

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD MONTERREY

Captura y marginación de partículas en la microvasculatura de un modelo in vivo

Tesis que presenta:

Oscar Alejandro Aguila Torres

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis: Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Apodaca, Nuevo León México.

Agosto, 2019

© Derechos reservados por Oscar Alejandro Aguila Torres 2019

La tesis presentada por Oscar Alejandro Aguila Torres fue aprobada por:

Dr. Carlos Ruiz Suárez

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Dr. Jesús Manuel Santana Solano, Director

Apodaca, Nuevo León México., 23 de Agosto de 2019

A mi abuela, María de los Angeles Torres, mi señora madre, Ana E. Torres y mi pareja, Jéssica Pérez, quienes me han apoyado en distintos sentidos para que pueda concluir satisfactoriamente esta etapa.

Agradecimientos

Agradezco al personal de CINVESTAV-Unidad Monterrey que facilitó el trabajo diario dentro de las instalaciones haciendo del Cinvestav un lugar agradable.

Agradezco a CONACyT por el apoyo económico que me permitió dedicarme a mis estudios y CINVESTAV-Unidad Monterrey y por la oportunidad de perseguir mis ambiciones académicas.

Al Doctor Gabriel Caballero quien me facilitó el uso de un equipo de grabación para mis experimentos.

Al Dr. Daniel Sánchez y al Dr. Carlos Ruiz quienes me facilitaron los recursos tanto económicos como administrativos para poder completar mis experimentos.

A mis compañeros Norman Cantú y Kevin Robledo quienes me brindaron su tan valiosa amistad, y que además, me compartieron de sus conocimientos en sus respectivas áreas.

Al Dr. Bruno Escalante por sus sabios consejos, así como el compartirme sus tan valiosas experiencias.

Por último, agradezco al Dr. Jesús Santana por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría bajo su tutela y por el tiempo brindado para resolver mis dudas.

Índice General

Ín	dice General	Ι		
Ín	Índice de Figuras Índice de Tablas			
Ín				
Re	esumen	IX		
A۱	bstract	XI		
1.	Introducción 1.1. Flujo sanguíneo 1.2. Vasos sanguíneos 1.3. Microcirculación 1.3.1. Fenómeno de vasomotilidad en capilares 1.4. Componentes principales de la sangre 1.5. Glóbulos rojos 1.5.1. Dinámica Tank Treading de glóbulos rojos 1.6. Difución y movimiento Browniano	1 2 3 4 4 5 6 8		
	1.7. Ecuaciones de Navier-Stokes para un fluido incompresible 1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.	12 13 14 17		
2.	Antecedentes 2.1. Estudios in vivo 2.2. Estudios in silico 2.3. Objetivos 2.3.1. General 2.3.2. Particulares	 21 21 23 24 24 24 		
3.	Materiales y métodos 3.1. Metodologia 3.1.1. Modelo in vivo 3.1.2. La utilización de la canulación para distintos propósitos 3.1.3. Anestestesia y preparación del animal para los procedimientos quirúrgicos 3.1.4. Canulación de la vena yugular 3.1.5. El uso del músculo cremáster para distintos fines científicos	25 25 25 26 26 26 27 28		

		3.1.6. Preparación del músculo cremáster	29
	3.2.	Video microscopía digital	31
	3.3.	Análisis de imágenes y trayectorias	32
		3.3.1. Análisis de imágenes de las partículas	32
	3.4.	Rapidez y distribución de partículas	35
4.	Res	ultados	37
	4.1.	Dinámica de partículas en un flujo de múltiples filas de glóbulos rojos	37
	4.2.	Dinámica de partículas en un flujo de transición (coexistencia entre una y	
		múltiples filas de glóbulos rojos)	46
	4.3.	Dinámica de partículas en un flujo de una sola fila de glóbulos rojos	50
5.	Con	nclusiones y perspectivas	59
	5.1.	Conclusiones	59
	5.2.	Perspectivas	60

Índice de Figuras

1.1.	Anatomía del corazón. A) Componentes anatómicos del corazón. B) Electrocardiograma registrado a partir de un evento eléctrico en el corazón, la frecuencia cardíaca se puede obtener a partir de este registro contando el número de ondas R que hay en un minuto. (Imagen tomada del libro Guyton página 101 y 121 respectivamente)	2
1.2.	Relación de las diferencias de presiones y resistencia que existen en cualquier vaso. (Imagen tomada del libro Guyton página 159)	3
1.3.	Representación de una morfología partícular de los vasos sanguíneos. (Imagen tomada de $< http://sistemacardiovascular902091.blogspot.com/2016/03/vasos-sanguineos.html>$).	4
1.4.	Esfinteresprecapilares.(Imagen $tomada \ de \ < http://sistemacardiovascular902091.blogspot.com/2016/03/esfinter-$	5
1.5.	$\begin{array}{c cccc} Componentes & principales & de & la\\ sangre. Imagen tomada de < https://es.khanacademy.org/science/biology/human-biology/circulatory-pulmonary/a/components-of-the-blood>). \\ \ldots $	6
1.6.	Esta figura muestra la habilidad de memoria de un glóbulo rojo . (A) Caricatura del eritrocito en estado de reposo. (B) Foto real de un eritrocido en reposo a través de la técnica DIC (Interferencia de contraste diferencial) [6]. (C) Eritrocito deformado al ser etrapedo por una pinza óptica [6]. Imagen A tomada de la such	7
1.7.	(A) El movimiento tank treading provoca una fuerza de elevación en los glóbulos rojos que fluyen en un capilar, lo cual tiende a empujarlos hacia el centro del vaso (Trayectoria T1). Asímismo, dicha fuerza impide que los eritrocitos migren hacia la periferia de los vasos (Trayectoria T2) [6]. (B) El movimiento tank treading provoca que el flujo circundante al glóbulo rojo se distorsione en la dirección del giro del mismo, asimismo la velocidad de la membrana del eritrocito tiene la misma magnitud que la velocidad del flujo adyacente (indicado por las flechas de colores)[46].(C) Otra de las causantes del movimiento TT es que en la periferia del vaso se forme una capa libre de células [40].	10
1.8.	Representación gráfica del flujo de Hagen Poiseuille	14
1.9.	Representación de los componentes sanguíneos celulares fluyendo en un vaso [12]. Asimismo, se esquematiza la migración lateral de partículas de tamaño microscópico como consecuencia de las interacciones entre partículas y glóbulos rojos, lo anterior, visto como una posible aplicación biomédica, una vez las partículas migren hacia la capa libre de células (CFL), su posible adhesión al endotelio, el cual se encuentra en la pared del paso. Por último, se muestra la	
	tendencia que tienen los eritrocitos a migrar hacia el centro del vaso. \ldots	18

1.10.	Perturbación de un flujo parabólico generado por la presencia de un glóbulo rojo con movimiento tank treading. (a) Campo de velocidades de un dipolo hidrodinámico (stresslet) alrededor de un glóbulo rojo con movimiento de <i>tank</i> <i>treading</i> . (b) El cambio en la trayectoria de una partícula esférica rígida al interaccionar hidrodinámicamente con un eritrocito [61]	19
2.1.	Fotografías representativas del flujo de las partículas de 1 μ m con los glóbulos rojos (figuras a-d), para estas simulaciones establecieron un hematocrito del 0.2. Asimismo se indica tanto la dirección del flujo como las trayectorias de partículas marcadas por las líneas de colores, así como el respectivo diámetro de cada vaso. [56]	24
3.1.	A) Curva de crecimiento de ratones de la cepa CD-1 (línea verde indica el peso para machos, mientras la línea negra para hembras), el cual está en función de su peso. B) Conformación de la vena yugular a la vena cava superior. Imagen A tomada de <http: laboratory-mice-and-rats.html="" method="" www.labome.es="">, figura B tomada de <https: es-revista-dialisis-trasplante-275-<br="" www.elsevier.es="">articulo-el-abordaje-yugular-S1886284511001093></https:></http:>	26
3.2.	A) El ratón listo para las preparaciones quirúrgicas. B) Canulación de la vena	07
<u></u>	yugular.	27
3.3. 3.4.	 Ruta metabolica de las particulas de polestireno	20
25	(C) se prosigue con la extension del músculo cremaster lo mas plano posible. [30]	30 20
3.6	Montaje experimental. Una vez realizadas las preparaciones quirúrgicas se coloca	50
0.0.	al ratón en el microscopio para el estudio.	31
3.7.	A) Imagen de campo claro donde se pueden apreciar glóbulos rojos en un vaso.(B) Superposición de trayectorias de las partículas en el vaso.	32
3.8.	Representación de una imagen en pixeles. a) Imagen original, b) Valores de intensidad para cada pixel sobre la imagen	33
3.9.	(A) Imagen correspondiente a un cuadro del vídeo, podemos observar a las partíclas en color blanco y el fondo en negro. (B) Imagen con los centroides localizados (marcados con una cruz roja y con un número para identificar a cada partícula) para las partículas correspondientes al cuadro del vídeo	34
3.10.	Mapa de rapidez correspondiente a un capilar de 10 um de diámetro. A) Imagen de campo claro, la cual servirá como referencia para seleccionar el área de análisis. B) Mapa de rapidez obtenido a partir de la imagen de campo claro donde la flecha de color blanco indica la dirección del flujo. C) Imagen A rotada 30° en dirección a las manecillas del reloj, donde el cuadrado de color blanco indica la zona de análisis.	36
	anansis	00

4.1.	Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 30 μ m, donde las flechas perpendículares al canal indican la zona de análisis, mientras que la flecha perpendi indica la dirección del fluio. A) Mapa de caler correspondiente e	
	la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a la anche del canel	20
4.2.	Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 23 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal	
4.3.	Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 20 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil	10
4.4.	Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 20 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil	42
4.5.	de concentración de partículas a lo ancho del canal	43
4.6.	de concentración de partículas a lo ancho del canal	45
4.7.	de concentración de particulas a lo ancho del canal	47
4.8.	de concentración de partículas a lo ancho del canal	48
4.9.	de concentración de partículas a lo ancho del canal	50
4.10.	de concentración de partículas a lo ancho del canal	52
	correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal	53

4.11. Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 9 μ m. A)	
Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor	
correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil	
de concentración de partículas a lo ancho del canal.	55
4.12. Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 8 μ m. A)	
Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor	
correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil	
de concentración de partículas a lo ancho del canal.	56
4.13. Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 8 μ m. A)	
Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor	
correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil	
de concentración de partículas a lo ancho del canal.	57

Índice de Tablas

Resumen

Se conoce como marginación a la migración lateral tanto de plaquetas como de células blancas hacia la capa libre de células [3][11][45][60][62], dicho proceso tiene una gran importancia biológica, debido a que las células anteriores necesitan aproximarse hacia las paredes del vaso para poder realizar sus funciones fisiológicas, por mencionar algunas: proceso de cicatrización, formación de trombos plaquetarios, procesos de inflamación, etc. Bajo la inspiración del fenómeno biológico de marginación se ha estudiado desde distintas perspectivas la dinámica de partículas de diferentes tamaños e incluso formas, con el objetivo de que estas imiten la migración lateral de células blancas y de plaquetas, con la intención de poder funcionalizarlas y así poder utilizarlas como posibles acarreadores de fármacos. Se ha demostrado que las partículas con diámetros \geq a 500 nm se aproximan hacia la periferia del vaso [16][31][36][56]. Una de sus limitantes, es que los estudios anteriores se han enfocado únicamente en estudiar la dinámica de partículas en arteriolas de diámetros \geq a 30 μ m dejando de lado si la marginación prevalece en los capilares, los cuales son cruciales para el transporte terapeútico de fármacos. En el presente trabajo se estudió la rapidez y la distribución vascular de partículas fluorescentes de poliestireno de 1 μ m de diámetro en la microvasculatura. El análisis se realizó a partir de las trayectorias individuales de cada partícula, una vez obtenida esa información, se procedió a la creación de mapas de calor (tanto de rapidez como de distribución de partículas) y posteriormente se obtuvieron histogramas para conocer la distribución de ambos parámetros. Las partículas se encontraban fluyendo en la microvasculatura del músculo cremáster de ratón, su administración se logró a través de la canulación de la vena yugular, para lo cual, se siguieron protocolos previamente establecidos [22]. Asimismo, la visualización se logró gracias a una cirugía realizada en el músculo cremáster a través de un protocolo previamente reportado [5]. Los resultados muestran que el umbral en función del diámetro del vaso que determina la marginación es de 14 μ m, además, los resultados sugieren que la marginación de partículas se ve modificada en gran medida por la presencia de bifurcaciones y trifurcaciones en la microvasculatura. También se encontró un umbral en el diámetro de los vasos de aproximadamente 20 μ m por abajo del cual el perfil de rapidez de las partículas tiende a ser uniforme a lo ancho del vaso.

Abstract

Margination refers to the lateral movement of white blood cells and platelets toward the cell free layer[3][11][45][60][62], such phenomenon has a strong biological importance, because the latter cells need to approach the vessel walls to perform their physiological functions, such that: healing process, formation of platelet thrombi, inflammation processes, etc. Inspired in the biological phenomenon of margination it has been studied from different perspectives the particles dynamics of different sizes and even shapes, aiming that mimic the lateral migration of the previous cells, with the goal of being able to functionalize them and thus can use them as possible drug carriers. Has been reported that particles with diameters \geq to 500 nm approach the periphery of the vessel [16][31][36][56]. The previous studies have focused only on studying the particle dynamics in arterioles of diameters \geq to 30 μ m without checking whether margination can be extended to capillaries, which are crucial sites for the rapeutic drug transport. This work studied the speed and the vascular distribution of polystyrene fluorescent particles of 1 μ m in diameter in the microvasculature. The analysis was performed based on the individual trajectories of each particle, then heat maps were created (both, speed and particle distribution) and finally histograms were obtained to know the distribution of both parameters. The particles were flowing in the microvasculature of mouse cremaster muscle, and it's administration was achieved through cannulation of jugular vein, for which reported protocols were followed [22]. Besides, particles visualization was achieved thanks to surgery performed on the cremaster muscle through a protocol previously reported [5]. The results show that the diameter threshold depending in the vessel diameter that determines the margination is 14 μ m, also, the results suggest that the particle margination is enhanced by the presence of bifurcations and trifurcations in the microvasculature. We also found a threshold in the diameter of the vessels of approximately 20 μ m below which the speed profile of the particles tend to be uniform across the width of the vessel.

