuadrante de la sección transversal de un eritrocito con radio de $4 \mu\text{m}$ y (b) Patrón de esparcimiento.

Tomando en cuenta la expresión (28) y con las constantes morfológicas, se sustituye en la expresión (27) para poder modelar el patrón de esparcimiento por una monocapa de eritrocitos (Fig. 3.6-(b)), esto se realiza utilizando el programa de MATLAB. Para este caso se toman los siguientes parámetros que describen el modelo teórico, $n_m = 1.36$ es el índice de refracción del medio correspondiente al plasma, $n_p = 1.41$ el índice de refracción de la partícula, correspondiente al eritrocito [30] y $\lambda = 532 \text{ nm}$ la longitud de onda, con eso se obtiene el perfil de intensidad del campo esparcido por un eritrocito (Fig. 3.7).

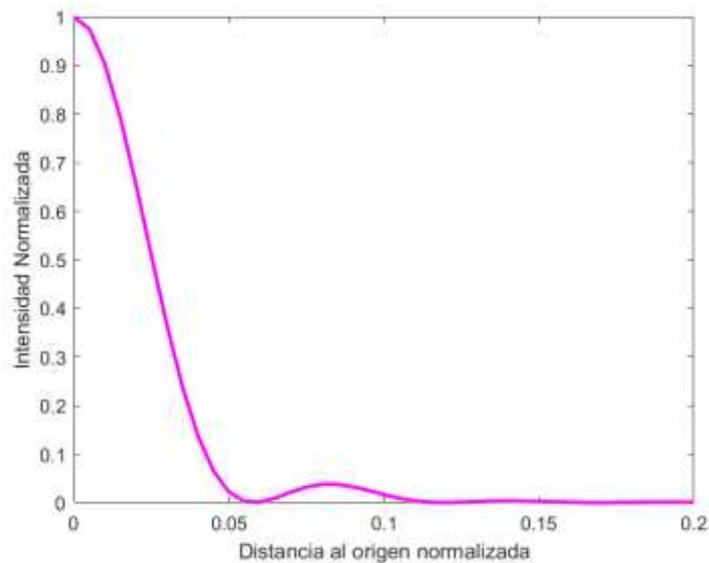


Figura 3.7. Perfil de intensidad del campo esparcido producido por un eritrocito con $8 \mu\text{m}$ de diámetro.

3.4. PATRÓN DE ESPARCIMIENTO POR UN ELIPSOIDE.

El campo esparcido por un elipsoide se puede representar mediante la siguiente ecuación cartesiana centrada en el origen [27]:

$$L(x, y) = \frac{c}{ab} \sqrt{ab^2 - b^2x^2 - a^2y^2}. \quad (29)$$

Donde $a = 4 \mu m$ corresponde al radio de la elipse, $b = 4 \mu m$ y $c = 1.5 \mu m$ corresponden a las longitudes de los semiejes del elipsoide en los ejes (x, y, z) , se puede ver $a = b$ en este caso considerándose la sección transversal circular de radio a , tomándose como un esferoide [28, 29]. En la (Fig. 3.8-(a)) se puede observar la forma geométrica de la elipse.

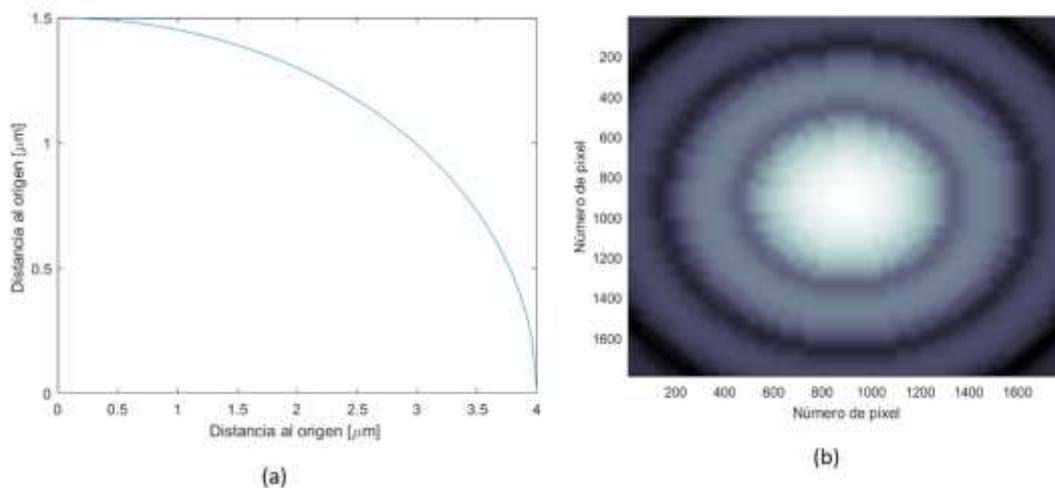


Figura 3.8. (a) Perímetro de un cuadrante de la sección transversal de una elipse con radio de $4 \mu m$ y (b) Patrón de esparcimiento.

Tomando en cuenta la expresión (29) y con las constantes morfológicas, se sustituye en la ecuación (27) para poder modelar el patrón de esparcimiento por una elipse (Fig. 3.8-(b)), esto se realiza utilizando el programa de MATLAB. Para este caso se toman los siguientes parámetros que describen el modelo teórico, $n_m = 1.36$ es el índice de refracción del medio correspondiente al plasma, $n_p = 1.41$ el índice de refracción de la partícula [30] y $\lambda = 532 \text{ nm}$ la longitud de onda, para este caso se tomaron los valores de un eritrocito suponiendo una anomalía

en su morfología, obteniendo el perfil de intensidad del campo esparcido (Fig. 3.9).

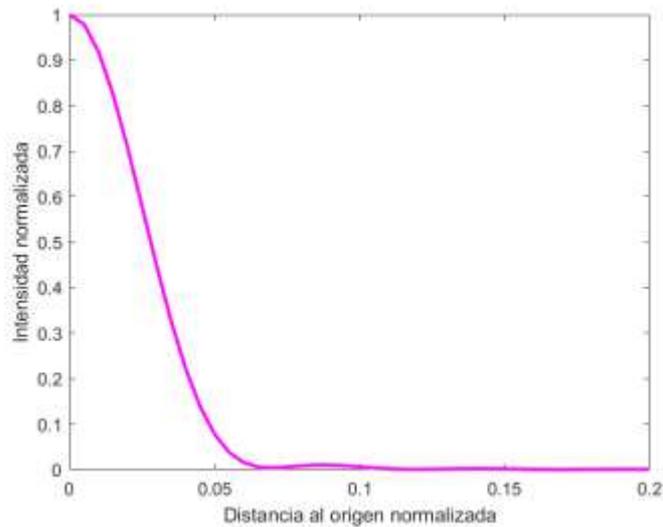


Figura 3.9. Perfil de intensidad del campo esparcido producido por una elipse con 8 μm de diámetro.

3.5. PATRÓN DE ESPARCIMIENTO DE UN DISCO.

Para describir el campo esparcido por un disco se puede representar mediante la siguiente ecuación cartesiana centrada en el origen [27]:

$$L(x, y) = \frac{h}{1 + e^{(-B(a^2 - x^2 - y^2))}} \quad (30)$$

Donde $a = 4 \mu m$ corresponde al radio del disco, $h = 4 \mu m$ corresponde a la altura y $B = 2/a$ siendo el parámetro de borde [28, 29]. En la (Fig. 3.10-(a)) se puede observar la forma geométrica del disco.

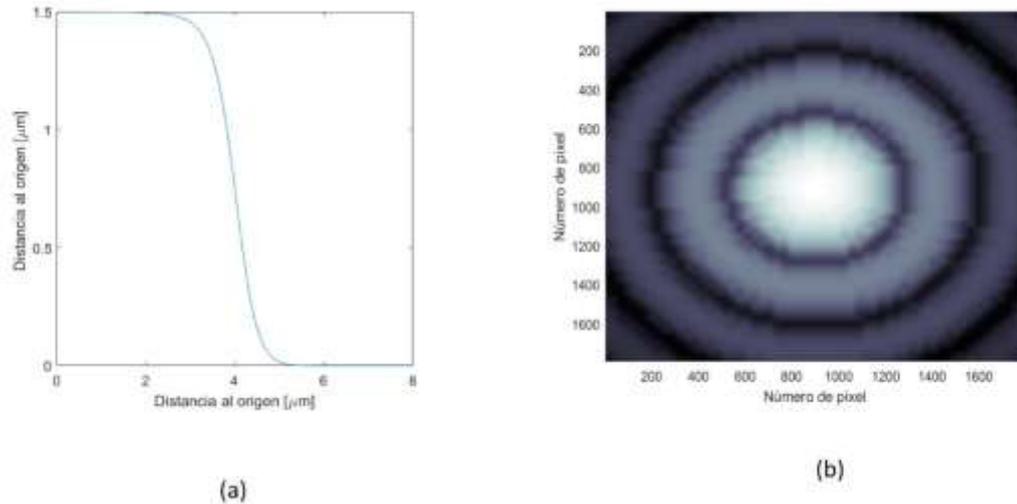


Figura 3.10. (a) Perímetro de un cuadrante de la sección transversal de un disco con radio de $4 \mu\text{m}$ y (b) Patrón de esparcimiento.

Tomando en cuenta la expresión (30) y con las constantes morfológicas, se sustituye en la expresión (27) para poder modelar el patrón de esparcimiento por un disco (Fig. 3.10-(b)), esto se realiza utilizando el programa de MATLAB. Para este caso se toman los siguientes parámetros que describen el modelo teórico, $n_m = 1.36$ es el índice de refracción del medio correspondiente al plasma, $n_p = 1.41$ el índice de refracción de la partícula [30] y $\lambda = 532 \text{ nm}$ la longitud de onda, para este caso se tomaron los valores de un eritrocito suponiendo una anomalía en su morfología, obteniendo el perfil de intensidad del campo (Fig. 3.11).

