

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

**Manipulación de la dinámica de micropartículas en la
microcirculación utilizando un campo magnético
externo**

Tesis que presenta:

**Alejandro Carlos Barraza del
Campo**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias
en Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de la Tesis:

Dr. Jesús Manuel Santana Solano

© Derechos reservados por
Alejandro Carlos Barraza del Campo
2021

La tesis presentada por Alejandro Carlos Barraza del Campo fue aprobada por:

Dr. Gabriel A. Caballero Robledo

Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Dr. Jesús Manuel Santana Solano, Director

Apodaca, Nuevo León México., de Junio de 2021

A mi querida madre que siempre me ha apoyado incondicionalmente y con mucha paciencia a lo largo de toda mi vida.

Agradecimientos

Agradezco al personal de CINVESTAV-Unidad Monterrey por su apoyo y paciencia.

Agradezco a CONACyT por brindarme el apoyo necesario para la realización de esta maestría.

Agradezco a Dios, que me puso en este camino que amo.

Al Doctor Carlos Ruíz quien me facilitó el uso de un equipo de medición del campo magnético para mis experimentos.

Al Dr. Daniel Sánchez quien me apoyo de diversas maneras, tanto en equipos como en su conocimiento para poder completar mis experimentos.

A mis compañeros de maestría que me compartieron de sus conocimientos en sus respectivas áreas, y que tras risas y lagrimas en nuestro corto período juntos, se ha formado una gran y muy estimada amistad.

A mis sinodales, el Dr. Bruno Escalante y el Dr. Gabriel Caballero, cuyos conocimientos y aportaciones fueron de gran ayuda a lo largo de toda la experimentación.

Por último, agradezco al Dr. Jesús Santana por toda la ayuda y guía proporcionada en este proyecto. Los conocimientos adquiridos en estos años son de gran estima y emoción para mi y nada habría ocurrido sin su SI al decidir ser mi Asesor.

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	VII
Resumen	IX
Abstract	XI
1. Introducción	1
1.1. Microcirculación	1
1.2. Músculo cremáster, herramienta para la visualización de vasos sanguíneos	3
1.3. Materiales con propiedades magnéticas	4
1.3.1. Campo magnético generado por un Imán	5
1.4. Fuerzas dominantes sobre partículas en la microcirculación	7
1.4.1. Fuerza de arrastre	7
1.4.2. Fuerza magnética	9
1.5. Ley de Hagen Poiseuille	11
1.6. Antecedentes	13
1.7. Planteamiento del problema	17
1.8. Hipótesis	18
1.9. Objetivo general	18
1.9.1. Objetivos específicos	18
2. Materiales y métodos	19
2.1. Cirugía	19
2.1.1. Cateterización de la vena yugular	20
2.1.2. Extracción del músculo cremáster en el testículo	21
2.1.3. Montaje en microscopio	22
2.1.4. Partículas superparamagnéticas fluorescentes	23
2.2. Arreglo experimental con el imán	24
2.3. Análisis de imágenes y videos	25
3. Resultados y discusión	29
3.1. Flujo sanguíneo en presencia de glóbulos blancos	29
3.2. Análisis del movimiento del músculo	31
3.3. Inducción magnética del imán cilíndrico a lo largo de su eje	37
3.4. Análisis sin campo magnético	38

3.5. Análisis con campo magnético	42
3.5.1. Posicionamiento del imán utilizando una cuña de PDMS	42
3.5.2. Posicionamiento del imán sobre el músculo cremáster	46
3.5.2.1. Comparativa entre las fuerzas que actúan sobre las partículas dentro de las vénulas post-capilares	49
3.6. Discusión	54
4. Conclusiones y perspectivas	57
4.1. Conclusiones	57
4.2. Perspectivas	58