Introducción

El corazón es un órgano de vital importancia debido a que aporta la presión necesaria para que la circulación se lleve a cabo. Anatómicamente (ver fig.1.1) está formado por dos bombas separadas: Un corazón derecho que bombea sangre hacia los pulmones y un corazón izquierdo que bombea sangre hacia los órganos periféricos. A su vez, cada uno de estos corazones es una bomba bicameral pulsátil formada por una aurícula y un ventrículo. Cada una de las aurículas es una bomba débil del ventrículo, y contribuyen transportando sangre hacia el ventrículo correspondiente. Posteriormente, los ventrículos aportan la fuerza del bombeo que impulsa la sangre: 1) Hacia la circulación pulmonar a través del ventrículo derecho y 2) Hacia la circulación periférica a través del ventrículo izquierdo. La pulsatibilidad cardíaca está acompañada por dos eventos: Uno eléctrico y uno mecánico, uno seguido del otro. Ahondando un poco en el evento mecánico, está compuesto por dos periodos: Uno de relajación denominado diástole, seguido de un periodo de contracción llamado sístole. La duración de la pulsatibilidad cardíaca, también conocida como ciclo cardíaco tiene una duración igual a la inversa de la frecuencia cardíaca (latidos por minuto). La presión media de la fuerza del bombeo del corazón es de 100 mmHg, y, al ser pulsatil el bombeo dicha presión oscila entre una presión sistólica de 120 mmHg y una presión diástolica de 80 mmHg [2].

Una forma de registrar las eventualidades del evento eléctrico es mediante un estudio conocido como *electrocardiograma*, el cual registra los voltajes eléctricos que el corazón genera, tiene una morfología muy particular, la cual se muestra en la figura (1.1B). Un electrocardiograma está formado por una onda P, un complejo QRS y una onda T. La onda P se produce por los potenciales eléctricos que se generan cuando se despolarizan las auriculas. Por otro lado, el complejo QRS se forma por los potenciales que se generan cuando se despolarizan los ventrículos antes de su contracción. Por último, la onda T se produce por los potenciales que se generan cuando los ventrículos se recuperan del estado de repolarización. Al igual que el corazón, la circulación se divide en dos: La circulación sistémica y circulación pulmonar, la principal diferencia radica en que la circulación sistémica aporta el flujo sanguíneo a todos los tejidos, excepto los pulmones [2].



Figura 1.1: Anatomía del corazón. A) Componentes anatómicos del corazón. B) Electrocardiograma registrado a partir de un evento eléctrico en el corazón, la frecuencia cardíaca se puede obtener a partir de este registro contando el número de ondas R que hay en un minuto. (Imagen tomada del libro Guyton página 101 y 121 respectivamente).

1.1 Flujo sanguíneo

El flujo sanguíneo es la cantidad de sangre que atraviesa una sección transversal en un punto dado de la circulación en un periodo de tiempo determinado. El flujo sanguíneo de toda la circulación en un hombre en reposo es de aproximadamente 5000 ml/min. Además, está determinado por dos factores 1) *El gradiente de presión* de la sangre que existe entre dos extremos de un vaso, y 2) *la resistencia vascular* (ver 1.2). En la figura 1.2 P1 representa la presión en el origen del vaso, mientras que P2 la presión en el otro extremo del mismo, a sabiendas de que P1 > P2, cabe mencionar que, a medida que el flujo sanguíneo pasa por la *circulación sistémica* la presión media va cayendo progresivamente hasta casi llegar a 0 mmHg. Por otro lado, la resistencia es la consecuencia de la fricción entre el fluido sanguíneo y el endotelio vascular [2].



Figura 1.2: Relación de las diferencias de presiones y resistencia que existen en cualquier vaso. (Imagen tomada del libro Guyton página 159).

1.2 Vasos sanguíneos

Para que la circulación pueda llevar a cabo su función, es decir, atender las necesidades del organismo: Transportando oxígeno y nutrientes hacia los tejidos, así como transportar los productos de desecho, requiere de conductos de transporte, a lo anterior se le conoce como: Vasos sanguíneos. La figura (1.3) muestra una representación de los vasos sanguíneos. Tenemos como vasos de mayor diámetro a las *arterias*, cuya función consiste en transportar la sangre con una presión alta hacia los tejidos, motivo por el cual tienen unas paredes vasculares fuertes y un flujo sanguíneo con una velocidad alta. Por otro lado tenemos a las arteriolas, las cuales son las últimas ramas pequeñas del sistema arterial y actúan controlando los conductos a través de los cuales se libera la sangre en los capilares, por lo que tienen paredes musculares fuertes que pueden cerrarlas por completo o que pueden relajarse, por lo que pueden alterar en gran medida el flujo sanguíneo, lo anterior en respuesta a las necesidades de cada tejido, las velocidades de flujo típica están alrededor de $2\frac{cm}{seg}$. Posteriormente tenemos a los *capilares*, los cuales son los vasos de menor diámetro, presentando velocidades de flujo típicas alrededor de $1\frac{mm}{seq}$ y además, es el sitio en donde se lleva a cabo el intercambio de líquidos y nutrientes. Por otro lado, tenemos a las ramas venosas, las cuales son comparables en diámetro al sistema arterial, pero, a diferencia de las ramas arteriales, estas tienen como función recoger y transportar los productos de desecho de las células. Primero, tenemos a las vénulas, las cuales recogen la sangre de los capilares y después se reúnen gradualmente formando venas de tamaño progresivamente mayor. Finalmente tenemos a las *venas*, las cuales funcionan como conductos para el transporte de sangre que vuelve desde las vénulas al corazón [2].



Figura 1.3: Representación de una morfología partícular de los vasos sanguíneos. (Imagen tomada de < http://sistemacardiovascular902091.blogspot.com/2016/03/vasos-sanguineos.html>).

1.3 Microcirculación

La función de la circulación tiene lugar en la microcirculación, es decir, *capilares*. Sus paredes son muy finas, construidas con una sola capa de células endoteliales muy permeables, por lo que el agua, los nutrientes y los restos celulares pueden intercambiarse con rapidez entre los tejidos y la sangre circulante. La circulación sistémica tiene alrededor de 10,000 millones de capilares [2].

1.3.1 Fenómeno de vasomotilidad en capilares

La sangre no fluye de manera continua en los capilares, sino que fluye de forma intermitente, la causa de dicha intermitencia es un fenómeno conocido como vasomotilidad. Lo anterior significa que, los vasos que regulan el flujo hacia los capilares (*arteriolas*) sufren de contracciones intermitentes a través de esfínteres, conocidos como esfínteres precapilares (1.4). Se sabe que el factor más importante en la regulación de la apertura - cierre de los esfínteres es la concentración de oxígeno en los tejidos [2].

1. Introducción



< http://sistemacardiovascular902091.blogspot.com/2016/03/esfinter-precapilar.html>).

1.4 Componentes principales de la sangre

La sangre es el fluído biológico más importante, está compuesto de una concentrada suspensión de células, las cuales se dividen en: Células rojas, células blancas y plaquetas, todas ellas inmersas en un fluido llamado plasma (ver fig.1.5). Este último contiene el 90 % del agua y está compuesto de varios solutos: fibrógeno, colesterol y albúminas, además tiene un comportamiento viscoso newtoniano, cuya viscosidad es aproximadamente de 1.2 cP. Por otro lado, la sangre posee un comportamiento no newtoniano (fluido adelgazante), su viscosidad oscila entre 3 - 4 cP y depende de los componentes celulares mas abundantes, es decir, los glóbulos rojos. El volumen total de sangre, en humanos, comprende aproximadamente el 8 % de la masa corporal[2].



1.5 Glóbulos rojos

Como se observa en la figura anterior (ver fig.1.5), las células sanguíneas mas abundantes son los glóbulos rojos, también conocidos como eritrocitos. En el sentido más estricto de la palabra no son consideradas como células, puesto que no cuentan con un núcleo ni otros órganelos. Su tiempo de vida es de aproximadamente 120 días, su concentración en sangre es de aproximadamente 5,200,000 células por mm^3 , asimismo se le conoce como hematocrito a la porción del volumen sanguíneo total que ocupan los eritrocitos, en condiciones normales es del 38 % (\pm 5). Bajo condiciones saludables y no sometidas a un estrés externo presentan una morfología de disco bicóncavo con un diámetro de 8 μ m y un grosor de 2 μ m, además de un volumen corpuscular de 80 - 100 μm^3 (ver fig.1.6 A). En situaciones de no equilibrio los glóbulos son capaces de deformarse para poder fluir a través de ellos. Estructuralmente están compuestos de 2 envolturas: Una capa externa y una interna. La primera es una bicapa lipídica fluida decorada con proteínas membranales, mientras que la capa interna está compuesta de un citoesqueleto hecho de tetrámeros de la proteína espectrina, los cuales forman una malla bidimensional [43]. Los nodos de esta malla están anclados a la bicapa lipídica a través de proteínas transmembranales 41. Dichos anclajes son móviles en la membrana, por lo que, tanto el esqueleto como los lípidos pueden deslizarse uno con respecto al otro[17]. Asimismo, la malla puede estirarse a través del desplazamiento de las proteínas de anclaje mientras la superficie total de la membrana permanece constante. Así que la deformación de los glóbulos rojos ocurre gracias a las proteínas transmembranales y una vez deformados ocurre una redistribución de volumen y un doblamiento de la membrana. Cabe mencionar, que además de la capacidad de doblamiento

de los glóbulos rojos, estos tienen la capacidad de volver a su forma original una vez que el estrés es cesado, a lo anterior se le conoce como propiedad de memoria [24] (ver fig.1.6 B-C). La función principal de los glóbulos rojos es la de transportar hemoglobina y, en consecuencia llevar oxígeno (O_2) desde los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono (CO_2) desde los tejidos a los pulmones. La hemoglobina (Hb) es la responsable del color rojo de la sangre y es la principal proteína de los eritrocitos (15 g/dl de sangre), dicha solución, la cual se encuentra en su citoplasma tiene una viscosidad aproximada de 7 cP (es decir, aproximadamente 6 veces mayor a la del plasma sanguíneo) y presenta un comportamiento de un fluido incompresible. Cada molécula de Hb está formada por 4 subunidades y cada sub-unidad consiste de un grupo hemo(los cuales contienen 1 átomo de hierro) unido a una globina. La fracción de hierro es la responsable de que el O_2 se una de forma reversible para formar el compuesto oxihemoglobina.



Figura 1.6: Esta figura muestra la habilidad de memoria de un glóbulo rojo . (A) Caricatura del eritrocito en estado de reposo. (B) Foto real de un eritrocido en reposo a través de la técnica DIC (Interferencia de contraste diferencial) [6]. (C) Eritrocito deformado al ser atrapado por una pinza óptica [6]. *Imagen A tomada de la web.*

1.5.1 Dinámica Tank Treading de glóbulos rojos

Como ya se ha mencionado, los glóbulos rojos juegan un papel de suma importancia en el organismo, por lo que no debería de resultar extraño que el interés puesto para su estudio sea alto, a pesar de ello, aún no se conoce en su totalidad los distintos comportamientos que los glóbulos rojos pudiesen tener, por enfatizar algún punto, la dinámica que los gobierna aún no es muy clara a niveles cuantitativos y bajo condiciones fisiológicas. Para el estudio de la dinámica de los glóbulos rojos, se ha tratado a los glóbulos rojos como capsulas viscoelásticas rellenas de un fluido newtoniano incompresible (hemoglobina). En condiciones de no equilibrio, los eritrocitos pueden tomar la dinámica de *rodamiento* y de *tumbos* [26], y a su vez asumir distintas morfologías tales como: Elongaciones, forma de zapatilla y de paracaídas ([23],[24],[27]). Esta variedad de comportamientos de los glóbulos rojos se debe fundamentalmente a la tasa de viscosidades entre el fluido interno y externo a las células. Gracias a la ausencia de elementos funcionales en el citoplasma da pie a que la membrana y el citoesqueleto puedan sufrir cambios conformacionales alrededor del citoplasma, lo anterior constituye el movimiento tank treading (TT), el cual produce una fuerza de elevación que los lleva hacia el centro del vaso (ver fig.1.7 A). En el 2012, Oishi y colaboradores estudiaron la interacción entre los glóbulos rojos y el flujo circundante, para su investigación decidieron crear una configuración experimental basada en la técnica de microscopía confocal que les permitiera apreciar con mucho detalle la dinámica de los glóbulos rojos al fluir en un canal microfluídico con las dimensiones típicas de un capilar sanguíneo. Para lograr lo anterior montaron una platina móvil al microscopio, la cual se desplaza en el sentido opuesto al flujo, de tal manera que el centroide de las células permanece prácticamente fijo en el área de escaneo del equipo. Asimismo, decidieron anclar a la membrana del glóbulo rojo partículas trazadoras fluorescentes de 0.2 μ m con el objetivo de observar la deformación y el movimiento de la membrana, además, para medir la velocidad del flujo en la parte exterior de las células rojas utilizaron partículas del mismo tamaño que las anteriores. En la figura 1.7 B, se observa una imagen representativa de sus experimentos, donde podemos apreciar claramente la línea media del canal (marcada con la línea vertical de trazos y puntos) y la dirección del flujo (señalada con una flecha). Las flechas de colores indican las distintas velocidades en la zona del canal, teniendo que aquellas de color rojo denotan la mayor velocidad $(1.4 mms^{-1})$ y las de colores más claros indican una velocidad cercana a $0 mms^{-1}$. Asímismo, para sus experimentos el ancho del canal es de $40\mu m$ y una altura de $30\mu m$. En la imagen podemos ver las distintas velocidades de las partículas trazadoras, notando que aquella que está más próxima a la línea media del canal lleva una mayor velocidad. Por último, se puede apreciar como el flujo adyacente al glóbulo rojo lleva la misma rapidez que la membrana del eritrocito y de igual manera, el flujo se ve distorsionado en la dirección de giro de la membrana del glóbulo rojo (marcado con las flechas de las partículas trazadoras) [46]. Esta característica de los glóbulos rojos está asociada a la fluidez o estiramiento de la membrana celular. Cabe señalar que los glóbulos rojos tienen que recorrer una distancia del orden de varios milímetros para que las células puedan completar la migración hacia el centro del vaso sanguíneo. Otra implicación que tiene el movimiento *tank treading*, es que en la periferia del vaso se forma una capa libre de células, la cual se encuentra adyacente a la pared del vaso, dando lugar al efecto Fahraeus-Lindquist [21] y provocando que los glóbulos rojos viajen más rápido que la velocidad promedio del plasma (ver fig.1.7 C). Trabajos teóricos predicen que el movimiento TT depende principalmente del índice de esfericidad [35], del esfuerzo de corte generado por el flujo, la viscosidad de la membrana del eritrocito [58] y de su propiedad de memoria [24].