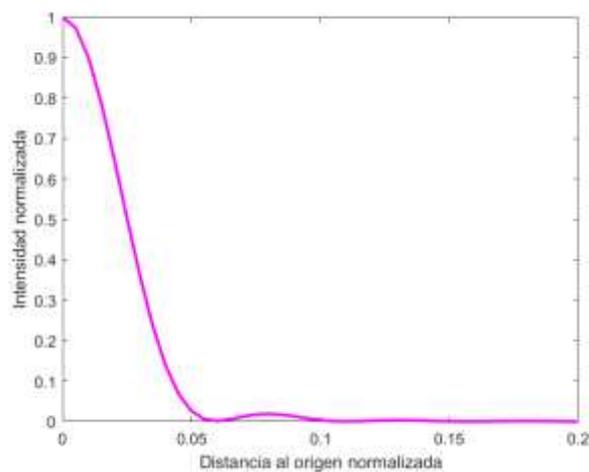


Figura 3.11. Perfil de intensidad del campo esparcido producido por un disco con $8 \mu\text{m}$ de diámetro.

4. DISPOSITIVO PROPUESTO PARA MEDIR EL PATRÓN DE ESPARCIMIENTO

En el presente capítulo se mostrará el montaje óptico propuesto para medir el patrón de esparcimiento producido por una monocapa, el cual está conformado por un láser de $\lambda = 532 \text{ nm}$, un diafragma y como detector del patrón de esparcimiento, una cámara de un teléfono celular CMOS (*complementary meta-oxide-semiconductor* por sus siglas en inglés).

El comportamiento del campo esparcido del sistema óptico se describe utilizando el modelo matemático teórico ADA, el cual sirvió para calibrar el sistema y tener un punto de partida antes de utilizar células sanguíneas, este modelo está descrito en la sección 3.1 en el capítulo 3. Previo al estudio de eritrocitos se realizó una simulación con partículas de poliestireno rojas de diámetro de $10 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$ colocadas en monocapa, para modelar una muestra de eritrocitos sanos y con alguna patología correspondiente a distribución de tamaños. Para simular cambios morfológicos se utilizaron soluciones osmóticas.

4.1. COMPONENTES DEL SISTEMA ÓPTICO.

- **Diodo Láser**

El láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation-LASER por sus siglas en inglés), es un dispositivo que emite un haz de luz coherente, convergente y monocromático, mediante una amplificación óptica. [31]. Se elige esta fuente de luz, en una longitud de onda de $\lambda = 532 \text{ nm}$ con una potencia de salida de 5 mW , debido a que en este rango y con esta potencia se obtiene mayor resolución en el patrón de esparcimiento producido por una monocapa.

- **Diafragma**

Se utiliza un diafragma para regular la cantidad de luz que entra en la muestra. El diafragma se colocó después del diodo láser, este dispositivo es un diafragma de disco, con el fin de regular la cantidad de luz que incide en la muestra, tomando una abertura de 1 mm . El haz que incide sobre las células y el patrón de esparcimiento resultante de esta interacción se proyecta sobre una pantalla traslucida.

- **Pantalla Traslucida**

El patrón de esparcimiento se proyecta sobre una pantalla colocada sobre el eje del haz, la cual es una hoja de papel albanene, en esta pantalla se colocó una regla graduada en cm , para poder medir los anillos correspondientes a los mínimos locales y poderlos comparar con el perfil de intensidad. Sobre esta pantalla se coloca un beam stop, con el fin de bloquear la intensidad de la luz que pueda saturar la cámara y solo se conserve la imagen del patrón de esparcimiento.

- **Cámara CMOS de un teléfono celular**

La cámara CMOS (semiconductor de óxido metálico complementario) es un sensor de píxeles activos formado por numerosos fotositos que producen una corriente eléctrica que varía en función de la intensidad de luz recibida [32]. Debido a que los módulos CMOS son de baja potencia y bajo costo, permiten a los teléfonos celulares capturar imágenes de 16 megapíxeles, es decir, un píxel representa la menor unidad de tamaño en una fotografía digital, cuantos más píxeles tenga una foto podremos decir que será con mayor resolución, al decir que la imagen obtenida tiene 16 megapíxeles nos referimos a que tiene 16 millones de píxeles, teniendo una buena resolución para el análisis de imágenes, con base en estas características se eligió esta cámara como sensor para la captura y almacenamiento del patrón de esparcimiento.

Los objetos descritos anteriormente, son los que componen principalmente el sistema óptico propuesto para el estudio de la monocapa, el cual se observa en la *Fig. 4.1*.

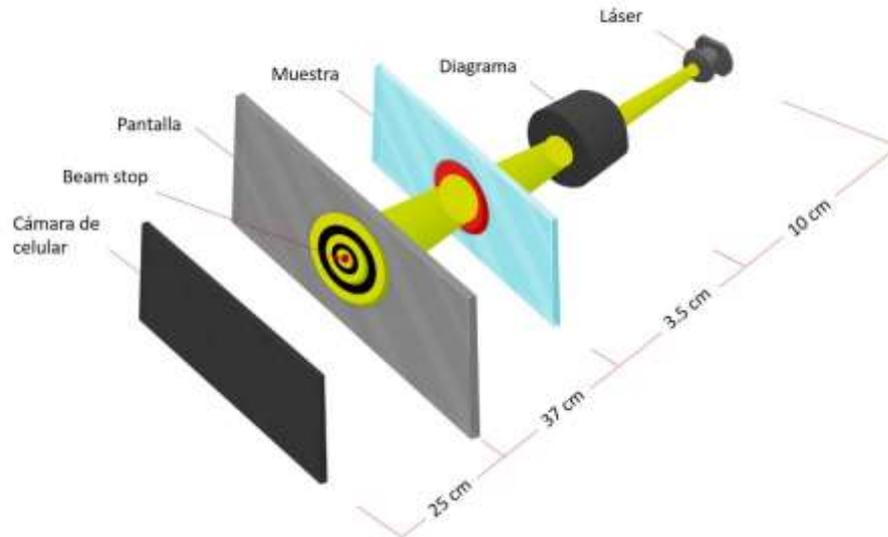


Figura 4.1. Montaje óptico

4.2. METODOLOGÍA

Para realizar el análisis del patrón de esparcimiento producido por una monocapa, se utilizaron dos tipos de muestras: a) partículas de poliestireno rojas y b) células sanguíneas correspondiente a eritrocitos. Las células a estudiar se depositarán en forma de monocapa sobre un sustrato de vidrio (portaobjetos) colocándolo en una base diseñada para el arreglo experimental, como se puede observar en la *Fig. 4.1*. La muestra está colocada de manera vertical para que el haz del láser de 532 nm de longitud de onda incida perpendicularmente, antes de la muestra, se coloca un diafragma con una abertura de 1 mm . El haz que incide sobre las células produciendo el patrón de esparcimiento resultante de esta interacción se proyecta sobre una pantalla traslúcida situada a 37 cm . Sobre esta pantalla se coloca un "beam stop" con el fin de bloquear la intensidad de la luz que pueda saturar la cámara del teléfono celular y solo se conserve la imagen del patrón de esparcimiento. Se obtendrá una imagen del patrón proyectado en la pantalla con ayuda de la cámara digital de un celular.

4.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PARTICULAS DE POLIESTIRENO ROJAS.

Se utilizaron dos tipos de muestras para medir el patrón de esparcimiento y calibrar el sistema, realizando monocapas con partículas de poliestireno rojas, con dos distintos diámetros: $5\ \mu m$ y $10\ \mu m$, obteniendo los patrones de esparcimiento de las monocapas elaboradas con estas partículas bien caracterizadas en tamaño y forma, para realizar el análisis de los resultados experimentales y compararlos con la parte teórica. Posteriormente, ya que se tenía el sistema calibrado, se utilizaron monocapas mezclando estos dos tamaños de las partículas, para simular anisocitosis o variaciones en el patrón de esparcimiento. El método para la realización de las monocapas, se describen a continuación.

4.3.1 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS.

Como ya se mencionó, para calibrar el sistema óptico se utilizaron partículas de poliestireno (Phosphorex, Inc, Visiblex Color Dyed Microspheres, con lote número 107228). El procedimiento para realizar la monocapa es el siguiente.

- 1) Con ayuda de un pincel se depositaron en el portaobjetos cinco barridos de partículas de poliestireno con diámetro de $10\ \mu m$, hasta obtener una monocapa con una distribución uniforme y de alta densidad (*Fig. 4.2-(a)*).
- 2) Se realiza el mismo proceso para obtener una muestra con las mismas propiedades que la anterior, pero con las partículas con diámetro de $5\ \mu m$ (*Fig. 4.2-(b)*).

Para simular una muestra de personas sanas con dimensiones similares a los eritrocitos normales se propuso una muestra como la *Fig. 4.2-(a)*, utilizando las partículas de $10\ \mu m$. Para simular una patología como la anemia ferropénica, la cual como ya hemos mencionado tiene como característica la de presentar

eritrocitos con un menor volumen corpuscular medio, se propuso la *Fig. 4.2-(b)*, utilizando las partículas de 5 μm .

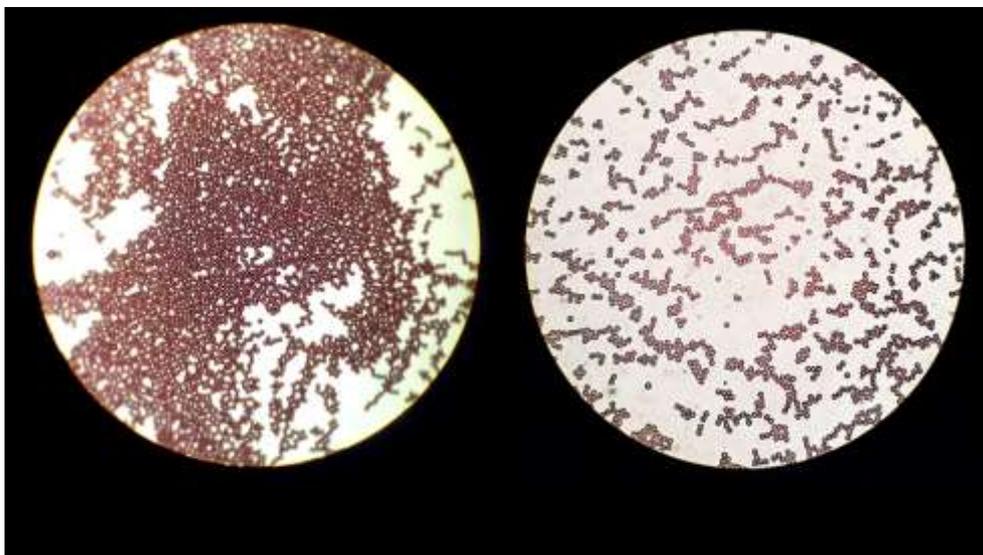


Figura 4.2. (a) Partículas de poliestireno de 10 μm y (b) Partículas de poliestireno de 5 μm . (Con amplitud de 40x).