Índice de Figuras

1.1.	Ramificación de los vasos sanguíneos. Imagen obtenida de la red.	2
1.2.	Estructura molecular del músculo esquelético. Imagen obtenida del libro de Neurofisiología para estudiantes de medicina de la UNAM [16].	3
1.3.	Representación del campo magnético de un imán. Imagen obtenida de la red. . .	4
1.4.	a) Esquema de un imán cilíndrico de radio R y longitud L . \vec{dm} representa el momento dipolar magnético del elemento del volumen dV . Imagen modificada de la referencia [1]. b) Vista lateral del imán.	6
1.5.	Ajuste de la ecuación 1.6 con los datos obtenidos del trabajo de Windberger y colaboradores (*) [34]. El ajuste provee una $K=12.49 (Pa \cdot s^n)$ y $n=0.79$	9
1.6.	Flujo de Poiseuille en 2D.	11
2.1.	Base de Acrílico.	20
2.2.	a) Representación de la canulación de la vena yugular. b) Canulación de la vena yugular.	21
2.3.	a) Esquema de la cirugía completa. b) Visualización del músculo cremáster. . .	22
2.4.	a) Montaje del ratón en el microscopio. b) Imagen tomada de la microcirculación, donde i) muestra la dirección del flujo en una vénula, ii) muestra la presencia de glóbulos blancos, iii) muestra un glóbulo rojo fluyendo en un capilar.	23
2.5.	Cuña de PDMS con el imán.	24
2.6.	Esquematación del posicionamiento de la cuña sobre el músculo cremáster. . .	24
2.7.	a) Esquema de una vista lateral del posicionamiento del imán. b) Imagen esquemática del posicionamiento del imán (disco negro) y zona de interés (cuadrado rojo) sobre el músculo cremáster.	25
2.8.	Representación de la información obtenida con los píxeles de una imagen.	26
2.9.	Visualización representativa de la trayectoria de una partícula fluyendo por un vaso sanguíneo. La flecha roja indica la dirección del flujo sanguíneo.	28
3.1.	a) Colisión de un glóbulo rojo (RBC) con un leucocito (WBC) fijo en la pared de una vénula post-capilar. La flecha indica la dirección del flujo. Así mismo, se muestran 2 recuadros destacando la diferencia en la morfología de las 2 células. b) Desplazamiento del glóbulo rojo después de 0.21 s de la colisión. La flecha roja indica el giro del glóbulo rojo para rodear al leucocito y continuar fluyendo. Los círculos azules señalan a leucocitos rodando en el vaso.	31
3.2.	a) Partícula adherida a la pared vaso sanguíneo (círculo rojo) y la región del desplazamiento de dicha partícula (rectángulo azul). Componentes X (b) y Y (c) de la trayectoria de una partícula fluorescente adherida a la pared endotelial de una vénula. El diámetro del vaso es de $15.8 \mu m$	33
3.3.	Espectro de frecuencia de la contracción del músculo en la dirección X.	33
3.4.	Posición de las partículas adheridas en el vaso sanguíneo (círculos rojos).	34

3.5. a) Componente X de las trayectorias de 2 partículas fluorescentes adheridas a la pared endotelial de una vénula y que se encuentran a una distancia aproximada de 132.8 μm . b) Superposición de las componentes X de las trayectorias de 2 partículas para mostrar que se desplazan en fase.	35
3.6. a) Espectro de frecuencias de la partícula 1. b) Espectro de frecuencias de la partícula 2. La frecuencia en ambos casos es 1.5 Hz.	35
3.7. a) Componente X de la trayectoria de una partícula fija a la pared de un vaso correspondiente a la Figura 3.2. El rectángulo verde en la parte superior izquierda indica el intervalo de tiempo en el que fue detectada una partícula que fluye dentro del vaso (figura 3.7) y que incluye un intervalo de tiempo donde el músculo se encuentra en movimiento y otro donde se mantiene en reposo. b) Trayectoria corregida (verde) y trayectoria sin corrección (roja) donde, se indica la dirección del flujo sanguíneo i) y la dirección de contracción del músculo ii).	37
3.8. a) Imagen en vista superior del sensor (extremo izquierdo) junto con un imán cilíndrico (extremo derecho), obtenida con un microscopio Aigo. b) Inducción magnética a lo largo del eje cilíndrico del imán.	38
3.9. Trayectorias trazadas en 2 vénulas y que fueron obtenidas de 2 ratones. Las flechas son indicativas de la dirección del flujo en cada vaso. i) La trayectoria en color negro muestra a una partícula que probablemente altera su trayectoria debido a la presencia de un leucocito fijo a la pared del vaso.	39
3.10. Imagen representativa de las divisiones que se realizan a lo ancho de los vasos sanguíneos para determinar la dependencia de la velocidad con la posición radial de las partículas.	40
3.11. a) y c) Valores de las medias de las velocidades de todas partículas (cada una representada con un color) de los experimentos 1 y 2, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. b) y d) Gráfica de barras con los promedios de velocidades de cada sección de 2 experimentos. Las divisiones del experimento 1 son de 6.12 μm de ancho mientras que las del experimento 2 son de 3.6 μm	41
3.12. Ajuste del perfil de velocidad (línea roja) utilizando los datos del experimento 1 (círculos azules).	42
3.13. Imagen representativa de un aglomerado de partículas en la microcirculación. . .	43
3.14. a) Trayectorias superpuestas sobre el vaso del experimento utilizando una cuña y después de la aplicación del campo magnético (la flecha blanca indica la dirección del flujo). b) Promedio de velocidades de todas las trayectorias del experimento (la flecha naranja sobre el eje horizontal indica el momento en que se retira el imán).	44
3.15. Gráfica de barras de los promedios de velocidades, de 3 secciones del vaso de 3.53 μm , correspondiente a los datos de la Figura 3.14.	45
3.16. Ajuste del perfil de velocidad (línea roja) utilizando los datos de la figura 3.15 (círculos azules).	45