Figura 1.7: (A) El movimiento tank treading provoca una fuerza de elevación en los glóbulos rojos que fluyen en un capilar, lo cual tiende a empujarlos hacia el centro del vaso (Trayectoria T1). Asímismo, dicha fuerza impide que los eritrocitos migren hacia la periferia de los vasos (Trayectoria T2) [6]. (B) El movimiento tank treading provoca que el flujo circundante al glóbulo rojo se distorsione en la dirección del giro del mismo, asimismo la velocidad de la membrana del eritrocito tiene la misma magnitud que la velocidad del flujo adyacente (indicado por las flechas de colores)[46].(C) Otra de las causantes del movimiento TT es que en la periferia del vaso se forme una capa libre de células [40].

1.6 Difusión y movimiento Browniano

Las partículas que se utilizan para estudiar el fenómeno de marginación se encuentran en el rango coloidal(20 nm y 3 μ m), y por lo tanto su dinámica depende de las colisiones (10²¹ por segundo) causadas por las moléculas del medio. El movimiento incesante de las moléculas del fluido hace que la macropartícula se mueva con un movimiento irregular y sin ninguna dirección preferencial si no hay ninguna fuerza externa actuando sobre ella. La fuerza que actúa sobre la partícula, en un instante dado está determinada por la integral de los gradientes de densidad instantáneos del solvente que se producen en la superficie de la partícula. Esta fuerza, debida a las fluctuaciones térmicas del solvente tiene un caracter aleatorio tanto en dirección como en magnitud. Este movimiento irregular es conocido como movimiento browniano. El movimiento browniano fue descrito por primera vez en el año 1828 por el botánico inglés Rober Brown. En sus investigaciones sobre el polen de diferentes plantas, observó que este se dispersaba en una gran cantidad de partículas pequeñas, las cuales percibía con un movimiento ininterrumpido e irregular. Varios científicos trataron de dar una explicación a este fenómeno, sin embargo, tal explicación fue dada por Einstein, utilizando la teoría de cinética molécular del calor. En su modelo consideró que el equilibrio dinámico de una partícula coloidal es causado por dos fuerzas de dirección opuesta. La primera es debida a la presión osmótica que actúa sobre la partícula y la segunda es originada por la agitación térmica del solvente. Con este modelo se encontró que para partículas esféricas, el coeficiente de difusión está dado por la relación:

$$D_b = \frac{k_B T}{\epsilon_0},\tag{1.1}$$

donde ϵ_0 es la fricción que experimenta la partícula en el medio en el que se encuentra. Para una esfera de diámetro σ y un fluido de viscosidad de corte η , ϵ_0 está dado por $\epsilon_0 = 3\pi\eta\sigma$. Otro resultado importante que Einstein encontró fue que el desplazamiento cuadrático medio y el coeficiente de difusión para una partícula browniana en el bulto está dado por la expresión,

$$W(t) = 6D_b t \tag{1.2}$$

la cual fue corroborada experimentalmente por Jean perrin en 1914. W(t) está definido por

$$W(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \langle (R_i(t) - R_i(0))^2 \rangle$$
(1.3)

donde $\langle (R_i(t) - R_i(0))^2 \rangle$ es el desplazamiento cuadrático medio de las partículas al tiempo t y N corresponde al número total de partículas. Al considerar partículas coloidales en un flujo cortante, como es el caso de los vasos sanguíneos, la dinámica de las partículas está dada por la competencia entre la difusión browniana, la convección y las interacciones entre partículas y glóbulos rojos.

1.7 Ecuaciones de Navier-Stokes para un fluido incompresible

Para describir la dinámica de un fluido se parte de la segunda ley de Newton de la mecánica clásica,

$$\frac{m}{\mathbf{V}}\frac{d\mathbf{v}}{dt} = \sum_{j} \frac{\mathbf{F}_{j}}{V} \Leftrightarrow \rho \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \sum_{j} \mathbf{f}_{j}$$
(1.4)

donde esta fue dividida por el volumen y \mathbf{f}_j representa la fuerza por unidad de volumen. La velocidad para una partícula en el fluido es una función de t y \mathbf{r} , y para que la velocidad de un volumen específico se escriba en función de (\mathbf{r}, t) , es necesario hacer una diferenciación con respecto al tiempo de la suma anterior en todas las direcciones del espacio, la cual se puede reescribir como:

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla)\mathbf{v}.$$
(1.5)

Sustituyendo esta ecuación en 1.4 se obtiene:

$$\sum_{j} \mathbf{f}_{j} = \rho \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right).$$
(1.6)

Por lo tanto, se obtiene:

$$\rho\left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla)\mathbf{v}\right) = -\nabla p + \nabla \cdot \tau + \mathbf{f}$$
(1.7)

la cual forma parte de las ecuaciones de Navier-Stokes, donde ρ es la densidad del fluido. De lado izquierdo de la ecuación se tienen los terminos inerciales. Donde el primer termino representa la aceleración dependiente del tiempo y en donde el segundo termino es la aceleración convectiva, la cual es una aceleración causada por un posible cambio en la velocidad debido a la posición,

donde un ejemplo de lo anterior, es la convergencia de fluidos al entrar en la boquilla de un ducto. De lado derecho, el primer termino corresponde al gradiente de presión, mientras que $\nabla \cdot \tau$ representa una cantidad tensorial, la cual contiene terminos desconocidos y por lo cual, no es directamente aplicable a los problemas prácticos. Por esta razón, es que se hacen hipótesis específicas sobre el comportamiento del fluido, un ejemplo de ello es la cantidad $\eta \nabla^2 \mathbf{v}$ la cual es usada en el caso de fluidos incompresibles y Newtonianos. Por último, se tiene la resultante de fuerzas que actuan en un fluido, la cual es indicada por la siguiente expresión, de donde se haran ciertas consideraciones, según sea el caso de que pudieran estar presentes diferentes fuerzas externas:

$$\sum_{j} \mathbf{f}_{j} = \mathbf{f}_{elec} + \mathbf{f}_{grav} = \rho_{elec} \mathbf{E} + \rho g \tag{1.8}$$

Otra ecuación necesaria es la ecuación de conservación de la masa. En el caso de un fluido incompresible, la densidad es una constante y la ecuación a utilizar es:

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0. \tag{1.9}$$

1.8 Número de Reynolds

El primer paso para modelar el comportamiento de un fluido es predecir si este es laminar o turbulento. En los problemas de ingeniería con los que se está mas familiarizado, es común encontrar flujos de tipo turbulento. Sin embargo, en los sistemas biológicos, específicamente en la microvasculatura, las dimensiones tan pequeñas que se manejan suprimen el desarrollo de la turbulencia, dando como resultado un flujo laminar. El número adimensional que describe la importancia relativa entre los efectos viscosos e inerciales, es conocido como número de Reynolds. Cuando se trabaja con un fluido Newtoniano incompresible, el fujo hidrodinámico es descrito por las ecuaciones de Navier-Stokes (sección 1.7), en donde la velocidad del fluido en (x, y, z)es representada por \mathbf{v} y la presión por p. Se reescala la velocidad (\mathbf{v}), la posición (x, y, z) y el tiempo (t), por una velocidad característica del fluido U_0 , una longitud característica del sistema (L_0) y una escala de tiempo definidia como (L_0/U_0) , respectivamente, dando como resultado:

$$Re\left(\frac{\partial \mathbf{u}'}{\partial t'} + (\mathbf{u}' \cdot \nabla')\mathbf{u}'\right) = -\nabla' p' + \eta \nabla'^2 \mathbf{u}',\tag{1.10}$$

donde las primas indican los cambios de variable en la ecuación (variables adimensionales) y donde R_e es el número de Reynolds:

$$R_e = \frac{\rho U_0 L_0}{\eta},\tag{1.11}$$

que es el cociente entre las fuerzas viscosas e inerciales.

De la expresión del número de Reynolds se observa que cuando la viscosidad es alta o la dimensión y velocidad característica del sistema son pequeñas, se obtienen pequeños valores de R_e . Bajo estas condiciones el lado izquierdo de la ecuación 1.10 es despreciable y en consecuencia el desarrollo de la turbulencia se suprime y se tiene un flujo de tipo laminar. En el caso de una arteriola de 100 μ m, el número de Reynolds es ≈ 0.7 (considerando una velocidad de flujo de 2 cm/seg). Por otro lado, en un capilar de diámetro de 7 μ m, el número de Reynolds es $\approx 1.7 \times 10^{-3}$ (considerando una velocidad de flujo de 1 mm/seg y una viscosidad de 0.03 $dyns/cm^2$).

1.9 Ley de Hagen Poiseuille

Las ecuaciones de Navier Stokes son representadas por una ecuación diferencial no lineal. Tales ecuaciones son dificiles de resolver analíticamente, excepto para algunos casos particulares. Uno de esos casos en los que esta ecuación tiene solución analítica, es el transporte de fluidos por un gradiente de presión en un canal infinito, tal y como se observa en la siguiente figura:



Figura 1.8: Representación gráfica del flujo de Hagen Poiseuille.

en donde el flujo es causado por el gradiente de presión $\frac{dp}{dx}$ en la dirección axial x. La ecuación de continuidad axisimétrica resultante para un fluido incompresible es la siguiente:

$$\frac{\partial u_x}{\partial x} = 0 \tag{1.12}$$

por lo que la velocidad axial, $u_x(r)$ es una función solamente de r, la cual es la coordenada radial. Utilizando esta ecuación de Navier Stokes para un fluido incompresible de viscosidad
uniforme y constante, la ecuación se reduce a:

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \mu \left\{ \frac{\partial^2 u_x}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_x}{\partial r} \right\}$$
(1.13)

$$\frac{\partial p}{\partial r} = 0 \tag{1.14}$$

La ecuación 1.14 muestra que la presión p_x es una función que depende solamente de x y, por lo tanto, el gradiente $\frac{\partial p}{\partial x}$, está definido y debe ser un parámetro del problema. Esto permite que la ecuación 1.13 sea integrada para que la velocidad u_x se pueda escribir como:

$$u_x(r) = \frac{r^2}{4\mu} \left(\frac{dp}{dx}\right) + C_1 \ln r + C_2$$
(1.15)

donde C_1 y C_2 son constantes de integración, las cuales se determinarán por la aplicación de condiciones de frontera. En el eje la velocidad no puede ser infinita, por lo tanto C_1 tiene que ser cero. Por lo tanto, la condición "no-slip.^{en} la pared de la tubería requiere que $u_x(R) = 0$ por lo que

$$C_2 = -\frac{R^2}{4\mu} \left(\frac{dp}{dx}\right) \tag{1.16}$$

por lo que la solución al flujo de Poiseuile en una tubería circular es:

$$u_x(r) = \frac{1}{4\mu} \left(-\frac{dp}{dx} \right) (R^2 - r^2)$$
(1.17)

donde las presiones p_1 y p_2 pueden ser medidas en dos localizaciones diferente en la dirección x a una distancia l para así poder determinar $\frac{dp}{dx} = (p_1 - p_2)/l$. A diferencia de lo que sucede en un dispositivo microfluídico donde no existen variaciones a lo largo del canal, y por lo tanto partículas o algunos otros modelos, siguen el perfil de velocidad parabólico descrito por la ecuación anterior, en los vasos sanguíneos no se sigue el mismo comportamiento debido a las variaciones y curvaturas que existen a lo largo de ellos. Se ha demostrado ampliamente que el perfil de velocidades de las células sanguíneas obedecen una ecuación diferente al del flujo parabólico:

$$u_x(r) = u_{max} \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^k \right) \tag{1.18}$$

donde $u_x(r)$ es la velocidad promedio del fluido, u_{max} es la velocidad en el centro del vaso y K

es el parámetro de modificación al perfil parabólico, el cual es mayor a 2 y que resulta en un perfil aplanado en comparación al perfil parabólico.