4.3.2 MONOCAPA DE PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS DE DISTINTOS TAMAÑOS.

Para simular anisocitosis, es decir, una muestra de eritrocitos de diferentes tamaños o diámetros; y la evolución de un tratamiento en el que la mayoría de los eritrocitos, llegan a tener su tamaño normal. Se prepararon muestras en monocapas utilizando nuestra metodología mencionada anteriormente, mezclando las partículas de poliestireno de 5 μm y 10 μm de diámetro, en las siguientes proporciones: **solución 1** (20% de 10 μm -80% de 5 μm) (*Fig. 4.3-(a)*), **solución 2** (50% de 10 μm -50% de 5 μm) (*Fig. 4.3-(b)*), **solución 3** (60% de 10 μm -40% de 5 μm) (*Fig. 4.3-(c)*) y **solución 4** (80% de 10 μm -20% de 5 μm) (*Fig. 4.3-(d)*).

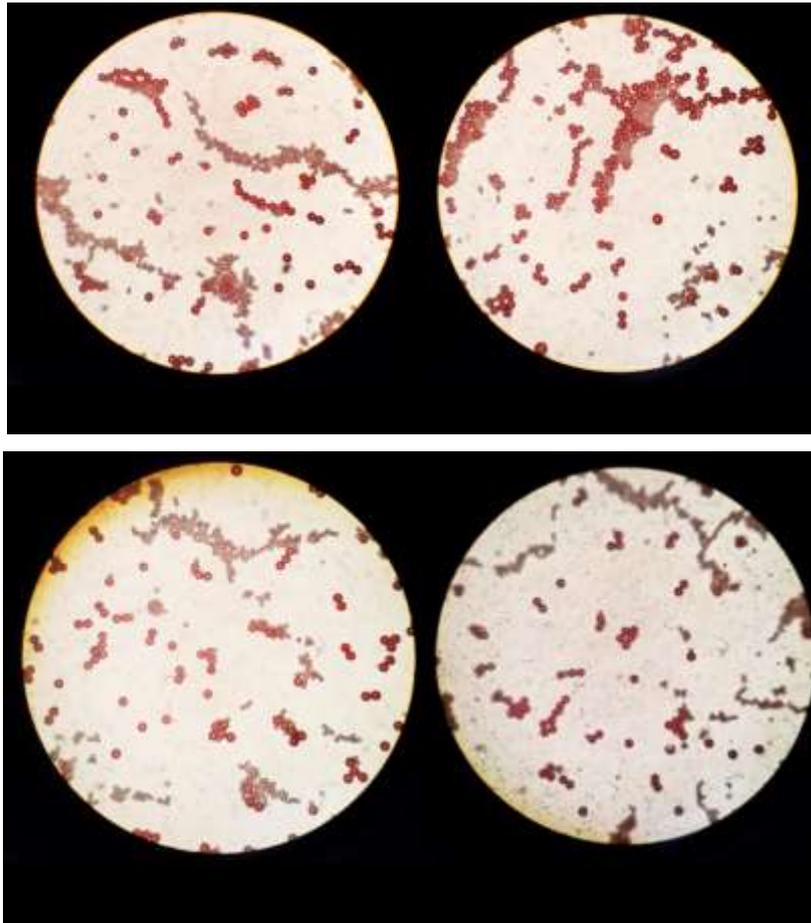


Figura 4.3. Partículas de poliestireno correspondientes a: (a) Solución 1, (b) Solución 2, (c) Solución 3 y (d) Solución 4. (Con amplitud de 100x).

4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS (ERITROCITOS).

Para la preparación de la monocapa de las células sanguíneas, se utiliza el método de frotis, el cual consiste en depositar una gota de sangre de aproximadamente 2 mm de diámetro en un extremo de un portaobjetos limpio, esto es para que se forme un extendido largo, pero no muy grueso. (Fig. 4.4-(a)). Se utiliza un segundo portaobjeto el cual se mantiene en un ángulo de 45° sobre la gota de sangre, moviéndola hacia atrás hasta tocar la gota de sangre (Fig. 4.4-(b)) y posteriormente se mueve el portaobjetos en sentido contrario, dejando que la sangre se extienda por todo el portaobjetos, tratando que quede una capa de sangre bien distribuida (Fig. 4.4-(c)).

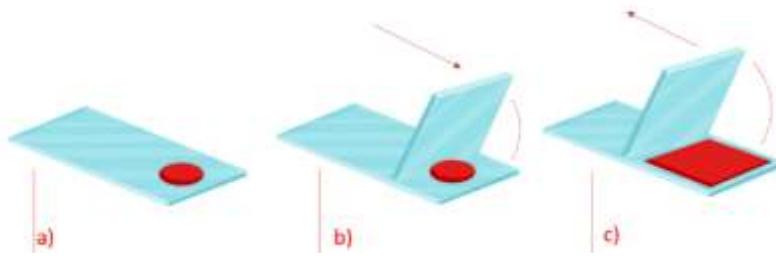


Figura 4.4. (a) Gota de sangre depositada al extremo del portaobjetos, (b) segundo portaobjetos acomodado en un ángulo de 45° y (c) distribución de la sangre dejando una capa delgada.

4.4.1 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS SANAS.

Por medio del frotis o extendido de sangre anteriormente descrito se obtiene una monocapa de eritrocitos sanos (*Fig. 4.5*), con la finalidad de tener una muestra control y poder compararla con el patrón de esparcimiento y perfil de intensidad teórico descrito en el Capítulo 3, sección 3.3.

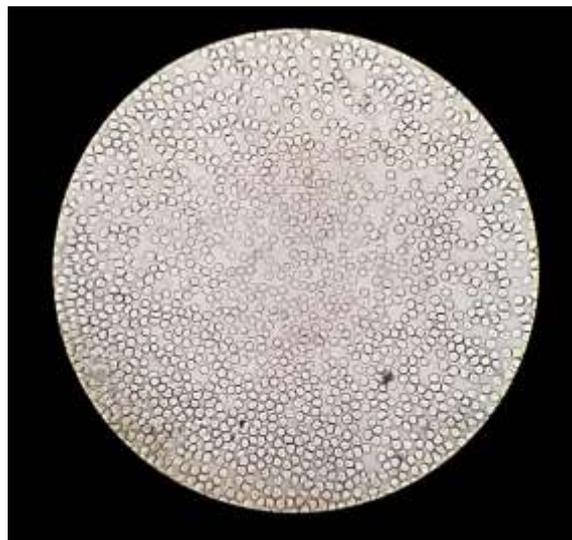


Figura 4.5. Muestra con de una monocapa de eritrocitos sanos. (Con amplitud de 40x).

4.4.2 MONOCAPA POR SOLUCIONES OSMÓTICAS.

Utilizando el mismo método de extendido de sangre anteriormente descrito, se obtiene una monocapa por solución osmótica. La osmosis es un fenómeno que sucede cuando existen dos soluciones en un medio con diferente concentración de solutos, esto ocasiona una fragilidad o grado de resistencia de los eritrocitos

[23, 34]. Cuando el eritrocito alcanza su límite de elasticidad, es decir, se llega al volumen crítico, la hemoglobina de esa célula se difunde en equilibrio dentro y fuera de la misma. Así se genera un proceso conocido como ósmosis, que se refiere al movimiento neto de agua a través de una membrana semipermeable, desde una zona de baja concentración de solutos hacia otra de mayor concentración [33, 34]. Comúnmente se utilizan tres términos para comparar la osmolaridad de una célula.

- Solución isotónica: Es cuando las células eritrocitarias se sumergen en este tipo de solución, no habrá movimiento neto de agua a través de la membrana, conservando su forma original sin ninguna deformidad. La solución isotónica es Cloruro de Sodio (*NaCl*) a una concentración del 0.9% en agua. Tomamos 500 μ l de sangre entera y lo mezclamos en 250 μ l de solución salina. Posteriormente de esta nueva solución se tomó una gota de sangre para realizar la monocapa (*Fig. 4.6-(a)*).
- Solución hipotónica: Es cuando las células eritrocitarias se encuentran en una solución con menos sal que hay en las mismas células, de esta manera se ocasiona que entre agua a la membrana provocando que los eritrocitos se hinchen y pierdan su forma normal, corriendo el riesgo de reventar. En este caso la solución hipotónica se realizó utilizando agua tridestilada. Tomamos 500 μ l de sangre y lo mezclamos en 250 μ l de solución hipotónica. Posteriormente, de esta nueva solución se tomó una gota de sangre para realizar la monocapa (*Fig. 4.6-(b)*).
- Solución hipertónica: Es cuando se sumerge a las células eritrocitarias en una solución con mayor cantidad de sal que le hay en las células, provocando que salga agua de ellas haciendo que se encojan y adquieran una forma de pasa. En este caso la solución hipertónica fue utilizando solución salina con 0.75g de *NaCl* (sal de mesa). Tomando 500 μ l de sangre y lo mezclamos con 50 μ l de solución hipertónica. Posteriormente de esta nueva solución se tomó una gota de sangre para realizar la monocapa (*Fig. 4.6-(c)*).