3.17. a) Trayectorias superpuestas sobre los vasos. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo de cada vaso. b) Velocidad media de las trayectorias que fluyen en el vaso de diámetro $D=18.2 \mu\text{m}$ (círculos vacíos). Los triángulos de color rojo indican la velocidad media de las trayectorias correspondientes al vaso que se encuentra en la parte superior de la imagen (de diámetro $D=5.8 \mu\text{m}$). c) Imagen representativa de un aglomerado de partículas en un vaso sanguíneo. d) Perfil de velocidad de las partículas en el vaso ($D=18.2 \mu\text{m}$).	47
3.18. a) Trayectorias superpuestas sobre los vasos. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo. b) Velocidad media de las trayectorias que fluyen en el vaso de diámetro $D=15.3 \mu\text{m}$ (círculos vacíos). Los triángulos indican la velocidad media de las trayectorias correspondientes al vaso que se encuentra en la parte superior de la imagen (de diámetro $D=6 \mu\text{m}$) y la flecha naranja indica el retiro del imán.	48
3.19. a) Gráfica de la fuerza magnética ejercida sobre una partícula a diferentes distancias a lo largo del eje del imán cilíndrico. b) Velocidad sobre una partícula magnética inducida por el efecto del campo magnético que ejerce el imán a lo largo del eje cilíndrico.	49

Índice de Tablas

1.1. Tabla de magnitudes de los parámetros utilizados para determinar la fuerza magnética. El valor de la susceptibilidad magnética fue determinada a 26.6°C [46]. Los parámetros que no se aprecian en la tabla son dependientes de la distancia entre el imán y las partículas.	10
3.1. Tabla de los valores de fuerza y el número de Richardson (Ψ) a diferentes distancias considerando a) $B_r=0.54$ T y b) $B_r=1.2$ T.	51

Resumen

La dinámica de nano/micropartículas que fluyen en vénulas depende de interacciones complejas que son inducidas en gran medida por la presencia de las células sanguíneas, particularmente los glóbulos rojos y blancos. Los glóbulos rojos, al ser células altamente deformables y los que ocupan un mayor volumen en los vasos sanguíneos, tienden a migrar hacia el centro del vaso que en conjunto con las interacciones hidrodinámicas entre dichas células hace que se genere una capa libre de células cerca de la pared del vaso. Este efecto induce una migración lateral de los glóbulos blancos hacia la pared del vaso, al cual se le conoce como marginación. Al fluir cerca de la pared, los leucocitos pueden entrar en una segunda fase conocida como de rodamiento en la que las células se desplazan mucho más lentamente que la velocidad media del flujo y finalmente en una tercera fase de firme adhesión a la pared endotelial. Estos últimos efectos alteran el flujo de los glóbulos rojos debido a las colisiones entre glóbulos rojos y blancos. Estos fenómenos celulares han motivado el estudio del flujo de nano/micropartículas como posibles vehículos para una liberación controlada de fármacos y como un medio para estudiar los diferentes fenómenos del flujo sanguíneo que aún no han sido completamente caracterizados. Para lograr esto último se ha usado una fuerza adicional sobre las partículas generada por un campo magnético externo con el fin tener un mejor control sobre la dinámica de las partículas. En este trabajo se caracteriza el flujo de partículas en vénulas post-capilares del músculo cremáster de ratón. Para administrar las partículas se realizó una canulación a través de la vena yugular usando protocolos previamente establecidos[18]. Para este trabajo, se eligieron partículas fluorescentes superparamagnéticas de $0.9 \mu\text{m}$ con el fin de atraparlas en la pared endotelial con el uso de un imán cilíndrico. Los resultados sugieren que las partículas continúan fluyendo a través de los vasos una vez que se retira el imán. Con las trayectorias individuales de las partículas fue posible determinar que existe una marcada fluctuación en la velocidad instantánea de las partículas, que posiblemente se deba a las fuertes interacciones hidrodinámicas con los glóbulos rojos y blancos. En estos experimentos fue posible observar el proceso de un choque entre un glóbulo rojo y un leucocito, lo que ejemplifica la fuerte influencia que tienen los leucocitos en el flujo sanguíneo. Cabe mencionar que la contracción del músculo cremáster afecta la apropiada obtención de las trayectorias por lo que fue necesario