1.10 Marginación

Para llevar a cabo su función fisiológica, tanto células blancas como plaquetas tienen que viajar en proximidad a la pared de los vasos, lo anterior es posible gracias a un fenómeno conocido como marginación, el cual simplemente se refiere a la migración lateral de las células anteriores hacia la capa libre de células [11][45][3][62][60]. Las plaquetas tienen un tamaño aproximado de 2 - 3 μ m y presentan una rigidez 4 veces más grande que la de los glóbulos rojos [60] (ver células de color blanco en Fig. 1.9) y su concentración en sangre es de aproximadamente de 250, 000 células por mm^3 . Las plaquetas están involucradas en el proceso de cicatrización y actúan en respuesta a algún daño de los vasos sanguíneos por lo que requieren viajar en proximidad a la pared del vaso. Por otro lado, los glóbulos blancos son un conjunto de células, las cuales son ejecutoras de la respuesta inmune interviniendo en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos), y para cumplir sus funciones tienen que adherirse a la pared del vaso. En condiciones saludables, su concentración en sangre es de aproximadamente 8,000 células por mm^3 , dicha concentración incrementará una vez el sistema sea atacado por algún elemento patógeno o se presente algún proceso de inflamación. Tienen un diámetro aproximado de 15 -16 μ m y cualitativamente presentan una rigidez 10 veces mayor a la de los glóbulos rojos ([44]-[55])(ver células moradas en fig. 1.9 (WBC) por sus siglas en inglés). La marginación de estas células fue observada por primera vez en los vasos sanguíneos de un renacuajo en 1824 [54]. posteriormente fue observada en 1938, donde se correlacionó la marginación de células blancas con la agregación de células rojas [25]. Asimismo se ha demostrado que la razón de tal fenómeno es su rigidez y su tamaño, puesto que a una mayor rigidez la fuerza que da lugar al efecto de marginación va aumentando [42], contrario a lo que sucede con las células rojas sanas.

No debería resultar extraño, que el comportamiento dinámico tanto de plaquetas como de glóbulos blancos resulte de gran interés para posibles aplicaciones biomédicas. Un área que en los últimos años ha tomado un gran auge, es el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, en donde los blancos se encuentran ya sea en la pared del vaso sanguíneo o en los tejidos, los cuales se encuentran mas allá de la pared, por lo que el transporte del fármaco a través del volumen sanguíneo hacia la pared del vaso (marginación) es un pre requisito para su funcionalización, lo anterior se puede observar de manera esquemática en la figura 1.9, donde el objetivo de estos sistemas es administrar partículas (color azul) en el torrente sanguíneo (principalmente a nivel sistémico) para que estas interaccionen con los componentes celulares sanguíneos para posteriormente migrar hacia la capa libre de células (marginación), una vez ahí, a través de ligandos lograr que las partículas se adhieran (*adhesión*) a la pared del vaso



Figura 1.9: Representación de los componentes sanguíneos celulares fluyendo en un vaso [12]. Asimismo, se esquematiza la migración lateral de partículas de tamaño microscópico como consecuencia de las interacciones entre partículas y glóbulos rojos, lo anterior, visto como una posible aplicación biomédica, una vez las partículas migren hacia la capa libre de células (CFL), su posible adhesión al endotelio, el cual se encuentra en la pared del paso. Por último, se muestra la tendencia que tienen los eritrocitos a migrar hacia el centro del vaso.

para una liberación del fármaco en la pared e incluso a nivel tejido. En la última década se han realizado un gran número de estudios enfocados a la marginación de partículas desde distintas perspectivas, lo mas estudiado es la marginación de partículas en función de su forma v tamaño [12][16], así como la dependencia con el hematocrito y el estrés de corte causado por el flujo [61][50][37], sin embargo, la mayoría de los estudios han sido experimentos in vitro e incluso simulaciones computacionales, los cuales idealizan las condiciones bajo las que se realizan tales experimentos, alejandose en algunos casos, demasiado de las condiciones reales (fisiológicas) a las que un sistema biológico está expuesto. Una de las investigaciones representativas acerca de la dinámica que siguen las partículas en los vasos fue la realizada por Maryam y colaboradores [50] en el 2011, en donde estudiaron la migración lateral de partículas fluorescentes de 1 um en un tubo cilíndrico de vidrio de 50 μ m de diámetro a diferentes niveles de hematocrito (10, 15 y 20 %) a través de microscopía confocal. Dichos autores midieron el desplazamiento cuadrático medio (ver ec. (1.3)) de las partículas en la dirección perpendicular al flujo, encontrando una dependencia lineal en el tiempo. Tales resultados les permitieron definir un coeficiente de dispersión, el cual indica que la migración lateral de las partículas se debe a un movimiento caótico como consecuencia de la interacción entre los eritrocitos y las partículas, lo cual da lugar a una dispersión lateral de las partículas inducida por un esfuerzo cortante. Adicionalmente, analizaron la dependencia radial del coeficiente de dispersión, para lo anterior, dividieron el



Figura 1.10: Perturbación de un flujo parabólico generado por la presencia de un glóbulo rojo con movimiento tank treading. (a) Campo de velocidades de un dipolo hidrodinámico (stresslet) alrededor de un glóbulo rojo con movimiento de *tank treading*. (b) El cambio en la trayectoria de una partícula esférica rígida al interaccionar hidrodinámicamente con un eritrocito [61].

canal en 4 secciones radiales (0 - 0.25R, 0.25 - 0.50R, 0.50 - 0.75R y 0.75 - 1R, donde R es el radio del canal y el valor cero corresponde a la pared.). Sus resultados indican que el coeficiente de dispersión tiene un valor mayor para distancias cercanas al centro del canal (0.75-1R) y va disminuyendo conforme las partículas se acercan a la pared. Este efecto fomenta la migración lateral de partículas del centro del canal hacia la capa libre de células. Sus resultados muestran también que el coeficiente de dispersión aumenta linealmente en función del hematocrito y del estrés de corte. Tomando en cuenta los diferentes parámetros de los que depende el coeficiente de dispersión D_r , se ha encontrado que se puede normalizar como:

$$D_r^* = \frac{D_r - D_b}{Hct\dot{\gamma}d_{RBC}^2} \tag{1.19}$$

donde D_b es el coeficiente de difusión browniano (ec.1.1), $\dot{\gamma}$ es el estrés de corte y d_{RBC} es el diámetro de un glóbulo rojo. Esto implica que aunque el coeficiente D_b sea menor a D_r (en aproximadamente un orden de magnitud), el movimiento browniano juega un papel no despreciable para partículas de 1 μ m de diámetro. Se ha estimado que el umbral en el tamaño de partículas a partir del cual existe marginación es aproximadamente 0.5 μ m, lo cual se debe a que para diámetros inferiores el efecto dominante es el movimiento browniano [36]. Recientemente, se ha demostrado a través de simulaciones computacionales [19][37][61] que la interacción entre partículas y glóbulos rojos que causa la migración lateral de partículas es puramente hidrodinámica debido a un dipolo hidrodinámico (ver fig. 1.10) que se genera alrededor de las células y que trae como consecuencia una desviación de las trayectorias de las partículas en la dirección perpendicular al flujo.

Un segundo efecto que causa la migración lateral de partículas es conocido como efecto cascada, el cual se refiere a un movimiento lateral abrupto que lleva a las partículas que se encuentran a una distancia muy próxima de la pared del vaso hacia la capa libre de células. Este efecto surge gracias a la formación de microestructuras creadas por glóbulos rojos (clusters) y cavidades entre clusters adyacentes, las cuales se encuentran sin eritrocitos. Cabe mencionar que la mayoría de las cavidades se forman cerca de la capa libre de células debido a que en tal sitio existe una disminución en la concentración de glóbulos rojos, sin embargo, en ocasiones estas cavidades pueden encontrarse en la zona rica de glóbulos rojos. La marginación de partículas en este caso se debe a que cuando las partículas se desplazan en estas cavidades existe una probabilidad de que sean empujadas hacia la capa libre de células, va sea por un glóbulo rojo o bien por un cúmulo de estas células. La dinámica típica de una partícula que se margina por el efecto cascada consiste principlamente de tres fases: Un movimiento difusivo lento, un movimiento lateral abrupto que lleva a las partículas fuera de la zona rica de glóbulos rojos hacia la capa libre de células (efecto cascada) y una vez ahí, la posibilidad de que salgan de la capa libre de células es prácticamente nula. Cabe señalar que existe poca evidencia de este efecto en modelos in vivo [36] ya que la mayoría de los estudios acerca de este fenómeno se han realizado por métodos computacionales [59]. Sin embargo, en el contexto de la migración lateral de glóbulos blancos, se ha encontrado que la marginación de leucocitos se incrementa con la formación de agregados de eritrocitos en forma de pila de monedas (rouleaux)cerca de la capa libre de células [32][33][48][57].

2 Antecedentes

Este capítulo está dedicado a proporcionar un paronama general acerca de los estudios que se han realizado para comprender el fenómeno de marginación.

2.1 Estudios in vivo

En el 2013 Lee y colaboradores [36] estudiaron a través de microscopía intravital la distribución vascular de partículas esféricas de poliestireno 200 y 1000 nm de diámetro. Para su estudio, las partículas fueron recubiertas con polietilenglicol (*PEG*), lo anterior debido a que se ha demostrado en literatura que dicho compuesto biocompatible aumenta el tiempo de circulación de las partículas, asimismo los autores utilizaron un modelo in vivo, en este caso, ratones. Con la ayuda de una preparación quirúrgica visualizaron la microcirculación en la oreja del ratón, analizaron tanto arteriolas como vénulas de 20 - 30 μ m de diámetro. Para conocer la distribución de las partículas decidieron segmentar el vaso de interés en 5 capas, 2 capas externas, 2 capas internas y una intermedia, todas ellas de la misma magnitud. Para cuantificar el número de partículas en cada capa dividieron el número total de nanopartículas fluyendo en cada capa entre el número total de partículas contadas en el vaso, para así obtener la densidad normalizada de partículas por capa.

Para el caso de las partículas de 200 nm encontraron que estas se distribuían aleatoriamente en el vaso, es decir, no exhibían acumulamiento preferencial en ninguna capa, lo anterior se puede observar en la distribución de densidad, la cual presenta una distribución uniforme (ver fig. 1 en [36] B). Por otro lado, para las partículas de 1000 nm observaron un comportamiento totalmente distinto, estas últimas tendían a acumularse en las dos capas externas, las cuales se encontraban adyacentes a la pared del vaso, obteniendo que aproximadamente el 60 % del total de partículas permanece en las dos capas externas (0.0 - 0.2 y 0.8-1.0) en comparación al 15 % de las partículas que permanecen en las capas internas (0.2-0.4 y 0.6-0.8) y el resto en la capa intermedia (0.4-0.6) (ver fig.1 en [36] D), por lo que determinaron que las partículas de mayor diámetro están aproximadamente 3 veces más concentradas cerca de las paredes del vaso que las partículas de menor tamaño. De su investigación concluyen que solamente las partículas en el rango de 500 - 1000 nm tienen mayor propensión a marginarse, mientras que las partículas inferiores al rango anterior tienden a circular en todo el ancho del canal con una migración lateral gobernada únicamente por el movimiento browniano de las partículas.

2.2 Estudios in silico

En el 2017 Naoki Takeishi y colaboradores [56] decidieron corroborar si los resultados arrojados por otros grupos de investigación, los cuales estudiaban el fenómeno de marginación pero en condiciones vasculares macroscópias, es decir, arteriolas y vénulas de gran tamaño, podían extrapolarse a los capilares. Por lo que a través de una simulación computacional investigaron el comportamiento de partículas de 1 μ m de diámetro en la microvasculatura. Para sus simulaciones consideraron vasos de 8, 10, 12 y 22 μ m de diámetro, asimismo modelaron a los glóbulo rojos como una cápsula bicóncava encerrada por una membrana elástica delgada de 8 μ m de diámetro (Para más detalles, ver referencia). Los autores encontraron algunas singularidades, como por ejemplo, en el vaso de menor diámetro (8 μ m) observaron un flujo de una sola fila de células lo cual genera línea de flujos en el plasma en forma de vórtices en los espacios que se encuentran libres de células. Debido a esto la mayoría de las partículas fluyen entre los espacios de glóbulos rojos con travectorias tipo vórtices, por lo que los autores lo denominaron como evento de captura (ver fig.2.1 a). Similarmente, encontraron para el vaso de 10 μ m, donde la única diferencia encontrada fue que el flujo de una sola fila fue aún más marcado que para el caso del vaso anterior (ver fig.2.1 b). Caso totalmente distinto para el vaso de 12 μ m, donde observaron que la mayoría de las partículas se encontraban marginadas en la capa libre de células (ver fig.2.1 c), mientras que para el vaso de mayor diámetro (22 μ m) encontraron los mismos resultados que el caso anterior, con la diferencia de que los glóbulos rojos exhibían un flujo de múltiples filas (ver fig.2.1 d). Concluyen que las micro partículas no exhiben el fenómeno de marginación para el caso de capilares con diámetro $< 12 \ \mu m$, ya que son capturadas entre los glóbulos rojos, por lo que al haber utilizado un modelo in silico, los autores esperan que sus resultados puedan ser corroborados por un modelo in vivo bajo sus mismas condiciones.



Figura 2.1: Fotografías representativas del flujo de las partículas de 1 μ m con los glóbulos rojos (figuras a-d), para estas simulaciones establecieron un hematocrito del 0.2. Asimismo se indica tanto la dirección del flujo como las trayectorias de partículas marcadas por las líneas de colores, así como el respectivo diámetro de cada vaso. [56].