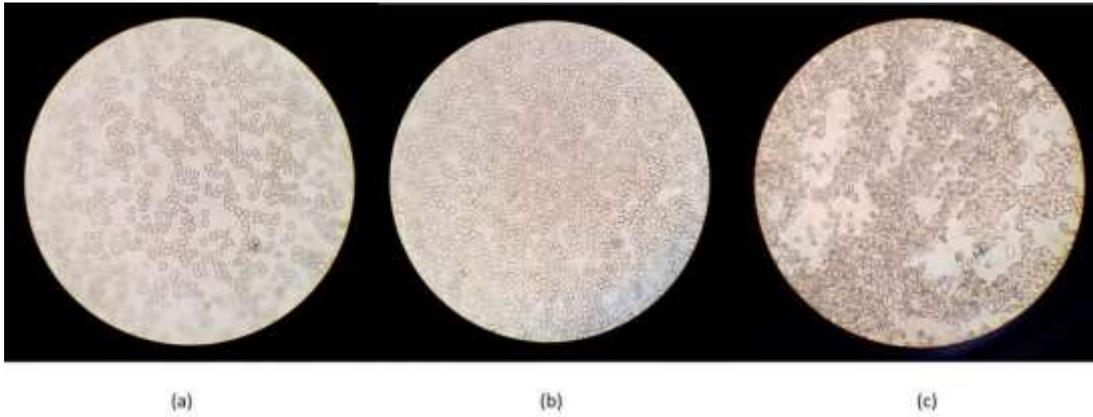


Figura 4.6. Muestra con una solución: (a) Isotónica (b) Hipotónica e (c) Hipertónica (Con amplitud de 100x).

4.4.3 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON ANEMIA.

Finalmente, después de los experimentos previos se realizaron las monocapas provenientes de pacientes con anemia, utilizando de igual manera el método de frotis o extendido de sangre y se realiza una comparación con la monocapa de personas sanas. En la *Fig. 4.7-(a)*, se muestra una monocapa para el caso de personas sanas. En el caso de la monocapa mostrado en la *Fig. 4.7-(b)*, se tuvo que realizar el proceso de frotis más de una vez, debido a que, por presentar una patología como la anemia, suele generarse el fenómeno de *Roleaux*, una alteración en los eritrocitos donde se apilan en forma de monedas de manera muy rápida, ver (*Tabla 1.1.*). Por lo que el método de frotis tiene que ser rápido para que se pueda obtener una monocapa.

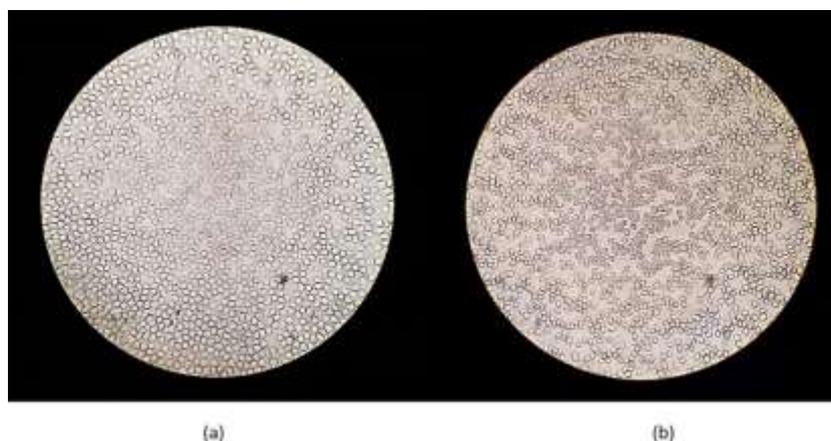


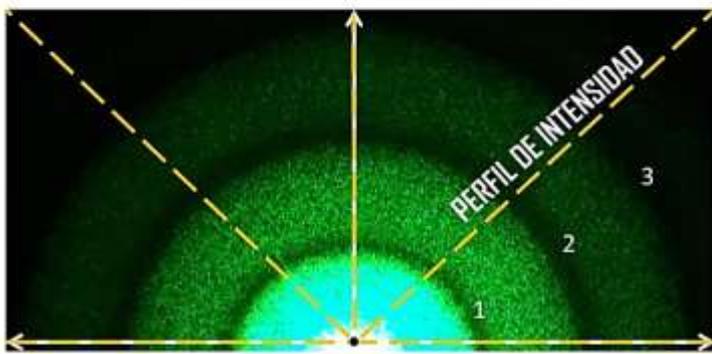
Figura 4.7. (a) Monocapa células sanguíneas eritrocitos sanos y (b) Monocapa células sanguíneas eritrocitos anemia. (Con amplitud de 40x).

5. RESULTADOS

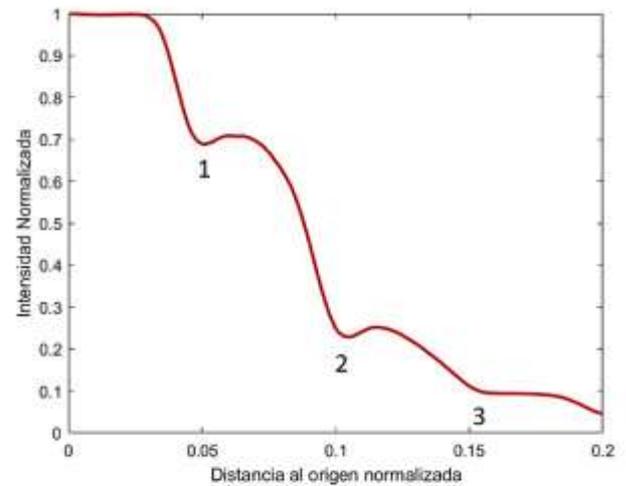
Con base en la descripción del Capítulo 4, una vez que se tuvo el montaje más adecuado para medir las monocapas de partículas de poliestireno rojas y eritrocitos correspondientes a personas sanas y con anemia, así como la metodología correcta para hacer el frotis, se procedió a medir el patrón de esparcimiento producido por las monocapas. En este capítulo se describen los resultados obtenidos para cada una de las muestras que se mencionaron.

5.1 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES CON PROGRAMA MATLAB

Para el procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas por la cámara del teléfono celular, se utilizó un programa realizado en MATLAB que mide el perfil de intensidad del patrón de esparcimiento obtenido por una imagen, este programa consiste en los siguientes pasos: primero hace un corte de la imagen por la mitad como se ve en la *Fig. 5.1-(a)*, posteriormente a ésta imagen la convierte a verde, eliminando los colores rojo y azul que pudiera tener la imagen inicial y que estos pudieran inducir un ruido, ya que se tiene la imagen en verde, se marca un eje con la función *axis* (líneas blancas), el cual tiene como finalidad delimitar el eje de rotación donde va a girar la imagen. Se pide que la imagen haga un giro total de 180° , variando en cinco ángulos (0° , 45° , 90° , 135° y 180°), por cada giro se obtiene el perfil de intensidad (línea punteada amarilla). Estos perfiles de intensidad los suma y nos reproduce un perfil de intensidad promedio (*Fig. 5.1-(b)*), correspondiente al patrón de esparcimiento, a partir de este perfil promedio, se determinó que los mínimos locales se considerarían como parámetro para determinar los anillos oscuros formados por el límite del patrón de esparcimiento y así poder asociarlos entre sí. Ya que los anillos correspondientes a los máximos locales pueden tener un error al considerar la intensidad de la luz que pudiera filtrarse y que provoca una saturación en la imagen y el primer anillo lo marca como un máximo constante.



(a)



(b)

Figura 5.1. (a) Análisis de imagen, marcando un eje de perfil de intensidad y (b) Perfil de intensidad promedio.

• NORMALIZACIÓN DE EJES

Para comparar los resultados experimentales con los resultados teóricos, se normalizaron los datos de los dos ejes, considerando para el eje y correspondiente al perfil de intensidad de la imagen, se utilizó la función “normalize” de MATLAB, con el método “norm”, el cual considera el valor máximo y lo divide entre todos los demás valores. Para el eje x se consideró el valor que corresponde al número de pixeles en cm , tomando en cuenta el ancho de la imagen y el número de pixeles que corresponde a este ancho, para obtener estos valores se utilizó el programa ImageJ, obteniendo que el ancho de la imagen corresponde a 15.5 cm y el valor del número de pixeles es de 2264 Pix . Considerando estos valores se utilizó lo siguiente:

$$x_{dPix} = 15.5\text{ cm}/2264\text{ Pix} = 0.006834\text{ cm}/\text{Pix} \cdot \quad (31)$$

Donde x_{dPix} es la distancia en pixeles correspondiente al eje x .

Este valor se introduce en el programa de MATLAB, sustituyéndolo en la siguiente expresión:

$$x_{norm} = x_{dPix} \times Pix_{max}/37\text{ cm} \cdot \quad (32)$$

Donde x_{dPix} corresponde a la expresión (31), Pix_{max} es el promedio del número de pixeles y se toma como pixel máximo del perfil de intensidad obtenido al

análisis que se describe en la sección 5.1 y 37 cm corresponde a la distancia de la muestra hacia la pantalla. Con esta normalización se obtienen valores adimensionales que pueden ser comparados con el modelo matemático teórico.

5.2 PERFIL DE INTENSIDAD Y PATRONES DE ESPARCIMIENTO

Una vez obtenidas las imágenes, se les realiza el procesamiento y análisis que se describe en la sección 5.1 de este capítulo, para localizar los mínimos locales, es decir, los anillos oscuros, como característica principal para tener una “firma” o patrón de esparcimiento específico para cada monocapa.

5.2.1 MONOCAPA POR PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS.

Para la calibración del sistema óptico, se utilizaron dos tipos de monocapas unas de alta densidad y unas de baja densidad, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4, sección 4.3.1. Para la simulación de una monocapa de células sanas, se utilizaron las partículas de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro con una densidad alta, obteniendo el perfil de intensidad y el patrón de esparcimiento de esta monocapa (*Fig. 5.2-(b)*). Ahora bien, para la simulación de una muestra de sangre con anemia ferropénica, se utilizaron las partículas de $5\ \mu\text{m}$ de diámetro, con una densidad baja, capturando el patrón de esparcimiento y obteniendo el perfil de intensidad de una muestra para su procesamiento y posterior análisis (*Fig. 5.3*).