realizar una corrección tomando en cuenta la trayectoria de partículas pegadas a la pared endotelial. Con las mediciones del campo magnético a lo largo del eje del imán cilíndrico, se estimó que la fuerza magnética sobre las partículas empieza a actuar a distancias menores a 2 mm respecto a la base cilíndrica. Los resultados indican que la advección es mucho mayor al efecto de la difusión y de la fuerza gravitatoria. Así mismo, al comparar la magnitud de la fuerza magnética con la magnitud de la fuerza de arrastre viscoso que actúan en direcciones opuestas, resulta que la fuerza de arrastre también supera a la fuerza magnética. No obstante, y de acuerdo con lo observado en la literatura [35], esto no impide que exista un atrapamiento de las partículas.

Abstract

The dynamic of nano/microparticles, that flow within the venules, depends in complex interactions majorly induced by the presence of blood cells, particularly white blood cells and red blood cells. The red blood cells are high deformable cells which occupy the largest volume in blood vessels, these cells tend to migrate towards the center of the vessel and in conjunction with the hydrodynamics interactions between cells causes a formation of a cell-free layer near the vessel wall. This effect induces a lateral migration of white blood cells towards the vessel wall, this migration is known as margination. When the leukocytes flow near the vessel wall they could enter a second phase known as Rolling phase in which the cells move significantly slower than the mean flow velocity and then enter the firm adhesion phase in the endothelial wall. The second and third phase affects red blood cells flow due to collisions between white and red blood cells. These cellular phenomena have motivated the study of the flow of nano/microparticles as possible vehicles for a controlled drug release and as a way of studying the different phenomena of the blood flow that have not been completely characterized. To achieve the last topic, the use of an additional force on the particles has been used generated by an external magnetic field with the purpose of having a better control over the particles' dynamics. In this work the particle flow in cremaster post-capillary venules is characterized. For particle administration a catheterization is done in the jugular vein using previously used protocols [18]. For this work, superparamagnetic fluorescent particles of $0.9\ \mu\text{m}$ were used to trap them in the endothelial wall using a cylindrical magnet. Our results suggest that the particles continue their flow through the vessels once the magnet is removed. Thanks to the particles' individual trajectories, it was possible to determine the existence of a notable fluctuation in the instantaneous particle velocity, which is possibly caused by hydrodynamic interactions with the red and white blood cells. In these experiments it was possible to observe the collision between a red blood cell and a leukocyte, this sets an example of the strong influence that the leukocytes have in the blood flow. It is worth of mentioning that the cremaster muscle's contraction affects the appropriate obtention of trajectories, so it was necessary to make a correction considering the trajectories of adhered particles to the endothelial wall. With the measurements of magnetic field along the cylindrical magnet's axis, an estimation of the magnetic force over the particles is made and

we noted that the particles begin their attraction to the magnet at a distance lower than 2 mm. The results indicate that the advection is a lot bigger than diffusion and the gravitational force. In addition, considering that the magnetic force and the viscous drag force act in opposite directions, it is noted that the drag force also overcomes the magnetic force. Nevertheless, and according to the observations in literature[35], this does not prevent particle trapping.