2.3 Objetivos

En el presente trabajo se analiza el fenómeno de marginación desde un enfoque cuantitativo, en el que se miden los parámetros de rapidez, así como la distribución de las partículas en distintos diámetros de la microcirculación.

2.3.1 General

Estudiar la captura y marginación de partículas de 1 um de diámetro en la microvasculatura.

2.3.2 Particulares

El presente estudio se desarrolló bajo los siguientes objetivos particulares.

- 1. Desarrollar una configuración experimental que nos permita la administración de partículas y la visualización de la microcirculación con buena resolución (espacial y temporal).
- 2. Implementar un algoritmo que nos permita obtener el diámetro del vaso, así como la identificación de las partículas.
- 3. Determinar los criterios para establecer si las partículas están atrapadas o marginadas, en función del diámetro del vaso y su ubicación en el vaso.

B Materiales y métodos

3.1 Metodologia

3.1.1 Modelo in vivo

En el presente trabajo se utilizaron ratones como modelo, de la cepa CD-1, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de cinvestav Zacatenco. Se trabajaron con ratones de 6 - 8 semanas de edad, correspondientes a un peso de 35-40 g aproximadamente, según su curva de crecimiento (ver fig.3.1 A).

3.1.2 La utilización de la canulación para distintos propósitos

La canulación tanto arterial como venosa ha sido usada desde tiempo atrás en el campo de la investigación [9][10]. Esta técnica puede ser utilizada para el monitoreo de parámetros hemodinámicos, como la presión arterial media (MAP) y la presión venosa central (CVP)[53][15]. Asimismo, la cateterización permite la infusión de fármacos, sustancias, así como el muestreo de sangre, etc. En el presente trabajo se canulará la vena yugular para el suministro de partículas a través de esa vía, puesto que dicha vena conforme va descendiendo se convierte en la vena cava, así aseguraremos que nuestras partículas se dispersen de manera sistémica y lleguen hacia el músculo cremáster (ver fig.3.1 B).



Figura 3.1: A) Curva de crecimiento de ratones de la cepa CD-1 (línea verde indica el peso para machos, mientras la línea negra para hembras), el cual está en función de su peso. B) Conformación de la vena yugular a la vena cava superior. Imagen A tomada de http://www.labome.es/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html, figura B tomada de https://www.elsevier.es/es-revista-dialisis-trasplante-275-articulo-el-abordaje-yugular-S1886284511001093.

3.1.3 Anestestesia y preparación del animal para los procedimientos quirúrgicos

Se siguieron protocolos aprobados por las comisiones de ética. Se utilizaron ratones de la cepa ICR – CDR de 6 – 8 semanas de edad, puesto que para tal edad el músculo tiene un grosor de aproximadamente 70 μm , óptimo para su visualización a través del microscopio. El ratón es anestesiado de manera intraperitoneal con ketamina / xylazina (60 mg/kg). Durante la cirugía se mantuvo la anestesia a través de suplementos de 10 – 20 % de la dosis inicial (En intervalos indicados por la respuesta del ratón al pinchar la cola). Como cualquier preparación quirúrgica se monitorearon signos vitales del ratón (presión cardiaca y ECG), asímismo se mantuvo la temperatura constante del ratón a 36 - 37 grados.

3.1.4 Canulación de la vena yugular

Se posiciona al ratón de forma supina sobre el pedestal, con sus extremidades estiradas radialmente hacia los bordes de la base, aseguradas con pedazos de cinta para mantener su posición durante los procedimientos quirúrgicos (ver fig.3.2 A). Para la cateterización de la vena yugular se extiende el cuello, lo anterior para mejorar la exposición de la vena, se logra mediante

3. Materiales y métodos

la colocación de un hilo en el diente superior del ratón, el cual irá anclado a la parte superior del pedestal. Posteriormente se realizará una incisión ventral a la derecha de la línea media del cuello al nivel de la clavícula. Se prosigue con la separación de la yugular de los tejidos linfáticos y salivares. Una vez expuesta, se colocan dos hilos en los extremos del vaso (para asegurar posteriormente al catéter), después se realiza una pequeña incisión en el vaso lo suficientemente larga para que el catéter pueda entrar sin dificultades. Por último, se prosigue con la inserción del catéter en el vaso, el cual se insertará en la dirección de la ubicación del corazón, una vez adentro se asegura con los dos hilos previamente colocados (ver fig.3.2 B)(protocolo desarrollado por [22]).



Figura 3.2: A) El ratón listo para las preparaciones quirúrgicas. B) Canulación de la vena yugular.

3.1.4.1. Ruta metabólica de las partículas

Una vez canulada la vena yugular (como se observa en la fig. 3.2 B), se procede a la disección del músculo cremáster (como se detalla en la siguientes secciones) con el objetivo de visualizar las partículas a través del microscopio gracias a su fluorescencia. Al ser administradas a nivel sistémico, antes de llegar al músculo cremáster las partículas tienen que recorrer un largo trayecto, pasando por distintos sitios del organismo (pulmón, riñón, hígado, etc). Como se observa en la figura 3.1B, la vena yugular posteriormente se convierte en la vena cava, una vez ahí, las partículas entrarán a la aurícula derecha para después pasar al ventrículo izquierdo, enseguida, a través de la arteria pulmonar las partículas se dispersarán hacia los pulmones, posteriormente ingresarán a la aurícula izquierda a través de las venas pulmonares para después pasar hacia el ventrículo izquierdo en donde saldrán dispersas de manera sistémica a todo el organismo a través de la arteria aorta, tal y como se ilustra en la figura 3.3 (Para un mayor entendimiento del recorrido ver fig. 1.1A donde se detalla la anatomía del corazón).



Figura 3.3: Ruta metabólica de las partículas de poliestireno.

3.1.5 El uso del músculo cremáster para distintos fines científicos

Este modelo ha sido usado para estudios de distintas índoles, fue utilizado por primera vez para el estudio de la inflamación usando histología y microscopía de electrones post morten [38][39]. Asimismo el primer reporte de este modelo in vivo fue utilizado para investigar las respuestas microvasculares de fármacos vasoactivos utilizando luz reflejada [30]. Sin embargo las preparaciones anteriores tenían ciertas deficiencias en la disección del músculo, una de ellas fue que el músculo mostraba curvaturas, fue entonces que años después el mayor avance en cuanto a la disección implicó abrir el músculo, separarlo del testículo y extenderlo radialmente tan plano como se pudiera para una posterior transiluminación a través de un microscopio [4]. Tal preparación se ha utilizado para distintos enfoques, tales como: El estudio de la fisiología de la microcirculación en ratas [7] y en hamsters [18]. La mayor ventaja de este músculo es que tanto funcional como estructuralmente es similar a otros músculos esqueléticos, y además tiene un grosor y una transparencia que facilitan la visualización a través del microscopio.

3.1.6 Preparación del músculo cremáster

El cremáster es un músculo esquelético, se deriva de los músculos internos del abdomen (oblicuo y transverso) a medida que los testículos descienden a través del canal inguinal. Su función es dar soporte y mantener la temperatura de los testículos a través de contracciones o relajaciones de los mismos. Para la disección del músculo cremáster se seguirá el protocolo desarrollado por [5], el cual se describe brevemente: Se realiza una incisión a lo largo de la superficie ventral del saco del escroto, una vez realizada la incisión se debe de identificar la superficie del músculo cremáster, el cual se debe de observar como una capa delgada de tejido que recubre a los testículos, a partir de aquí se empieza a irrigar el músculo con PBS para mantenerlo húmedo y a temperatura normal (37 C) (ver fig.3.4 A). Asimismo se debe de remover el tejido conectivo y conjuntivo que mantiene unido al testículo con el tejido circundante (ver fig.3.4 B). Se extiende radialmente la superficie externa del músculo sobre el pedestal de PDMS. El músculo se asegura con aproximadamente 5 -6 agujas de acupuntura(grosor de 25 μm) para que el mismo quede lo más plano posible (ver fig.3.4 C).



Figura 3.4: Esta figura muestra los distintos pasos para la preparación del músculo cremáster. (A) Se realiza una pequeña incisión sobre la piel de los testículos. (B) Se separa la piel y el tejido conectivo, para así tener una mejor exposición de los testículos. (C) Se prosigue con la extensión del músculo cremáster lo más plano posible. [30]

Tal y como se mencionó en la sección 3.1.6 esta técnica ha sido utilizada para diversos enfoques. Una vez dominada la técnica permite la observación clara y directa de la microvasculatura para estudios in vivo, tal y como se observa en la figura 3.5, donde podemos ver con bastante claridad tanto arterias, como arteriolas y capilares.



Figura 3.5: Visualización de la vasculatura del músculo cremaster con un objetivo de 10X.

3.2 Video microscopía digital

Para cada experimento se generaron vídeos con ayuda de un microscopio de epifluorescencia, un vídeo en campo claro y uno de fluorescencia. El vídeo de campo claro se generó con el objetivo de visualizar el flujo de glóbulos rojos y poder determinar el borde de los vasos, y el de fluorescencia para observar el flujo de partículas. Los vídeos fueron grabados a 500 cuadros por segundo con una duración de 11 segundos cada uno, haciendo un total de aproximadamente 5100 imágenes por video. Las grabaciones se obtuvieron por medio de una cámara rápida (FASTCAM SA3 modelo 60K-M1), la cual se montó sobre el microscopio (Olympus BX51) utilizando un objetivo de 50X (n.a 0.50), con una resolución espacial de 512 × 512 pixeles, lo que genera un área de captura de 186 μm^2 . Cada video se analizó directamente para obtener las posiciones de cada partícula, posteriormente se ligaron las posiciones para generar trayectorias, y con cada trayectoria se calculó la rápidez para cada una de ellas. Una vez completada la preparación se coloca en el microscopio para la visualización de la microcirculación (ver fig.3.6).



Figura 3.6: Montaje experimental. Una vez realizadas las preparaciones quirúrgicas se coloca al ratón en el microscopio para el estudio.



Figura 3.7: A) Imagen de campo claro donde se pueden apreciar glóbulos rojos en un vaso. (B) Superposición de trayectorias de las partículas en el vaso.

3.3 Análisis de imágenes y trayectorias

La ciencia de imágenes es una disciplina de reciente creación y se basa en la implementación de filtros de distinta naturaleza para cuantificar la información contenida en las imágenes. En esta disciplina se manejan a las imágenes como una colección de información cuantificada y localizada. Cada punto en el espacio es representado por un pixel, en el cual se almacena la cantidad de intensidad luminiscente en una posición específica. Para extraer información de dicho sistema se realizan operaciones matemáticas con la colección de números junto con su posición. En el presente trabajo se utilizan implementaciónes en MatLab de un programa desarrollado con anterioridad en IDL [13], lo anterior con el propósito de extraer las trayectorias contenidas en cada video. También se programaron las herramientas necesarias para procesar la información obtenida de las trayectorias.

3.3.1 Análisis de imágenes de las partículas

Los vídeos son secuencias de imágenes separadas por intervalos de tiempos constantes. Esto nos permite registrar diversos sucesos físicos/biológicos como la motilidad de microorganismos o células, para posteriormente obtener sus trayectorias, midiendo cantidades físicas como la rapidez, velocidad, aceleración, etc. El inverso del intervalo de tiempo que transcurre entre



Figura 3.8: Representación de una imagen en pixeles. a) Imagen original, b) Valores de intensidad para cada pixel sobre la imagen.

imágenes es conocido como la frecuencia de adquisición o los cuadros por segundo. Las imágenes se registran de manera digital en formato cuantificado por medio de pixeles, los cuales registran una intensidad de color para un área dada, así se construye una imagen que consta de nXmpixeles (ver fig.3.8). Para poder cuantificar la información proporcionada por las imágenes obtenidas durante el proceso experimental, es necesario encontrar la equivalencia que existe entre pixeles y micras. Para lograr lo anterior, se utilizó una plantilla micrométrica, la cual contiene rejillas con una separación de 10 μ m entre cada una de ellas, se tomó una imagen a la regla micrométrica con las condiciones utilizadas para nuestros experimentos, posteriormente se calculó la distancia entre las rejillas, para así poder obtener la equivalencia existente entre pixeles/micras, a partir del procedimiento anterior se obtuvo que 1 pixel = 0.3622 μ m. En este trabajo se generaron vídeos de cada experimento con una duración de 22 segundos, capturados a 500 cuadros por segundo, con un área de 512×512 píxeles, los cuales equivalen a un área de 186 μm^2 . Dichos vídeos y sus correspondientes imágenes presentan con claridad a las partículas gracias al contraste que tienen con el fondo (ver fig.3.9 A). Con este tipo de imágenes se trabajó para obtener las trayectorias correspondientes a cada partícula. Dicho proceso consta de una serie de cálculos aplicados a cada imagen del vídeo. Primero, gracias al buen contraste que existe no es necesario realizar un estricto pre-procesamiento, para cada cuadro se aplica un filtro pasa-bajas para localizar a las partículas, representadas por objetos blancos (ver fig.3.9 A).

Una vez que las partículas se localizan (ver fig.3.9 B), se procede con el análisis que construye las trayectorias. Con la colección de posiciones de las partículas para cada cuadro del vídeo es necesario realizar una correlación entre las posiciones de cuadros consecutivos. Para realizar dicha correlación se requiere establecer parámetros de exploración. En el trabajo desarrollado por Crocker et al [13], para generar las trayectorias se plantea el calcular un error al relacionar las posiciones entre cuadros con todas las posibles posiciones vecinas dentro de un rango que a



Figura 3.9: (A) Imagen correspondiente a un cuadro del vídeo, podemos observar a las partíclas en color blanco y el fondo en negro. (B) Imagen con los centroides localizados (marcados con una cruz roja y con un número para identificar a cada partícula) para las partículas correspondientes al cuadro del vídeo.

continuación se explica a detalle.