Posteriormente se realiza la comparación entre la gráfica teórica obtenida en el Capítulo 3, en la sección 3.2, la cual corresponde a la *Fig. 3.3*, haciéndole un acercamiento a la gráfica, para que se pudieran apreciar los mínimos locales, como se observa en la *Fig. 5.2-(a)* y la gráfica experimental obtenida por la monocapa de alta densidad con partículas de poliestireno de diámetro de $10\ \mu\text{m}$ (*Fig. 5.2-(b)*).

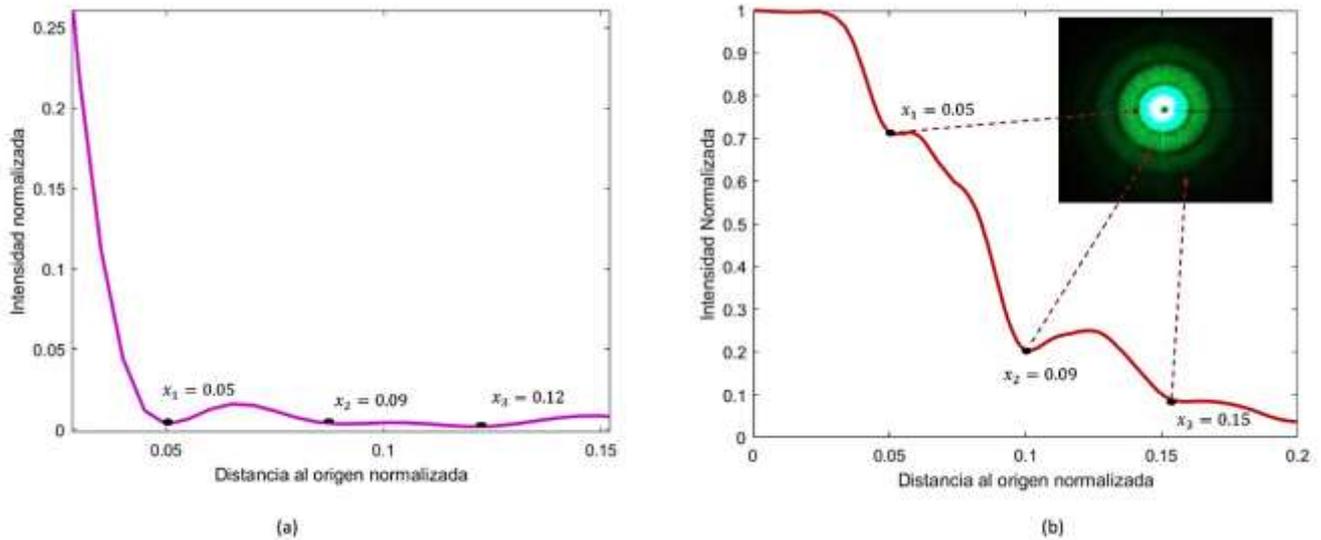


Figura 5.2. (a) Perfil de intensidad teórico, tomando un acercamiento de los mínimos locales y (b) Perfil de intensidad experimental por una monocapa de alta densidad con partículas de poliestireno rojas de $10 \mu m$.

Se puede observar que en ambos casos se presentan tres mínimos locales en el perfil de intensidad, los cuales se marcaron como x_1 , x_2 y x_3 . Para el mínimo local correspondiente a x_3 se puede observar, que para el perfil teórico tiene un valor de $x_3 = 0.12$ y para el perfil experimental un valor de $x_3 = 0.15$, por lo que hay una diferencia entre el cálculo teórico y el experimental del 25%.

Para el caso de la muestra correspondiente a una densidad baja y con partículas de diámetro de $5 \mu m$, se realiza de igual manera la comparación entre la gráfica teórica obtenida en el Capítulo 3, en la sección 3.2 la cual corresponde a la Fig. 3.4 y la gráfica experimental como se puede ver en la Fig. 5.3-(b).

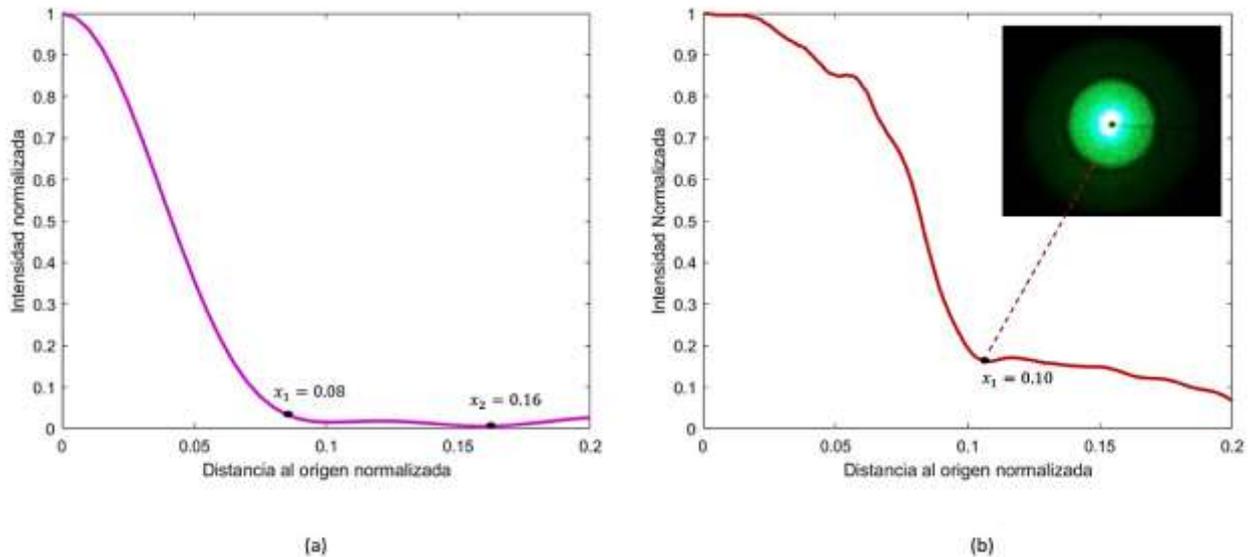


Figura 5.3. (a) Perfil de intensidad teórico y (b) Perfil de intensidad experimental por una monocapa de alta densidad con partículas de poliestireno rojas de $5 \mu\text{m}$.

Se puede observar que para el perfil teórico presenta dos mínimos locales en el perfil de intensidad, denominados de igual manera x_1 y x_2 . Para el perfil de intensidad experimental sólo presenta un mínimo local x_1 , es probable que el segundo mínimo local se encuentre en valores superiores a 0.2, por lo tanto, solo se compara este primer mínimo local con el perfil teórico, el cual presenta un valor de $x_1 = 0.08$ y con el perfil experimental que tiene como valor de $x_1 = 0.10$, presentando una diferencia entre el cálculo teórico y el experimental del 25%.

A partir de estos resultados correspondientes a las dos monocapas de partículas de poliestireno y comparadas con su parte teórica, se procedió con los siguientes experimentos.

5.2.2 MONOCAPA PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO ROJAS UTILIZANDO DISTINTOS TAMAÑOS.

En el caso en que se simula una muestra con anisocitosis o ver la evolución de un tratamiento, se utilizaron mezclas de las partículas de poliestireno rojas de $5 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ de diámetro, en las proporciones que se describen en el Capítulo 4, sección 4.3 y que se nombraron como: solución 1, solución 2, solución 3 y

solución 4. Se obtiene el perfil de intensidad y el patrón de esparcimiento, para cada una de las soluciones de estas monocapas (Fig. 5.4).