1

Introducción

1.1 Microcirculación

El sistema circulatorio de un organismo tiene las funciones de suministrar oxígeno a los diferentes tejidos del organismo, entregar nutrientes(hormonas, electrolitos, etc.) y eliminar desechos metabólicos. El sistema circulatorio se divide en Pulmonar y Sistémico. La circulación pulmonar consiste en el bombeo de la sangre (sin oxígeno) que realiza el corazón hacia los pulmones, con el propósito de oxigenar la sangre para después regresar al corazón y pasar a la circulación sistémica. La circulación sistémica inicia cuando la sangre con oxígeno en el corazón es bombeada a los diferentes tejidos. Esta sección del sistema circulatorio es la que entrega los nutrientes y transportan la sangre con oxígeno a las diferentes zonas del organismo. Todo esto se hace a través de los vasos sanguíneos que son los canales por los que fluye la sangre.

Los vasos sanguíneos del organismo se clasifican según su tamaño y función. Las arterias que salen del corazón son la aorta y las arterias pulmonares. Estas se denominan elásticas y llevan la sangre a las arterias de mediano calibre. Las arterias grandes se van bifurcando y así reducen su tamaño. Las arterias intermedias son también llamadas musculares y tienen la función de

regular el flujo sanguíneo en distintas partes del organismo. Las arteriolas son de menor tamaño y regulan el flujo sanguíneo a los capilares. Los capilares son el punto de unión entre los dos sistemas circulatorios, y en estos se realiza el intercambio de líquidos y nutrientes. Es aquí donde tiene lugar la microcirculación. Para el retorno de la sangre al corazón, la sangre que sale de los capilares pasa a las vénulas que recogen esa sangre que continúa fluyendo por las venas y regresan la sangre al corazón para continuar con el ciclo.

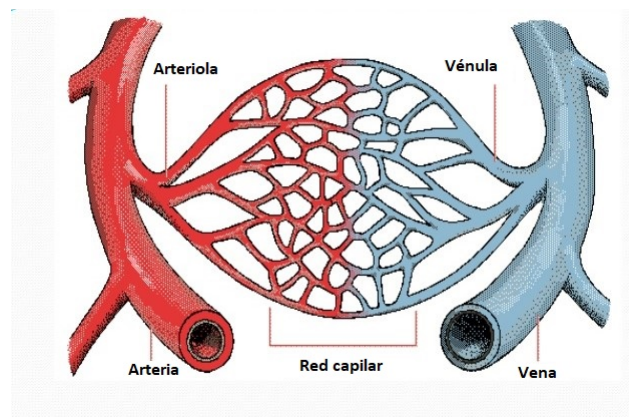


Figura 1.1: Ramificación de los vasos sanguíneos. Imagen obtenida de la red.

La microcirculación (transporte de nutrientes y eliminación de desechos) de cada organismo está organizada específicamente para atender sus necesidades. Cada arteria se ramifica de 6 a 8 veces antes de que sean lo suficientemente pequeñas para denominarse arteriolas, que, en general, tienen diámetros alrededor de $20\text{-}30\ \mu\text{m}$. Entonces, las arteriolas se ramifican entre 2 y 5 veces, alcanzando diámetros de aproximadamente $4\ \mu\text{m}$ en sus extremos cuando aportan la sangre a los capilares. Después la sangre pasa a las vénulas postcapilares, estas tienen un diámetro aproximado de $20\ \mu\text{m}$ para después pasar a las vénas con diámetros de aproximadamente $250\ \mu\text{m}$ [15].

1.2 Músculo cremáster, herramienta para la visualización de vasos sanguíneos

Un método que ha probado ser eficaz en los estudios de la microcirculación es la visualización de los vasos sanguíneos a través del músculo cremáster[13][14][17][36][38]. El músculo cremáster es un músculo esquelético que cubre el testículo, que se deriva de los músculos internos del abdomen (oblicuo y transversal) a medida que los testículos descienden a través del canal inguinal y tiene la función de brindar soporte y mantener la temperatura de los testículos de un organismo mediante la contracción y relajación de los mismos. Al ser un músculo esquelético su estructura molecular está conformada por los filamentos de actina y miosina que generan la contracción. Esta contracción es debido a que los filamentos de actina son jalados a lo largo de los filamentos de miosina reduciendo la distancia entre los discos z.