Para ligar las posiciones de las partículas entre la imagen tomada un instante de tiempo t_i y otra imagen en un tiempo posterior t_{i+1} es necesario establecer una correspondencia entre las posiciones de las partículas en base al desplazamiento promedio de las mismas entre dicho intervalo de tiempo. Cuando no se puede calcular la trayectoria de una partícula, lo que se hace es determinarlo por proximidad entre las dos imágenes. El algoritmo para ligar trayectorias no considera la interacción entre partículas, lo cual es valido para concentraciones bajas como las que se utilizaron en este trabajo. Primero se establece la probabilidad de desplazamiento de la partícula a una distancia σ en el plano en un tiempo τ como se muestra en la Ec.3.1

$$P(\sigma|\tau) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}} exp\left(\frac{\sigma^2}{4D\tau}\right),\tag{3.1}$$

en donde D es la velocidad de la partícula. Para un ensamble similar de N partículas idénticas, la probabilidad correspondiente es como se presenta en la Ec. 3.2.

$$P(\sigma_i|\tau) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}}\right)^N exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\sigma_i^2}{4D\tau}\right).$$
(3.2)

Lo más parecido a la asignación de etiquetas o indicadores a partículas es la maximización de $P(\sigma|\tau)$, o la minimización de $\sum_{i=1}^{N} \sigma_i^2$ que es equivalente. Para reducir la complejidad de

asignación de indicadores de partículas se acota la distribución de probabilidad a $\sigma = L$, en donde L es el desplazamiento característico. Por último se hace una adecuación en el programa para cuando las trayectorias de las partículas pudiera confundirse con la trayectoria de otra partícula, en cuyos casos dicha trayectoria se indicará como "perdida" para evitar errores.

3.4 Rapidez y distribución de partículas

Una vez obtenidas las trayectorias individuales de las partículas se procedió a analizar la distribución de partículas en la zona luminal del vaso para corroborar si existe o no la marginación. En la figura (3.7) se muestra una imagen de un vaso sanguíneo obtenida a través de nuestro modelo propuesto, tal y como se observa, la geometría no está bien definida, es decir, existen diversas irregularidades a lo largo del capilar, por lo que para facilitar el análisis, únicamente se seleccionará una zona del vaso en base a las imágenes obtenidas de campo claro (ver fig.3.10a), asimismo, se rotará la imagen en un ángulo θ para así poder dejar ya sea de manera vertical u horizontal una zona del canal, preferentemente la zona central, lo cual hará más sencillo el análisis (ver fig.3.10c). Una vez eligida la zona de análisis, se procedió a obtener un mapa de calor de la distribución de partículas a lo ancho del canal, aquí, los colores más intensos indicarán una mayor concentración de partículas, mientras menor sea tal intensidad, la concentración irá disminuyendo proporcionalmente, asimismo, para resultados más claros se procedió a la obtención de un histograma de la distribución de partículas, para este análisis, se dividió la zona luminal del vaso (del área seleccionada) en 5 capas de igual tamaño: 2 capas externas (cada una representa la pared del vaso), una capa interna y 2 capas intermedias y se contabilizó el número de partículas moviéndose en cada una de las capas dividido entre el número total de partículas fluyendo en el área seleccionada, para así obtener la densidad de partículas por cada capa. Una de las novedades del presente trabajo es la obtención del perfil de velocidad para las partículas, la cual se presentará de dos formas distintas, a través de un mapa de calor (al igual que el de posiciones) y por medio de un histograma de distribución. El cálculo de la velocidad se obtendrá a través de la siguiente fórmula $\Delta x / \Delta t$, donde el valor Δx corresponde a un desplazamiento de la partícula entre cuadros sucesivos (con 1/500 de segundo de separación).



Figura 3.10: Mapa de rapidez correspondiente a un capilar de 10 um de diámetro. A) Imagen de campo claro, la cual servirá como referencia para seleccionar el área de análisis. B) Mapa de rapidez obtenido a partir de la imagen de campo claro donde la flecha de color blanco indica la dirección del flujo. C) Imagen A rotada 30° en dirección a las manecillas del reloj, donde el cuadrado de color blanco indica la zona de análisis.

4 Resultados

4.1 Dinámica de partículas en un flujo de múltiples filas de glóbulos rojos

Se ha reportado en distintos trabajos que tanto para modelos in vivo, así como in vitro, las partículas de 1 μ m de diámetro tienden a marginarse hacia la capa libre de células en arteriolas de diámetros iguales e incluso superiores a 30 μ m [16][20][36]. En el presente trabajo se analizó tanto la distribución, así como la rapidez de partículas en arteriolas de diámetros de 30, 23 y 20 μ m, en donde, según lo reportado por Naoki y colaboradores el flujo en estos diámetros es de múltiples filas de glóbulos rojos [56]. En la figura (4.1) se muestran los resultados obtenidos para una arteriola de 30 μ m la cual, pese a que no se observa con claridad en las imágenes, esta se encuentra inmediatamente despues de una bifurcación. Para dilucidar el tipo de flujo presente en este caso, es decir, si el flujo es laminar o turbulento, se obtuvo el número de Reynolds, utilizando la expresión 1.11 se obtuvo que el número de reynolds es de 6.5×10^{-3} por lo que el flujo será de tipo laminar. En la imagen(4.1a) se muestra el mapa de calor de la rapidez, en donde se visualiza de manera clara que la rapidez de las partículas en el centro del vaso es de mayor magnitud que aquellas que viajan en proximidad a la pared del vaso (escala de colores), lo anterior se cuantifica en la figura (4.1c), donde podemos ver que la distribución de rapidez presenta un perfil aplanado y asimétrico en comparación con el perfil parabólico, el cual sigue una versión modificada de la ecuación 1.18 para tomar en cuenta la asimetría de la distribución de velocidades, coincidiendo con los resultados reportados por Apolito y colaboradores [16]. Este tipo de perfil de rapidez (simétrico y asimétrico a lo ancho del vaso) ya se ha reportado ampliamente y lo asocian a la inhomogeneidad de glóbulos rojos (mayor concentración en el centro del vaso) y la formación de una capa libre de células rojas en la periferia del vaso, lugar donde debido a que existe ausencia de eritrocitos, la viscosidad aparente es menor con respecto a la viscosidad aparente en el centro del vaso [28][47]. Asimismo, se ha demostrado que en ausencia de eritrocitos, las partículas presentan un perfil parábolico de velocidad. En la figura (4.1b) se muestran los resultados para la distribución de partículas en un mapa de colores, donde al igual que el caso anterior, un color rojo intenso indica la zona en donde las partículas se concentran en mayor proporción y colores más claros indican una disminución en la concentración de partículas. La figura nos indica que las partículas tienden a concentarse en mayor proporción en las paredes del vaso, mientras que conforme nos alejamos de las paredes, dicha concentración tiende a disminuir, lo anterior se visualiza de manera más clara en la figura (4.1d) donde se observa un histograma con la distribución de partículas en la zona señalada por las dos flechas de color blanco. La gráfica nos indica que las partículas muestran una acumulación preferencial cerca del 65% en las dos capas externas (contabilizando ambas) en comparación del 7% que reside en la capa interna y el restante en las dos capas intermedias, lo interesante de estos resultados radica en que no existe simetría entre las capas externas, por lo que nos suponemos que la razón de tal asimetría es debido a que inmediatamente después de la zona de análisis, existe una curvatura prominente en el borde superior del vaso que provoca que los glóbulos rojos y las partículas tiendan a frenarse y provocar la asimetría en el perfil de rapidez. Este tipo de asimetrías en la rapidez ocurre normalmente después de una bifurcación o bien, cuando hay una curvatura como la mostrada en este caso. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Lee v colaboradores [36].



Figura 4.1: Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 30 μ m, donde las flechas perpendículares al canal indican la zona de análisis, mientras que la flecha parapela indica la dirección del flujo. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

En lo que respecta al flujo de múltiples filas, se procedió a analizar un vaso de 23 μ m, cuyos resultados se muestran en la siguiente figura. Podemos obsevar que en lo que respecta a la rapidez, se sigue teniendo un comportamiento similar al del caso anterior, es decir, se observan los colores más intensos en el centro de la arteriola, mientras que la intensidad disminuye conforme nos alejamos del centro del vaso (ver fig.(4.2)a). Asimismo, el perfil de rapidez nos indica que las partículas presentan una distribución de rapidez aproximadamente simétrico (ver fig.(4.2c). Por otro lado, el mapa de calor para la distribución de partículas (ver fig.(4.2b)) nos indica que las partículas se encuentran concentradas preferentemente en la periferia del vaso, lo anterior se corrobora en la figura (4.2d)) donde el histograma nos indica que existe una concentración de 56 % en las 2 capas externas mientras mayor al porcentaje que reside en las tres capas restantes (44 %) donde las partículas se distribuyen uniformemente, por lo que podemos decir que la marginación prevalece para una arteriola de 23 μ m.



Figura 4.2: Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 23 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

4. Resultados

Posteriormente se presenta el análisis para una arteriola de 20 μ m de ancho, cuyos resultados se muestran en la figura (4.3), donde a diferencia de los casos anteriores, el comportamiento es un poco más complejo, puesto que aquí, antes de la zona de análisis está presente una bifurcación. En cuanto al mapa de rapidez, no se observan diferencias claras en lo que respecta a la distribución de colores, es decir, se visualiza una homogeneidad en la intensidad (ver fig.4.3(a), lo anterior se discierne de manera más clara en el histograma de rapidez, donde se observa una rapidez uniforme a lo ancho del canal (ver fig.(4.3c)). En cuanto a la distribución de partículas, el comportamiento es muy similar a los dos casos anteriores, es decir, la mayoría de las partículas tiende a migrar hacia las capas externas del vaso casi en igual proporción, en comparación con las tres capas restantes (ver fig. $(4.3b \ y \ (4.3d))$). En literatura no existe evidencia acerca del comportamiento de partículas en vasos de morfologías similares, por lo que no es posible contrastar estos resultados.Sin embargo, como se muestra en los siguientes casos, para vasos con diámetros menores a 20 μ m la distribución de rapidez tiende a ser homogénea a lo ancho del canal. Por otro lado, la bifurcación parece alterar ligeramente el efecto de la marginación al generar una distribución de partículas ligeramente asimétrica, ya que algunas partículas marginadas en la pared derecha fluyen hacia el vaso de menor diámetro.



Figura 4.3: Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 20 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

Como siguiente evidencia, se presenta el análisis para otra arteriola de 20 μ m. Para este caso encontramos una concordancia en cuanto a la rapidez en comparación con el caso anterior, en donde tanto el mapa de calor como el perfil de rapidez nos indica que la distribución de rapidez es uniforme, es decir, las partículas viajan a la misma rapidez a lo ancho del canal (ver fig.4.4a y c). En cuanto a la distribución de partículas, encontramos una prominente marginación de partículas (con el 36 %) en la parte inferior del vaso en comparación con el resto del vaso. Este último resultado indica que posiblemente también esté presente una bifurcación antes de la zona del análisis, la cual está modificando sustancialmente la distribución de partículas marginadas



tal y como ocurre en la figura 4.5(b).

Figura 4.4: Mapas de rapidez y distribución de partículas en una arteriola de 20 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

44 4.1. Dinámica de partículas en un flujo de múltiples filas de glóbulos rojos

Por último, en la figura 4.5 se muestran los resultados para un caso de un vaso de 20 μ m de diámetro, el cual presenta una trifurcación antes de la zona de análisis. En cuanto a la rapidez, el mapa de calor (ver fig.4.5(a)) nos indica que las partículas viajan en mayor magnitud en el centro del vaso en comparación con las partículas que se encuentran cerca de la periferia del capilar. Este comportamiento contrasta con los casos anteriores de vasos del mismo diámetro. Sin embargo, es de esperarse que debido a la trifurcación, dicha distribución de rapidez se haya modificado a distancias posteriores a la bifurcación. Por otro lado, en cuanto a la distribución de partículas a lo ancho del canal, el mapa de calor (ver fig.4.5b) nos indica que las partículas marginadas fluyen en gran medida por la rama orientada hacia la izquierda y en una menor medida por la rama orientada hacia la derecha. Debido a lo anterior, el efecto de la marginación de partículas se pierde para distancias posteriores a la trifurcación, y únicamente se puede apreciar una ligera diferencia en la concetración de partículas (ver figura4.5 (d)). Este resultado resalta el papel que juegan las bifurcaciones y trifurcaciones en la microvasculatura ya que pueden contrarestar el efecto de la marginación existente en los vasos.