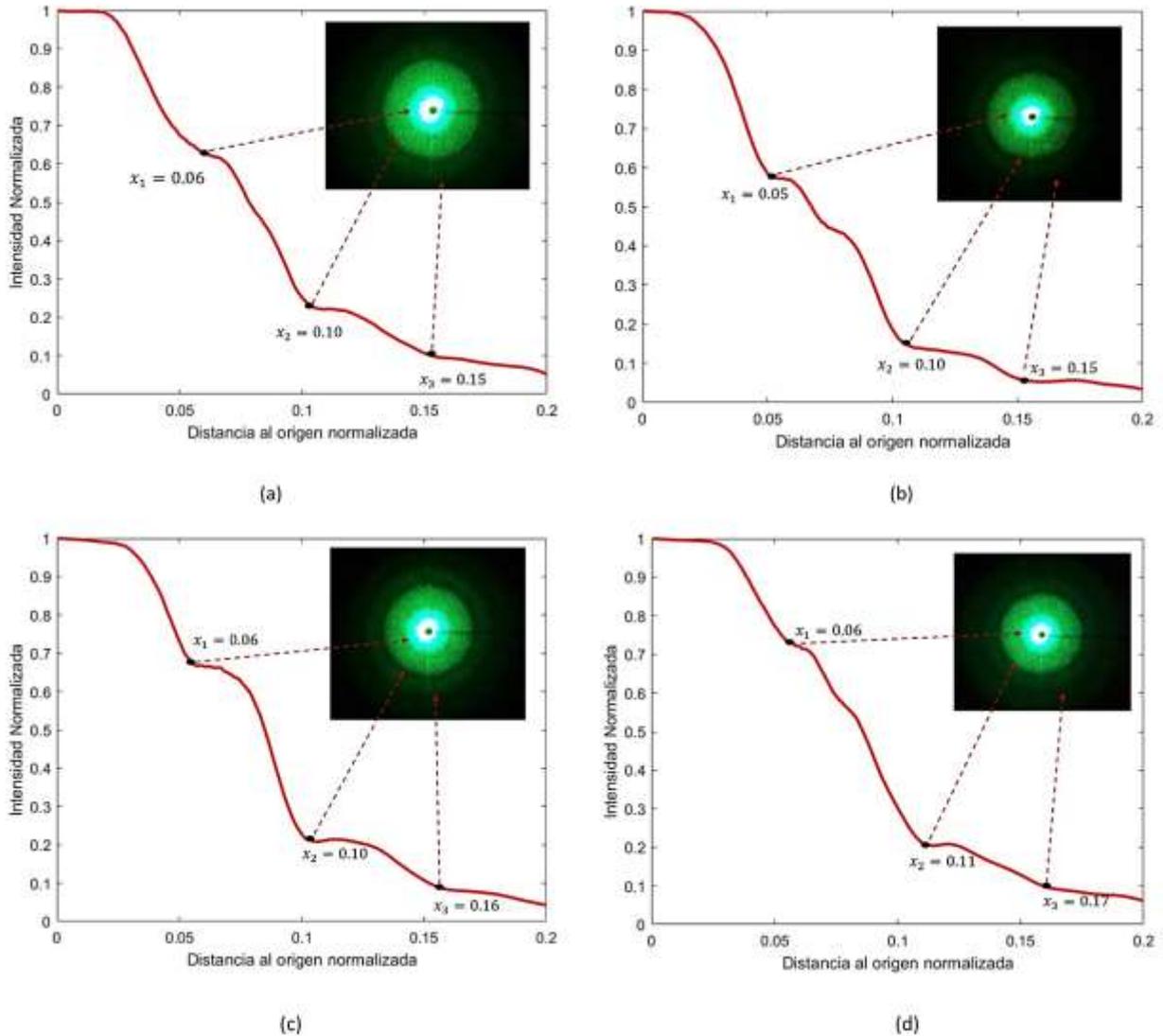


Figura 5.4. Perfil de intensidad y patrón de esparcimiento por una monocapa (a) Solución 1, (b) Solución 2 (c) Solución 3 y (d) Solución 4.

Para poder visualizar mejor este análisis se realizó una tabla comparativa (Tabla 5.1) de los mínimos locales del perfil de intensidad que se muestran en la Fig. 5.4 anterior, junto con los mínimos locales del modelo matemático correspondientes a las partículas de $5 \mu m$ y $10 \mu m$.

Tabla 5.1. Mínimos locales del perfil de intensidad de partículas de poliestireno.

MUESTRA MÍNIMO LOCAL	Solución					
	Teórica 5 μm	1 80% de 5 μm	2 50% de 5 μm	3 40% de 5 μm	4 20% de 5 μm	Teórica 10 μm
x_1	0.08	0.06	0.05	0.06	0.06	0.05
x_2	0.16	0.10	0.10	0.10	0.11	0.09
x_3	-	0.15	0.15	0.16	0.17	0.12

De acuerdo con los datos que se muestran en la *Tabla 5.1*, se puede observar la manera en que va disminuyendo en las soluciones el porcentaje de las partículas de $5 \mu m$, el perfil de intensidad va presentando un comportamiento similar al perfil de intensidad teórico al de las partículas de $10 \mu m$, presentando tres mínimos locales. Estos mínimos locales tienen una diferencia entre el cálculo teórico y el experimental del 20%, para el primer mínimo local x_1 en las soluciones 1, 3 y 4, para el segundo mínimo local x_2 un 11% en las soluciones 1, 2 y 3 y un 22% en la solución 4. Finalmente para el tercer mínimo local x_3 del 25% en las soluciones 1 y 2 y 41% en las soluciones 3 y 4.

La importancia de este análisis es percatarnos que a medida que va aumentando la proporción de las células con mayor diámetro, los anillos se van haciendo cada vez más pequeños y el perfil de intensidad va presentando un comportamiento semejante al perfil teórico, correspondiente a una muestra de partículas de $10 \mu m$, simulando una monocapa de una persona sana. Con base en estos datos podríamos proponer el monitoreo de una patología en función de algún tratamiento que vaya reestructurando el tamaño del eritrocito.

5.2.3 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS SANAS.

Conforme a los resultados anteriores que se obtuvieron con las partículas de poliestireno para calibrar el sistema óptico, se procedió a trabajar con células sanguíneas de donadores sanos proporcionados por el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, la preparación de las monocapas se describe en el Capítulo 4, en la sección 4.4.1. Se realiza la comparación entre la gráfica teórica obtenida en el Capítulo 3, en la sección 3.3, la cual corresponde a la Fig. 3.7, haciéndole un acercamiento a la gráfica, para que se pudieran apreciar los mínimos locales, como se observa en la Fig. 5.5-(a) y la gráfica experimental obtenida por la monocapa de eritrocitos sanos con un diámetro de $8 \mu\text{m}$ (Fig. 5.5-(b)).

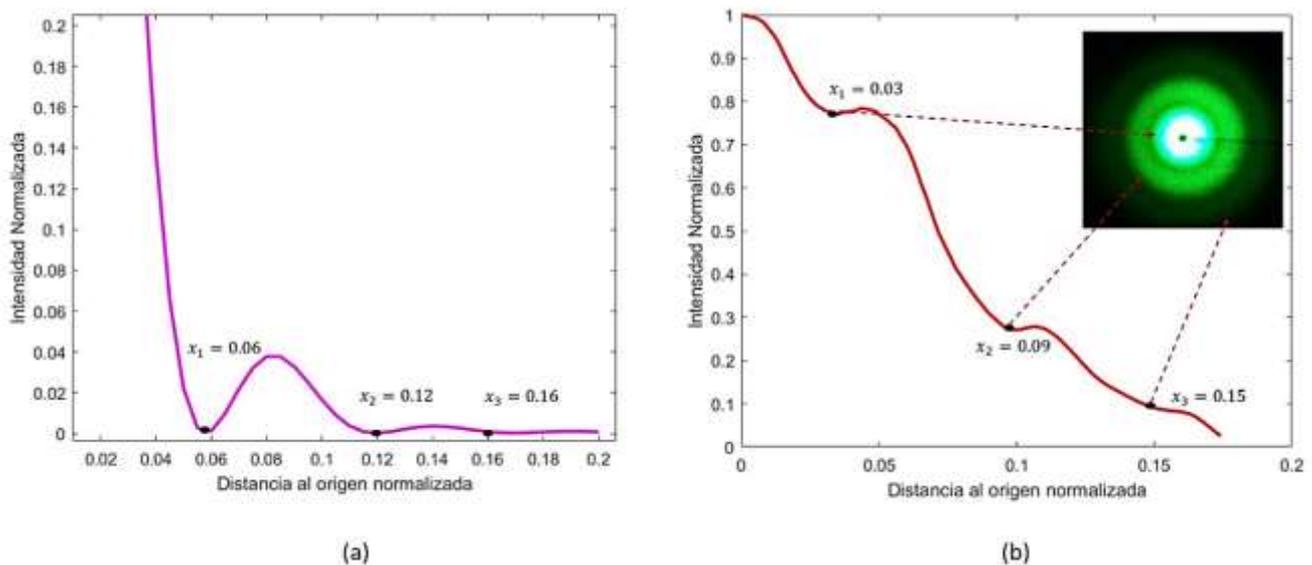


Figura 5.5. (a) Perfil de intensidad teórico, tomando un acercamiento de los mínimos locales y (b) Perfil de intensidad experimental por una monocapa de alta densidad con partículas de eritrocitos de $8 \mu\text{m}$.

Se puede observar que en ambos casos se presentan tres mínimos locales en el perfil de intensidad, los cuales se marcaron como x_1 , x_2 y x_3 . Para el primer mínimo local correspondiente a x_1 presenta una diferencia del 50%, el segundo mínimo local x_2 con 25% y para el tercer mínimo local x_3 del 6.2%.

5.2.4 MONOCAPA POR SOLUCIONES OSMÓTICAS.

Conforme a los resultados con las partículas de poliestireno rojas, donde se simula el monitoreo de una patología acorde a su tamaño, antes de analizar muestras de pacientes que presentan anemia se propone trabajar con células sanguíneas de donadores sanos proporcionados por el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, modificando su forma a través de soluciones osmóticas. La preparación de las monocapas se describe en el Capítulo 4, se nombraron soluciones: isotónica, hipotónica, e hipertónica. Para cada muestra correspondiente a las soluciones osmóticas mencionadas se obtiene un patrón de esparcimiento y un perfil de intensidad característico, representado por la gráfica de la Fig. 5.6.