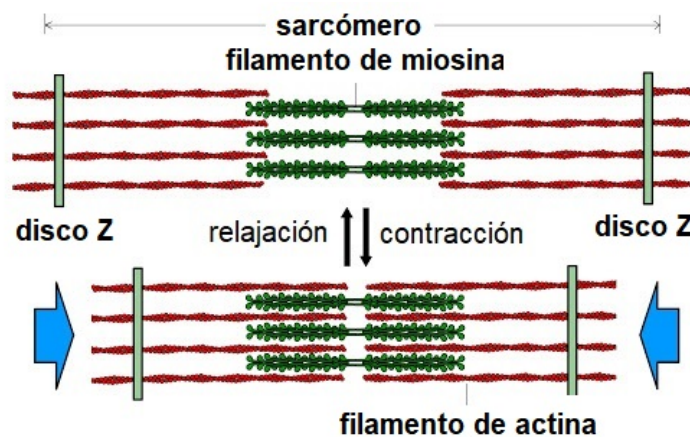


Figura 1.2: Estructura molecular del músculo esquelético. Imagen obtenida del libro de Neurofisiología para estudiantes de medicina de la UNAM [16].

El músculo cremáster ha sido extensamente usado para estudios de la microvasculatura debido a su transparencia y conveniencia, ya que es posible observar el flujo de los diferentes componentes celulares que conforman la sangre tanto en ratón[11][13][17][38] como en rata[4][14][36].

1.3 Materiales con propiedades magnéticas

Un campo magnético puede ser generado por el paso de corriente a través de un material conductor o por un imán permanente. Un imán permanente (figura 1.3) posee un campo magnético que va de su polo norte a su polo sur, generando fuerzas de atracción o repulsión a distintos materiales, con carga opuesta que poseen características magnéticas. En el presente trabajo únicamente son de interés los materiales con propiedades ferromagnéticas y paramagnéticas.

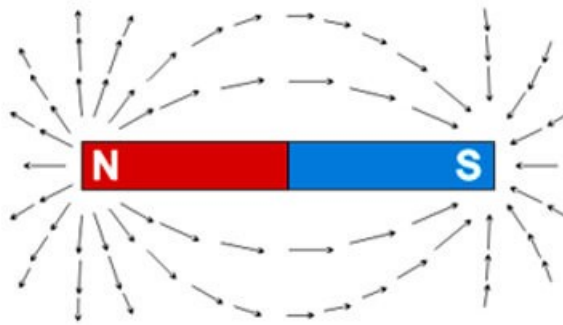


Figura 1.3: Representación del campo magnético de un imán. Imagen obtenida de la red.

Los materiales ferromagnéticos tienen una configuración de átomos que favorece la interacción entre dipolos magnéticos. Estos se alinean paralelamente dentro de dominios magnéticos orientados aleatoriamente, lo que genera que el material no tenga un campo magnético en sí mismo. Los materiales ferromagnéticos son todos los materiales que, tras la aplicación de un campo magnético externo, el campo magnético dentro de este es mayor al aplicado. Esto es debido a su alta permeabilidad magnética que causa que sus dominios magnéticos se orienten en dirección al campo magnético aplicado, reforzando su intensidad. De igual manera, al retirar el campo magnético, el campo magnético del material no desaparece por completo, formando un imán permanente. Algunos de estos materiales son hierro, níquel, cobalto, acero, etc.

El superparamagnetismo es una forma de magnetismo que surge en nanopartículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas que están constituidas por un solo dominio magnético. El diámetro típico de las nanopartículas se encuentra en el rango de 3-50 nm [24], dependiendo del material. Bajo estas condiciones, el momento magnético de las nanopartículas está constituido por la suma de los momentos magnéticos de todos los átomos que constituyen el dominio magnético, el cual es conocido como momento magnético gigante. En estos materiales existe una temperatura de transición conocida como temperatura de Curie. Sin la presencia de un campo magnético externo, el momento magnético de dichas nanopartículas es cero. En cambio, a temperaturas por debajo de esta temperatura de transición es posible magnetizar a las nanopartículas tal como ocurre con partículas paramagnéticas con la diferencia que la susceptibilidad magnética es mucho más grande.

1.3.1 Campo magnético generado por un Imán

Debido a que en este trabajo se utiliza un imán con geometría cilíndrica, en esta sección se describe la teoría desarrollada por Camacho y Sosa [1] para el cálculo del campo magnético en dicha geometría. Los autores asumen que la distribución de los dipolos del imán es continua. Estos ocupan un volumen “ dV ” con lo que se tiene un momento dipolar magnético expresado por $d\vec{m} = \vec{M}dV$. Además, se considera la magnetización constante y no afectada por otro campo magnético. También es importante recalcar que siempre se considera la magnetización en la dirección del eje z , $\vec{M} = M\hat{z}$. Todo con el fin de proveer una alternativa para la determinación del campo de inducción magnético de un imán.