Figura 4.5: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 20 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

4.2 Dinámica de partículas en un flujo de transición (coexistencia entre una y múltiples filas de glóbulos rojos)

Hasta el momento el único estudio acerca del comportamiento dinámico de partículas (o algún otro modelo) fluyendo en vasos menores a 20 μ m es el reportado por Naoki en el 2017 [56], cuyos resultados muestran que existe un umbral (de 10 μ m) en función del diámetro del vaso que determina si las partículas se encuentran marginadas. Dicho trabajo es una simulación computacional donde idealizan diversos parámetros tales como la morfología de los vasos, el hematocrito presente, entre otras cosas (ver sección 2.2). Por lo que, otra novedad del presente trabajo es el estudio del comportamiento de partículas de 1 μ m en vasos menores a 20 μ m, es decir, en la microvasculatura. Para estos casos se dice que el flujo es de transición, es decir, existe una competencia entre los glóbulos rojos para formar de una a múltiples filas. Posteriormente, en la figura (4.6) se muestran los resultados para un capilar de 18 μ m. Podemos observar con claridad en ambos mapas de calor que están presentes dos bifurcaciones, una antes de la zona de análisis y una inmediatamente después de la zona de interés. En cuanto a la rapidez, podemos observar en el mapa de calor (ver fig.4.6a) que no existen diferencias en cuanto a intensidades, lo que nos lleva a una distribución de rapidez uniforme a lo ancho del canal (ver fig.4.6(c)). Por otro lado, la figura (4.6(b)) nos indica que las partículas se concentran en mayor medida en la periferia del vaso en comparación con zonas más distantes de la pared del vaso. La figura 4.6(d) esclarece un poco más los resultados, mostrando que aproximadamente el 55% de partículas se encuentra en las capas externas, en comparación del 45 % de residencia en las tres capas restantes, es decir la marginación está claramente presente en una parte del vaso y donde la asimetría de las partículas en la periferia del vaso posiblemente se deba a alguna bifurcación que se encuentra antes de la zona de interés.



Figura 4.6: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 18 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

Como siguiente caso, se presentan los resultados para un capilar de 15 μ m en la figura 4.7, en donde podemos observar que no hay diferencias significativas en cuanto a la rapidez (ver fig.4.7a y c), es decir, la distribución es uniforme a lo ancho del canal. En cuanto a la distribución de partículas, encontramos que el porcentaje de partículas que reside en las dos capas externas es de aproximadamente 47 %, mientras en las tres capas restantes encontramos una distribución cerca del 53 % (ver fig. 4.7(d)), con lo que también podemos considerar como marginación. Nótese que el porcentaje de partículas marginadas en la pared superior es menor a la que se observó en el caso anterior (Ver figura 4.6), lo cual claramente indica que el efecto de la marginación



disminuye conforme el diámetro de los vasos decrece.

Figura 4.7: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 15 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

En la figura 4.8 se muestran los resultados para un capilar de 14μ m, en donde se presenta una bifurcación, pero esta se encuentra después de la zona de análisis. En lo que respecta a la rapidez, el mapa de calor nos indica una ligera variación en cuanto a intensidades, por lo que para discernir lo anterior, la figura(4.8(c)) nos muestra que el perfil de rapidez presente para este caso es practicamente uniforme excepto por una pequeña zona (del orden de 3 μ m) en la parte central del canal en donde tienden a moverse los glóbulos rojos y que por lo tanto representa el punto con la mayor rapidez del vaso. En cuanto a la distribución de partículas, a simple vista el mapa de calor (ver fig. (4.8b) nos indica una mayor concentración de partículas en la periferia del vaso, pero, aquí a diferencia de los casos anteriores, el canal se segmentó en 7 capas (todas del mismo tamaño). El histograma nos muestra una mayor concentración en la primera, segunda, quinta y septima capa (ver fig. (4.8d) de izquierda a derecha) por lo que de estos resultados podemos decir que aquí la tendencia a la marginación no es evidente, y que las partículas se encuentran distribuidas en mayor porcentaje (58%) en las capas internas e intermedias del canal en comparación con el 42% de residencia en las capas externa, es decir, no existe la marginación.



Figura 4.8: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 14 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

4.3 Dinámica de partículas en un flujo de una sola fila de glóbulos rojos

Tal y como se mencionó en la sección anterior, el único estudio acerca de la distribución de partículas en la microvasculatura es el trabajo reportado por Naoki, donde encuentran que el diámetro que determina si las partículas se encuentran marginadas es de 12 μ m, y para diámetros inferiores muestran que las partículas se encuentran atrapadas entre los glóbulos rojos, lo cual
4. Resultados

denominan como captura de partículas. Por lo que en la presente sección se presentan los resultados para capilares de 12, 9 y 8 μ m de diámetro. Cabe mencionar que, a diferencia de los casos anteriores, para los vasos de diámetros comparables al tamaño de un glóbulo rojo, es decir, los casos de 9 y 8 μ m la segmentación en cuanto al análisis de la distribución de partículas a lo ancho del canal se realizó en un número de capas igual al diámetro del vaso, puesto que, a diferencia de casos anteriores, donde el diámetro de los vasos era muy superior al tamaño de un eritrocito, aquí, apenas existe espacio suficiente para el movimiento de los glóbulos rojos y la formación de una capa libre de células es prácticamente inexistente. En la figura 4.9(a) se muestran los resultados para un capilar de 12 μ m, en donde, en lo que respecta a la rapidez, podemos observar en el mapa de calor que no existen diferencias significativas en cuanto a intensidad de colores indicando que prácticamente las partículas viajan a la misma rapidez sin importar donde se encuentren ubicadas en lo ancho del canal, lo anterior también se puede observar en el histograma de rapidez, donde se puede decir que la distribución de rapidez es uniforme (ver fig. 4.9c). Por otro lado, en cuanto a la distribución de partículas, el mapa de colores nos indica que en la mayor parte del vaso existen pocas variaciones en la concetración de partículas excepto por una zona de ancho de aproximadamente 2 μ m que además, se encuentra a una distancia variable respecto a la pared del vaso. Esto último posiblemente se deba a las variaciones a lo ancho del vaso. Aunque en esta imagen no se observa de donde surge esta zona de mayor concentración de partículas, posiblemente tenga su origen en una bifurcación anterior, tal y como sucede en la figura 4.5(b). Asimismo, el histograma en la zona señalada (ver figura 4.9(b)) muestra lo mencionado anteriormente, en donde podemos ver que prácticamente la distribución es ascendente (de izquierda a derecha) teniendo la menor concentración en la primera capa externa y tal concentración va en aumento en lo que respecta a las capas posteriores. En base a estos resultados no podemos hablar de marginación, debido a que el porcentaje de partículas distribuidas en una de las capas externas es de apenas 22%, mientras el restante se encuentra distribuido prácticamente de manera uniforme en las capas restantes. La explicación a lo anterior es que la distribución de partículas en capilares pequeños a lo ancho del vaso depende en gran medida de las características de cada vaso, como lo son las variaciones del diámetro a lo largo del capilar, variaciones en la curvatura, a la característica de la bifurcación que lo alimenta, así como a las interacciones entre partículas y eritrocitos.



Figura 4.9: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 12 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

En la figura 4.10, se presentan los resultados para un capilar de 10 μ m. Se puede observar en la figura (4.10(a)) como el diámetro del vaso exhibe variaciones a lo largo del mismo, de manera intuitiva visualizamos que en aquellas zonas donde el capilar disminuye su diámetro la rapidez es mayor, caso contrario a cuando el diámetro aumenta la rapidez disminuye considerablemente. En lo que respecta a la zona de análisis, observamos una uniformidad en cuanto a intensidad de colores, lo que se demuestra en el perfil de rapidez que muestra que la rapidez en la zona de análisis es prácticamente uniforme. Por otro lado, la figura (4.10(b)) sugiere una distribución uniforme de partículas a lo ancho del canal con una ligera diferencia aparente en la zona central del vaso. Lo anterior se dilucida en el histograma de distribución, donde efectivamente, observamos que en las capas externas la concentración de partículas es prácticamente la misma, contabilizando aproximadamente un 30 % de residencia de partículas. Sin embargo existe una notable diferencia en las tres capas restantes, donde la concentración de partículas es practicamente uniforme, por lo que, al igual que el caso anterior, no es posible hablar de marginación. Es necesario mencionar que pese a que no se observa una bifurcación en los mapas de calor, existe una bifurcación al inicio del canal del lado izquierdo (de arriba hacia abajo).



Figura 4.10: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 10 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

54 4.3. Dinámica de partículas en un flujo de una sola fila de glóbulos rojos

En la figura (4.11) se presentan los resultados para un capilar de 9 μ m de diámetro, y se puede observar en el mapa de calor de rapidez (4.11a) que no existen diferencias en cuanto a intensidad de colores en la zona de análisis e incluso a lo largo del vaso. En concordancia, el perfil de rapidez muestra lo mencionado anteriormente. Es decir, la rapidez presenta una distribución uniforme. Sin embargo, en cuanto a la concentración de partículas, el mapa de calor nos muestra un mayor acumulamiento en la periferia del vaso lo que posiblemente nos pudiese indicar la presencia de marginación, pero, al observar el histograma de posiciones observamos una mayor acumulación en las capas externas, el cual, contabiliza aproximadamente un $38\,\%$ mientras el 62 % restante se distribuye en las capas restantes por lo que es posible hablar de marginación. Es interesante observar un mayor acumulamiento en las capas externas para este tipo de diámetros, sin embargo, la posible razón pudiera recaer en que el diámetro del vaso es superior al del glóbulo rojo, por lo que existe la posibilidad de que debido a que el ancho del vaso no es ocupado completamente por los glóbulos rojos, algunas partículas tiendan a ser empujadas por los glóbulos rojos hacia las paredes debido a que como se mencionó en el primer capítulo, los eritrocitos debido al tank treading viajan en el centro del vaso, es decir, la competencia de los eritrocitos por viajar en el centro del vaso termina empujando a las partículas hacia la periferia. También se ha sugerido [56] que en flujos con una rapidez muy grande y con un diámetro de vaso de 10 μ m los eritrocitos tienden a elongarse y ocupar todo el espacio entre ellos dando lugar a la marginación de partículas. Los resultados presentados en la figura 4.11 son consistentes con lo reportado en este trabajo, tanto en el diámetro del vaso como en el hecho de que fue en el que se observó los valores más grandes en cuanto a la rapidez en el flujo para capilares.



Figura 4.11: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 9 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

El trabajo realizado por Naoki et al, reporta que para vasos de diámetro menores e iguales a 8 μ m los glóbulos rojos presentan un agrupamiento (clusters) debido a que el espacio para fluir a través de los capilares es prácticamente el diámetro de los eritrocitos (8 μ m) y necesitan deformarse para poder pasar a través de esos vasos. En la figura (4.12) se muestran los resultados para un capilar de 8 μ m, y en donde se puede observar que no existen variaciones en cuanto a la rapidez a lo ancho del canal, es decir la rapidez para este caso es uniforme. Asimismo, en cuanto a la concentración de partículas ocurre el mismo comportamiento que la rapidez, es decir, no existe acumulación preferencial en ninguna de las capas del vaso (ver fig.(4.12(a)). Estos resultados eran de esperarse, tanto para la rapidez como para la distribución de partículas, debido a que los eritrocitos prácticamente abarcan el ancho del canal y no existe el espacio suficiente para que las partículas tiendan a ser empujadas hacia las paredes, es decir, se encuentran viajando entre los glóbulos rojos. En lo que respecta a la rapidez, al ser un flujo de una sola fila de eritrocitos, prácticamente viajan agrupados lo cual causa que las líneas de flujo no sean alteradas provocando que la rapidez sea la misma prácticamente a lo ancho del canal.



Figura 4.12: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 8 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

Por último, al igual que el caso anterior, se muestran los resultados para un vaso de 8

 μ m de diámetro (ver figura 4.13) obteniendo resultados similares al caso anterior. La única diferencia radica en que aparentemente existe una menor concentración de partículas en la capa externa derecha (en comparación con la otra externa) pero las barras de desviación estándar nos indica que posiblemente la estadística no fue la suficiente para poder ser comparable con la concentración de las otras capas. Sin embargo, es posible concluir a pesar de lo anterior, que el comportamiento para los vasos de 8 μ m es prácticamente el mismo. Es decir, las partículas no exhiben el fenómeno de marginación ya que se encuentran moviéndose entre los glóbulos rojos debido a que el espacio en el vaso es ocupado por completo por los eritrocitos.



Figura 4.13: Mapas de rapidez y distribución de partículas en un capilar de 8 μ m. A) Mapa de calor correspondiente a la rapidez de las partículas. B) Mapa de calor correspondiente a la distribución de partículas. C) Perfil de velocidad. D) Perfil de concentración de partículas a lo ancho del canal.

5 Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo se realizó un estudio in vivo acerca de la distribución y rapidez de partículas fluorescentes de 1 μ m de diámetro en la microvasculatura utilizando un modelo in vivo. Para analizar tanto la distribución como la rapidez de las partículas se grabaron vídeos en donde se registra su movimiento. Dicho estudio se hizo a través de técnicas de análisis de imágenes para calcular los parámetros de posición y rapidez de las partículas. Los experimentos se realizaron cubriendo un rango de diámetros entre 8 y 30 μ m. La hipótesis planteada en el presente trabajo se enfoca en econtrar un umbral en función del diámetro del vaso que determina si las partículas se encuentran marginadas o capturadas entre los glóbulos rojos, para lo cual, el criterio utilizado para determinar si las partículas se encontraban marginadas se determinó en una diferencia de entre el 15 - 20 % al contabilizar el número de partículas concentradas en las dos capas externas, caso contrario, se determinó que no existe marginación de las partículas. Para los vasos de mayor diámetro, es decir, los casos de 30, 23, 20, 18 y 15 μ m la marginación es consistente, a excepción del caso en donde se presenta una trifurcación. También se observó un umbral para el perfil de rapidez del orden de 20 μ m por abajo del cual dicho perfil es prácticamente plano, lo cual remarca el efecto de las interacciones entre glóbulos rojos en capilares tan pequeños. Asimismo, se encontró que el umbral que determina si las partículas se encuentran marginadas es de 14 μ m, el cual es muy cercano al umbral de 12 μ predicho con simulaciones computacionales [56]. Por otro lado, nuestros resultados evidencian la importancia que tienen las bifurcaciones, ya que pueden favorecer o entorpecer el efecto de marginación de partículas al cambiar las trayectorias de las patículas entre las diferentes ramificaciones de los vasos, lo cual no se ha reportado para el caso de vasos arteriales. Asimismo, para los vasos de diámetro comparable al de los glóbulos rojos, es decir, $\leq 10 \ \mu$ m, los resultados sugieren que las partículas se encuentran distribuidas de manera uniforme a lo ancho del canal debido a que no existe el espacio suficiente para que estas tiendan a ser empujadas a la periferia del vaso, puesto que los glóbulos rojos ocupan todo el ancho del vaso. Sin embargo, encontramos evidencia de un vaso de 9 μ m de diámetro con un flujo cuya rapidez es del orden de 1200 μ m/seg. en donde claramente se muestra el efecto de la marginación el cual es consistente con predicciones de simulaciones computacionales [56].