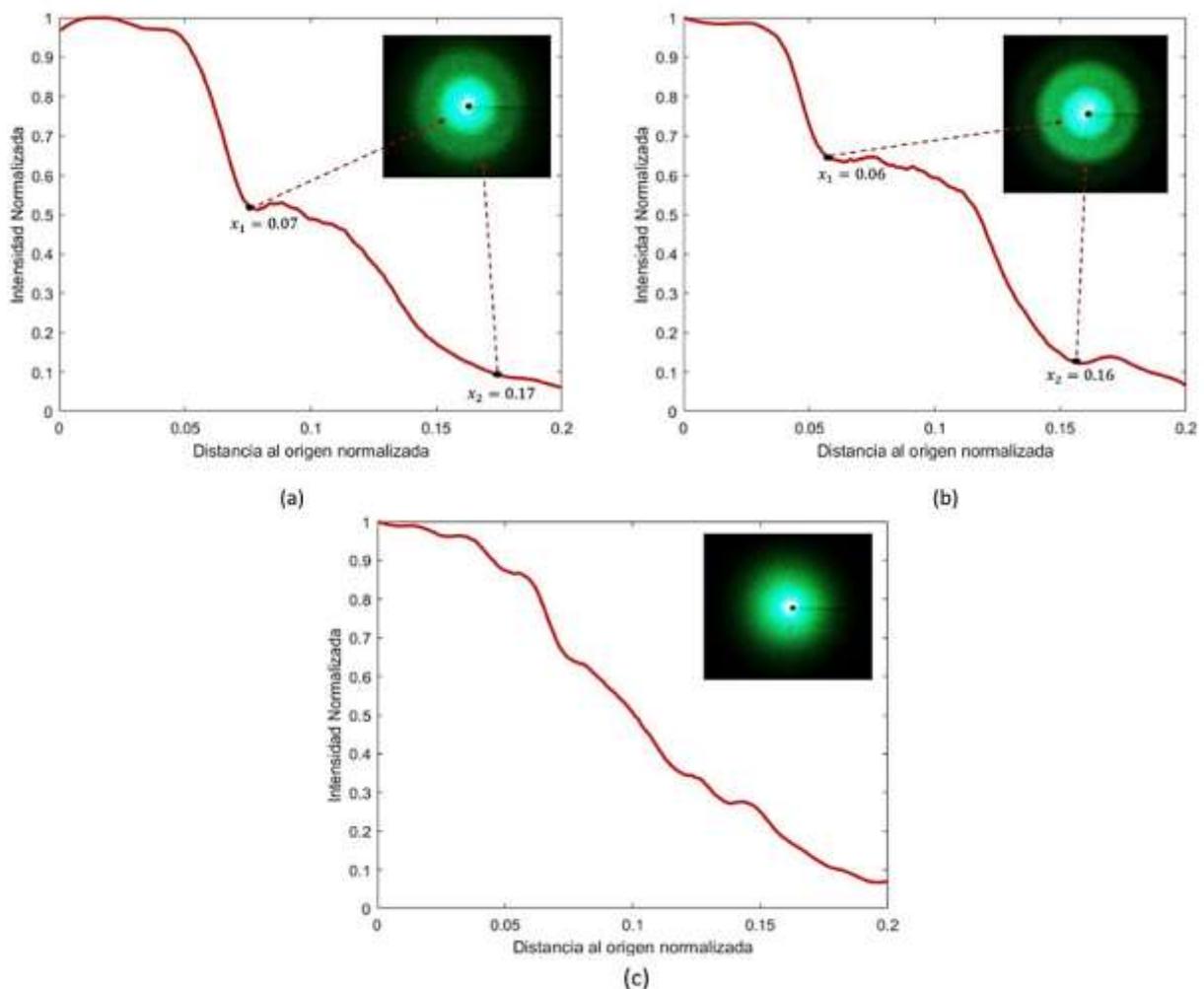


Figura 5.6. Perfil de intensidad y patrón de esparcimiento por una monocapa (a) Isotónica, (b) Hipotónica e (c) Hipertónica.

Para poder visualizar mejor este análisis se realizó una tabla comparativa (*Tabla 5.2.*) de los mínimos locales del perfil de intensidad que se muestran en la *Fig. 5.6* anterior, junto con el modelo matemático propuesto en el Capítulo 3, sección 3.3 correspondiente al perfil de intensidad teórico (*Fig. 3.7.*), esto con la finalidad de observar si es posible notar una diferencia en el perfil de intensidad al presentar cambios de los eritrocitos en su forma.

Tabla 5.2. Mínimos locales del perfil de intensidad de células sanguíneas (eritrocitos).

<i>MUESTRA</i> <i>MÍNIMO LOCAL</i>	Teórica 8 μm	Isotónica	Hipotónica	Hipertónica
x_1	0.06	0.07	0.06	-
x_2	0.12	0.17	0.16	-
x_3	0.16	-	-	-

De acuerdo con los datos que se muestran en la *Tabla 5.2*, se puede observar que para la muestra donde no tiene una alteración el eritrocito (isotónica), se muestran dos mínimos locales con diferencia entre el cálculo teórico y el experimental del 16.6% para el primer mínimo local y del 41.6% para el segundo mínimo local, para la muestra donde tiene un cambio en aumentar la forma el eritrocito (hipotónica), de igual manera presenta dos mínimos locales con un 33.3% para el segundo mínimo local. Finalmente, para una solución hipertónica, el eritrocito vierte todo su contenido al medio (lisis) provocando que pierda totalmente su forma, los anillos desaparecen de manera que el patrón de esparcimiento pierde los mínimos. Esto podría ser usado para evaluar condiciones en las que se pierde la forma del eritrocito, por ejemplo, en el fenómeno de Roleaux, donde debido a la agregación de los eritrocitos y al apilamiento se pierde la monocapa, así mismo su perfil de intensidad no presenta mínimos locales.

5.2.5 MONOCAPA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON ANEMIA.

Finalmente, de estos últimos resultados se procedió a hacer la comparativa entre una persona sana y con anemia ferropénica, con sangre proporcionada por donadores sanos y con anemia procedentes del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. La preparación de las monocapas se describe en el Capítulo 4, sección 4.4.3.

Primero se realizó el análisis de una muestra con anemia ferropénica, como se ve en la *Fig. 5.7*, el patrón de esparcimiento que presenta esta anemia es muy similar al patrón de esparcimiento de los eritrocitos suspendidos en una solución hipertónica, sin mostrar mínimos locales. De acuerdo con el protocolo de salud y seguridad por la pandemia debido al virus SARS-CoV-2, se pausaron las visitas y tomas de muestras de pacientes con anemia, por lo que el análisis se realizó a 10 muestras de sangre de pacientes donadores del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Cabe señalar que, dentro de estos 10 pacientes, dos de ellos ya llevaban un tratamiento médico, por lo que se realizó la comparativa de estos pacientes, junto con la de un paciente con anemia y una persona sana (*Fig. 5.8*).

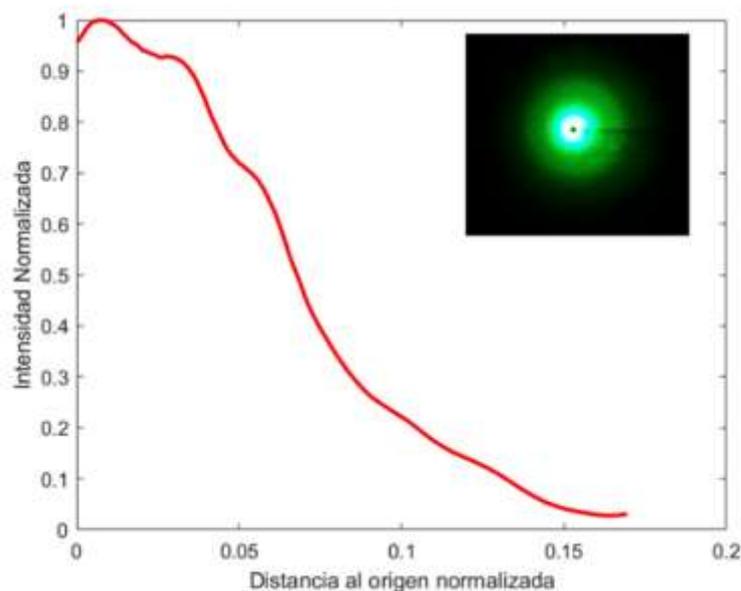


Figura 5.7. Perfil de intensidad y patrón de esparcimiento por una monocapa de células sanguíneas con anemia ferropénica

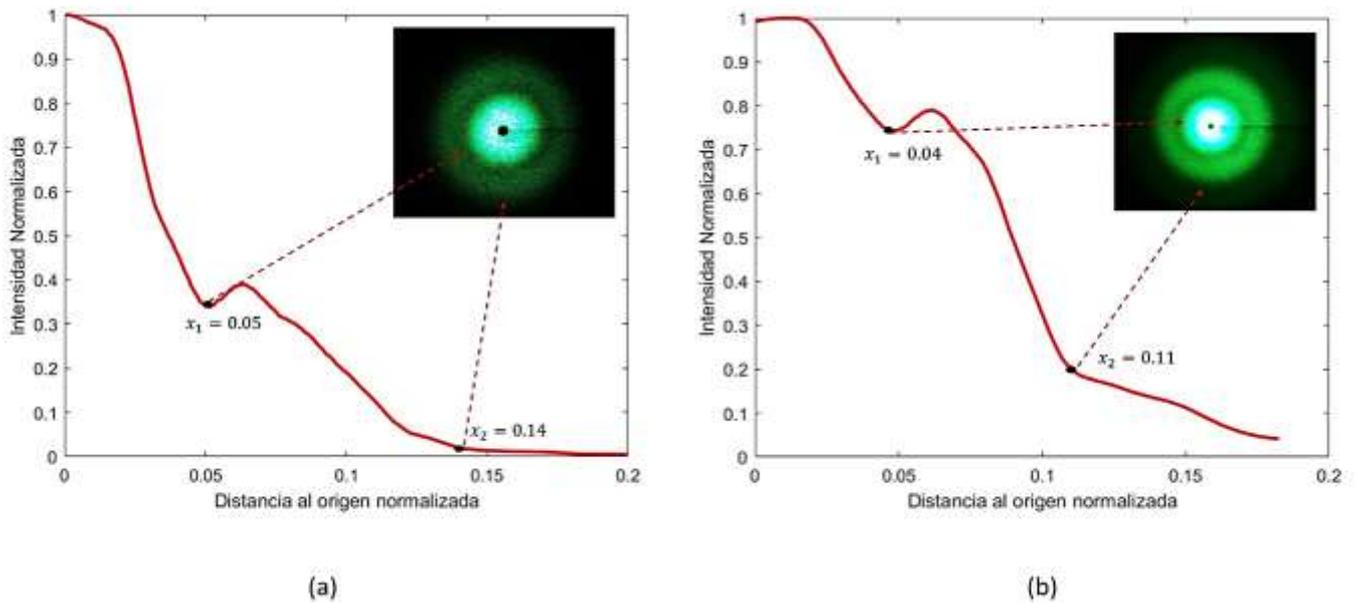


Figura 5.8. Perfil de intensidad y patrón de esparcimiento por una monocapa de células sanguíneas con anemia de (a) paciente 1 con tratamiento y (b) paciente 2 con tratamiento.

Se realizó una tabla comparativa (*Tabla 5.3.*) de los mínimos locales del perfil de intensidad que se muestran en la *Fig. 5.7* y *Fig. 5.8*, junto con el modelo matemático propuesto en el Capítulo 3, sección 3.3 correspondiente al perfil de intensidad teórico (*Fig. 3.7*), esto con la finalidad de observar si es posible notar una diferencia en el perfil de intensidad de un paciente que lleve un tratamiento.

Tabla 5.3. Mínimos locales del perfil de intensidad de células sanguíneas sanas y con anemia.