5.2 Perspectivas

En concreto, como perspectiva se propone aumentar la estadística para el estudio de marginación en la microvasculatura, asímismo, profundizar el análisis tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1. Incluir 2 o más zonas para analizar tanto la rapidez como la distribución a lo ancho del canal y determinar si existe o no variación para ambos casos.
- 2. Realizar más experimentos donde se tomen en cuenta vasos donde estén presentes bifurcaciones e incluso trifurcaciones para corroborar que los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes.
- 3. Buscar en la literatura evidencia acerca del grosor de la capa libre de células, para así realizar un análisis más preciso en cuanto a la segmentación en capas de los vasos sanguíneos.
- 4. Mejorar tanto el algoritmo de análisis así como la metodología para poder estudiar de manera paralela la dinámica de los glóbulos rojos.

Bibliografía

- [1] DRUG DELIVERY SYSTEMS T h i r d E d i t i o n. Technical report.
- [2] Tratado de fisiología médica Guyton. Technical report.
- [3] S A Prins G W Kuiken G DSixma J J Heethaar R M Aarts, P Avan den Broek. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 1988.
- [4] Silvio Baez. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular Research*, 1973.
- [5] Pooneh Bagher and Steven S. Segal. The Mouse Cremaster Muscle Preparation for Intravital Imaging of the Microcirculation. *Journal of Visualized Experiments*, (52), jun 2011.
- [6] Himanish Basu, Aditya K. Dharmadhikari, Jayashree A. Dharmadhikari, Shobhona Sharma, and Deepak Mathur. Tank treading of optically trapped red blood cells in shear flow. *Biophysical Journal*, 101(7):1604–1612, oct 2011.
- [7] H. Glenn Bohlen, Robert W. Gore, and Phillip M. Hutchins. Comparison of microvascular pressures in normal and spontaneously hypertensive rats. *Microvascular Research*, 1977.
- [8] Daniel Branton, Carl M Cohen, and Jonathan Tyler. Interaction of Cytoskeletal Proteins on the Human Erythrocyte Membrane Review. Technical report.
- R. E. Buckingham. Indwelling catheters for direct recording of arterial blood pressure and intravenous injection of drugs in the conscious rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1976.
- [10] J.W. Buckle and P.W. Nathaniels. Proceedings: A dual catheter system for the simultaneous infusion and sampling of the vascular system of the unrestrained rat. J. *Physiol.*, 1974.
- [11] Katherine Nam Jaewook Lu Xiuling Ma Anson W. K. Carboni, Erik Tschudi. Particle Margination and Its Implications on Intravenous Anticancer Drug Delivery. AAPS PharmSciTech, 2014.

- [12] Apoorva Hoore Masoud Fedosov Dmitry A. Mitragotri Samir Sen Gupta Anirban Cooley, Michaela Sarode. Influence of particle size and shape on their margination and walladhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. Nanoscale, 2018.
- [13] John C Crocker and David G Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. Technical report, 1996.
- [14] L. Crowl and A. L. Fogelson. Analysis of mechanisms for platelet near-wall excess under arterial blood flow conditions. *Journal of Fluid Mechanics*, 676:348–375, 2011.
- [15] Junwu Li Yan Shiloach Joseph Solomon Steven Kaufman Jeanne B. Mani Haresh Fitz Yvonne Weng Jia Altaweel Laith Besch Virginia Eichacker Peter Q. Cui, Xizhong Su. Bacillus anthracis cell wall produces injurious inflammation but paradoxically decreases the lethality of anthrax lethal toxin in a rat model. *Intensive Care Medicine*, 2010.
- [16] Rosa D'Apolito, Giovanna Tomaiuolo, Francesca Taraballi, Silvia Minardi, Dickson Kirui, Xuewu Liu, Armando Cevenini, Roberto Palomba, Mauro Ferrari, Francesco Salvatore, Ennio Tasciotti, and Stefano Guido. Red blood cells affect the margination of microparticles in synthetic microcapillaries and intravital microcirculation as a function of their size and shape. Journal of Controlled Release, 217:263–272, nov 2015.
- [17] N. Evans E. A. Discher, D. E. Mohandas. Molecular maps of red cell deformation: Hidden elasticity and in situ connectivity. *Physics of Fluids A*, 1994.
- [18] R Duling. BRUCE KLITZMAN AND BRIAN Department. 1979.
- [19] Eugene C. Eckstein, Douglas G. Bailey, and Ascher H. Shapiro. Self-diffusion of particles in shear flow of a suspension. *Journal of Fluid Mechanics*, 1977.
- [20] Grant Bouchillon Andrea Kadilak Leslie Shor Michael Ward Erik Carboni, Brice Bognet and Anson Ma. Direct Tracking of particles and Quantification of Margination in Blood Flow. *Biophysical Journal*, 2016.
- [21] R Fahraeus and T Lindqvist. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*, 1931.
- [22] Jing Feng, Yvonne Fitz, Yan Li, Melinda Fernandez, Irene Cortes Puch, Dong Wang, Stephanie Pazniokas, Brandon Bucher, Xizhong Cui, and Steven B. Solomon.

Catheterization of the Carotid Artery and Jugular Vein to Perform Hemodynamic Measures, Infusions and Blood Sampling in a Conscious Rat Model. *Journal of Visualized Experiments*, (95), jan 2015.

- [23] Marianne Schmid-Schönbein Holger. Fischer, Thomas M. Stöhr-Liesen. The red cell as a fluid droplet: Tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science*, 1978.
- [24] Thomas M. Fischer. Shape Memory of Human Red Blood Cells. Biophysical Journal, 86(5):3304–3313, 2004.
- [25] Jonathan B. Freund. Leukocyte margination in a model microvessel. Physics of Fluids, 2007.
- [26] Y. C. Fung. Biomechanics: Motion, Flow, Stress, and Growth. Journal of Applied Mechanics, 1991.
- [27] H. Gaehtgens, P. Schmid-Schönbein. Mechanisms of dynamic flow adaptation of mammalian erythrocytes. Naturwissenschaften, 1982.
- [28] Arno M.M. Muijtjens Theo Arts Mirjam G.A. oude Egbrink Geert Jan Tangelder, Dick W. Slaaf and Robert S. Reneman. Velocity Profiles of Blood Platelets and Red Blood Cells Flowing in Arterioles of the Rabbit Mesentery. *Circulation Research*, 1986.
- [29] Thomas M. Geislinger and Thomas Franke. Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow - From Fåhræus & Lindqvist to microfluidic cell sorting. Advances in Colloid and Interface Science, 208:161–176, 2014.
- [30] R. T. Grant. Direct observation of skeletal muscle blood vessels (rat cremaster). The Journal of Physiology, 172(1):123-137, 1964.
- [31] Le Yu MeiWei Huilin Ye, Zhiqiang Shen and Ying Li. Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces: an exemplar of mechanics in nanomedicine. *Royal Society*, 2018.
- [32] Mun LL. Jain A. Determinants of Leukocyte Margination in Rectangular Microchannels. PLoS ONE, 2009.

- [33] ANITABEN TAILOR KAREN Y. STOKES JANICE RUSSELL, DIANNE COOPER and D. NEIL GRANGER. Low venular shear rates promote leukocyte-dependent recruitment of adherent platelets. *Journal of Physiology*, 2003.
- [34] Jae Hong Jeong, Yasusiko Sugii, Motomu Minamiyama, and Koji Okamoto. Measurement of RBC deformation and velocity in capillaries in vivo. *Microvascular Research*, 71(3):212– 217, may 2006.
- [35] Richard Keller, Stuart R. Skalak. Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow. Journal of Fluid Mechanics, 1982.
- [36] Tae Rin Lee, Myunghwan Choi, Adrian M. Kopacz, Seok Hyun Yun, Wing Kam Liu, and Paolo Decuzzi. On the near-wall accumulation of injectable particles in the microcirculation: Smaller is not better. *Scientific Reports*, 3, jun 2013.
- [37] David Leighton and Andreas Acrivos. The Shear-Induced Migration of Particles in Concentrated Suspensions. Journal of Fluid Mechanics, 1987.
- [38] G. Majno. STUDIES ON INFLAMMATION: I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study. *The Journal of Cell Biology*, 11(3):571–605, 2004.
- [39] G MAJNO, G E PALADE, and G I SCHOEFL. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *The Journal* of biophysical and biochemical cytology, 11:607–26, 1961.
- [40] E. R. Cokelet G. Shin H. Britten A. Wells R. E. Merrill, E. W. Gilliland. Rheology of blood and flow in the microcirculation. *Journal of Applied Physiology*, 2017.
- [41] Patrick G. Mohandas, Narla Gallagher. Red cell membrane: Past, present, and future. Blood Journal, 2008.
- [42] Lance L. Munn and Michael M. Dupin. Blood cell interactions and segregation in flow. Annals of Biomedical Engineering, 2008.
- [43] E. Narla Mohandas and Evan. Mechanical Properties of the Red Cell Membrane in Relation to Molecular Structure and Genetic Defects. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 23(1):787–818, jan 1994.

- [44] D. E. Nilsson. Photoreceptor evolution: Ancient siblings serve different tasks. Current Biology, 2005.
- [45] A. R. Cokelet G. R. Gaehtgens P. Nobis, U. Pries. Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvascular Research*, 1985.
- [46] K. Kinoshita H. Fujii T. Oshima M. Oishi, M. Utsubo. Continuous and simultaneous measurement of the tank-treading motion of red blood cells and the surrounding flow using translational confocal micro-particle image velocimetry (micro-PIV) with sub-micron resolution. *Measurement Science and Technology*, 2012.
- [47] Paul C. Johnson Ozlem Yalcin, Vivek P. Jani and Pedro Cabrales. Implication Enzymatic Degradation of the Endothelial Glycocalyx on the Microvascular Hemodynamics and the Arteriolar Red Cell Free Layer of the Rat Cremaster Muscle. Vascular Physiology, 2018.
- [48] Mark J. Pearson and Herbert H. Lipowsky. Effect of Fibrinogen on Leukocyte Margination and Adhesion in Postcapillary Venules. *Microcirculation*, 2003.
- [49] C. Pozrikidis. Orbiting motion of a freely suspended spheroid near a plane wall. *Journal* of Fluid Mechanics, 2005.
- [50] Maryam Saadatmand, Takuji Ishikawa, Noriaki Matsuki, Mohammad Jafar Abdekhodaie, Yohsuke Imai, Hironori Ueno, and Takami Yamaguchi. Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube. *Journal of Biomechanics*, 44(1):170– 175, 2011.
- [51] Qin M. Qi Sean Fitzgibbon, Andrew P. Spann and Eric S. G. Shaqfeh. In vitro measurement of Particle Margination in the Microchannel Flow: Effect of varying Hematocrit. *Biophysical Journal*, 2015.
- [52] Jeffrey R. Smart and David T. Leighton. Measurement of the drift of a droplet due to the presence of a plane. *Physics of Fluids A*, 1991.
- [53] Xizhong Gerstenberger Eric Danner Robert L. Fitz Yvonne Banks Steven M. Natanson Charles Eichacker Peter Q. Solomon, Steven B. Cui. Effective Dosing of Lipid A Analogue E5564 in Rats Depends on the Timing of Treatment and the Route of Escherichia coli Infection. The Journal of Infectious Diseases, 2006.

- [54] Chenghai Sun and Lance L. Munn. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary expansions: A lattice Boltzmann analysis. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2006.
- [55] Cristiano Munn Lance L. Sun, Chenghai Migliorini. Red blood cells initiate leukocyte rolling in postcapillary expansions: A lattice Boltzmann analysis. *Biophysical Journal*, 2003.
- [56] Naoki Takeishi and Yohsuke Imai. Capture of microparticles by bolus flow of red blood cells in capillaries. *Scientific Reports*, 7(1), dec 2017.
- [57] Mostafa Barigou Tim Watts and Gerard B.Nash. Comparative rheology of the adhesion of platelets and leukocytes from flowing blood: why are platelets so small?. *Physiology*, 2013.
- [58] S. P. Rao P. R. Tran-Son-Tay, R. Sutera. Determination of red blood cell membrane viscosity from rheoscopic observations of tank-treading motion. *Biophysical Journal*, 1984.
- [59] Koohyar Vahidkhah and Prosenjit Bagchi. Microparticle shape effects on margination, nearwall dynamics and adhesion in a three-dimensional simulation of red blood cell suspension. Soft Matter, 11(11):2097–2109, 2015.
- [60] E. C. Yeh, C. Eckstein. Transient lateral transport of platelet-sized particles in flowing blood suspensions. *Biophysical Journal*, 1994.
- [61] Hong Zhao, Eric S.G. Shaqfeh, and Vivek Narsimhan. Shear-induced particle migration and margination in a cellular suspension. *Physics of Fluids*, 24(1), 2012.
- [62] Marina V. Antaki James F. Zhao, Rui Kameneva. Investigation of platelet margination phenomena at elevated shear stress. *Biorheology*, 2007.