MUESTRA MÍNIMO LOCAL	Anemia	Paciente 1	Paciente 2	Sano	Teórica $8 \mu\text{m}$
x_1	-	0.05	0.04	0.03	0.06
x_2	-	0.14	0.11	0.09	0.12
x_3	-	-	-	0.15	0.16

De acuerdo con los datos que se muestran en la *Tabla 5.3*, se puede observar que la diferencia entre una persona sana y el cálculo teórico es de un 50%; para la muestra de los pacientes 1 y 2 que llevan un tratamiento médico, ya se logran

apreciar dos mínimos locales. Para el paciente 1 tiene una diferencia entre el cálculo teórico y el experimental del 16.6%, mientras que para el paciente 2 tiene una diferencia del 33.3% para el primer mínimo local y del 8.3% para el segundo mínimo local. Comparando el paciente 1 para el primer mínimo local con una persona sana se tiene una diferencia del 66.6% y para el paciente 2 un valor del 33.3%. Con estos últimos resultados se deja abierta la posibilidad de poder estudiar el patrón de esparcimiento en función del tiempo, para personas que lleven un tratamiento médico, ya que sus muestras si lograron hacer visibles mínimos locales en el perfil de intensidad.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizaron pruebas con un arreglo óptico relativamente simple para registrar el patrón de esparcimiento producido por una monocapa de partículas de poliestireno y de células sanguíneas humanas. Se utilizó una cámara de celular como sensor para capturar la proyección del patrón de esparcimiento de las monocapas estudiadas sobre una pantalla traslúcida. El sistema óptico propuesto tiene el objetivo de ofrecer las bases para la construcción de un posible dispositivo portátil, que nos permita determinar la morfología promedio de una gran cantidad de partículas o células fuera de un laboratorio especializado.

Se desarrolló un modelo teórico que describe el patrón de esparcimiento de una monocapa de micropartículas tenues (bajo contraste de índice de refracción) utilizando la teoría de Aproximación de Difracción Anómala (ADA). Este modelo nos permite simular el patrón de esparcimiento de monocapas de partículas con distintas morfologías y tamaños.

Se realizaron experimentos con las partículas de poliestireno monodispersas de color rojo de tamaños de $5\ \mu m$ y $10\ \mu m$ de diámetro. Estos experimentos permitieron calibrar el sistema óptico para el análisis del patrón de esparcimiento de células sanguíneas.

Con en el modelo teórico de ADA es posible describir el patrón de esparcimiento por partículas de poliestireno y al compararlos con los patrones obtenidos de forma experimental, se pudo calibrar el sistema óptico. Al simular células sanguíneas sanas se tuvo una diferencia del 25% en el tercer mínimo local correspondiente a las partículas de $10\ \mu m$, en los primeros mínimos locales no se presentó diferencia. Para mostrar que es posible detectar una malformación promedio en los eritrocitos de una muestra de sangre, es decir, que existiera un cambio en la forma promedio de los eritrocitos por alguna patología, se suspendieron eritrocitos sanos en soluciones con diferente concentración de NaCl para modificar su forma. En el caso de suspensiones hipotónicas se notó

una diferencia en la posición de los dos primeros mínimos locales calculados en el modelo y los observados experimentalmente del 33.3% Por lo que podemos afirmar que el sistema óptico puede identificar y cuantificar cambios en la morfología promedio de los eritrocitos y potencialmente eliminar el error humano, asociado al análisis por un observador.

Se realizó la comparación de la posición del primer mínimo local en el patrón de esparcimiento de los eritrocitos de dos pacientes con anemia que siguen un tratamiento médico y una persona sana. Encontrando una diferencia del 66.6% para el primer mínimo local correspondiente al paciente 1 y del 33.3% para el primer mínimo local del paciente 2. Estos resultados ofrecen evidencia clara que el sistema óptico propuesto en esta tesis podría ser de gran utilidad para el desarrollo de dispositivos rápidos que auxilien al prediagnóstico médico.

Es posible extender este trabajo a futuro, optimizando y estandarizando el análisis de las imágenes para minimizar el error y la incertidumbre asociado a las imágenes que nos proporciona el perfil de intensidad.

Bibliografía

- [1]. R. P. Feynman, R.B. Leighton y M. Sands, *The Feynman Lectures on Physics I.*, Ed. Ediciones Científicas Universitarias, USA (2010)
- [2]. E. Hecht, *Optics*, 5ª, Ed. Addison Wesley, EU (2014).
- [3]. Frank S., Crawford Jr. *Waves*, 3, Ed. Reverté (2009)
- [4]. I. Palomo, A. Ferreira, C. Sepúlveda, M. Roseblatt, U. Vergara, *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*, Ed Universidad de Talca, Chile (2009).
- [5]. Derrickson, G. T. *Principios de Anatomía y Fisiología*, 13, Ed. Médica Panamericana, CDMX, México (2013).
- [6]. Longo, Dan L. *Atlas de hematología y análisis de frotis de sangre periférica. Harrison. Principios de Medicina Interna*, 19ª Eds. Dennis Kasper, et al. McGraw Hill, (2019).
- [7]. C. F. Bohren, D. R. Huffman *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, A Wiley – Interscience Publication, Canadá (1998)
- [8]. H.C. v. d. Hulst, *Light scattering by small particles*, New York: Wiley (1957).
- [9]. O. Vázquez-Estrada, A. García-Valenzuela, *Optical reflectivity of a disordered monolayer of highly scattering particles: coherent scattering model versus experiment*, J. Opt.Soc, vol. 31, (2014).
- [10]. O. Vázquez-Estrada, A. García-Valenzuela, *Collimated light reflection and transmission of a surface partially covered by large and tenuous particles*, Applied Optics, 29, pp. 8657-8663 (2016).
- [11]. Streekstra, G. J., Hoekstra, A. G., Nijhof, E.-J., & Heethaar, R. M., *Light scattering by red blood cells in ektacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction*, Ed. Applied Optics (Vol. 32, Issue 13, p. 2266). The Optical Society. (1993).
- [12]. M. Hammer, D. Schweitzer, B. Michel, E. Thamm, and A. Kolb, *Single scattering by red blood cells.*, Appl. Opt. 37, 7410–7418 (1998).
- [13]. S. L. Jacques, *Optical properties of biological tissues: a review*. Phys. Med. Biol. 58, R37–R61 (2013).
- [14]. Gautam, R., Xiang, Y., Lamstein, J., Liang, Y., Bezryadina, A., Liang, G., Hansson, T., Wetzel, B., Preece, D., White, A., Silverman, M.,

- Kazarian, S., Xu, J., Morandotti, R., & Chen, Z., *Optical force-induced nonlinearity and self-guiding of light in human red blood cell suspensions.*, Ed. Light: Science & Applications (Vol. 8, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. (2019).
- [15]. Prasad, P. N., *Introduction to Biophotonics*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA (2003).
- [16]. B. Ulloa Rosero, M. T., *Fundamentos de Hematología.*, Ecuador : EDIMEC, (2017).
- [17]. J. Sans-Sabrafen, C. Basses Raebel, J.L. Vives Corrons., *Hematología Clínica.*, Ed. Elsevier, Madrid, España (2001).
- [18]. D. Blanco Laserna, *Light and waves. Huygens: light as a propagating wave.*, ISSN-L: 0210-1963, Vol. 191-775, (2015):
- [19]. Barrera, R. G., & García-Valenzuela, A. “Coherent reflectance in a system of random Mie scatterers and its relation to the effective-medium approach.” *Journal of the Optical Society of America A*. (2003).
- [20]. Moraleda Jiménez, J.M., “*Pregrado de Hematología*”, 4a Edición, Ed. Luzán 5, Madrid, España (2017).
- [21]. Jaime Pérez, J. C., Gómez Almaguer D., “*Hematología La sangre y sus enfermedades*””, 3a Edición, Ed. McGraw-Hill, México (2012).
- [22]. A. Merino, “*Alteraciones morfológicas de los eritrocitos*”, Servicio de Hemoterapia-Hemostasia, Centro de Diagnóstico Biomédico, Barcelona, España (2015).
- [23]. G. Campuzano Maya, “*Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos*”, *Medicina & Laboratorio*, Vol 1, (2008).
- [24]. Thomas, George B. “*Cálculo, varias variables.*” Ed. 12, PEARSON EDUCACIÓN, México, (2010).
- [25]. Lehmann, C. H. “*Geometría Analítica.*”, Ed. 1ª, México: Limusa/Noriega Editores, (1993).
- [26]. Thermo Scientific, Partículas fluorescentes de poliestireno Fluoro-Max, color rojo [<https://www.fishersci.es/shop/products/fluoro-max-green-red-dry-fluorescent-particles/11845072>] (03/12/21)

- [27]. O. W. Vázquez Estrada, Tesis: "*Reflectividad óptica de películas homogéneas y su aplicación a sensores.*", UNAM, Doctorado en Ingeniería Eléctrica- Instrumentación, México, CDMX (2017)
- [28]. E. Evans y R. Shalak, *Mechanics and thermodynamics of lipid biomembranes*, Ed. CRC Press, Michigan (1980).
- [29]. E. Evans, W. Rawicz., & Smith, B. A. *Concluding remarks Back to the future: mechanics and thermodynamics of lipid biomembranes*, Journal The Royal Society of Chemistry, Faraday Discuss, 161, pp 591-611(2013).
- [30]. Maltsev, V. P., Hoekstra, A. G., & Yurkin, M. A., *Optics of White Blood Cells: Optical Models, Simulations and Experiments*, Advanced Optical Flow Cytometry, 63-93 (2011).
- [31]. W.T. Silfvast, "*Laser Fundamentals*", 2a Edición, Ed. Cambridge University Press, (1992)
- [32]. KEYENCE CÁMARAS CMOS, Sistemas de visión: [https://www.keyence.com.mx/landing/vision/lp_vision-ystems_01090423] (14/10/21)
- [33]. J. José Ortega, "Anemias hemolíticas," An. Pediatría Contin., vol. 2, no. 1, (2004).
- [34]. 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, (1947).
- [35]. M. I. Mishchenko, "Multiple scattering by particles embedded in an absorbing medium. 1. Foldy-Lax equations, order-of-scattering expansion, and coherent field," Opt. Express 16, (2008).