Es necesario conocer que el potencial escalar magnético es producido por un dipolo magnético en el origen y está dado por

$$\Phi_{dipole} = -\frac{1}{4\pi} \frac{\vec{m} \cdot \hat{n}}{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}, \quad (1.1)$$

donde \vec{m} es el momento dipolar magnético y \hat{n} el vector unitario en dirección al eje Z . El punto P se encuentra a una distancia z respecto al punto más cercano al imán de altura L y radio R (ver figura 1.4).

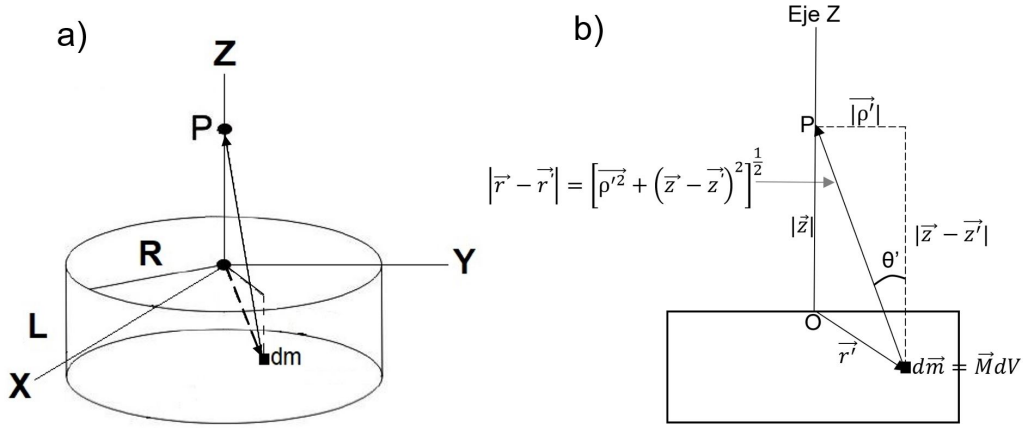


Figura 1.4: a) Esquema de un imán cilíndrico de radio R y longitud L . \vec{dm} representa el momento dipolar magnético del elemento del volumen dV . Imagen modificada de la referencia [1]. b) Vista lateral del imán.

De la ecuación 1.1 y considerando la figura 1.4b, el potencial escalar del elemento de volumen dV está dado por

$$d\Phi_{axis} = -\frac{1}{4\pi} dm \frac{\cos\theta'}{|\vec{r} - \vec{r}'|^2} \hat{n}. \quad (1.2)$$

Para determinar las contribuciones de los dipolos infinitesimales de todo el imán, el potencial escalar se integra sobre todo el volumen cilíndrico. Tras la integración y tomando en cuenta la figura 1.4, $|\vec{r} - \vec{r}'| = [\rho'^2 + (z - z')^2]^{1/2}$, y excluyendo la constante aditiva, el potencial escalar en el punto P está dado por

$$\Phi_{axis}(z) = -\frac{M}{2} \left(\sqrt{z^2 + R^2} - \sqrt{(z + L)^2 + R^2} \right). \quad (1.3)$$

Sabiendo que $\vec{B} = \mu_0 \nabla \Phi$, donde μ_0 es la permeabilidad en el vacío y definiendo a $B_r = \mu_0 M$ que es conocido como densidad de flujo residual y que es una medida de la magnitud del campo magnético del imán, se obtiene

$$B(z) = \frac{B_r}{2} \left(\frac{L+z}{\sqrt{(L+z)^2 + R^2}} - \frac{z}{\sqrt{z^2 + R^2}} \right). \quad (1.4)$$

Tras la comparación entre los cálculos y las mediciones del campo de inducción magnético en imanes de Neodimio-Hierro-Boro, Camacho y Sosa concluyen que este método provee una buena aproximación del campo magnético con diferentes geometrías (ver las referencias [8] y [22]).

1.4 Fuerzas dominantes sobre partículas en la microcirculación

La dinámica de las partículas dentro un vaso sanguíneo puede depender de diferentes efectos tales como el movimiento Browniano, la sedimentación, la fuerza de arrastre, las colisiones con lo eritrocitos y leucocitos. Además de estos efectos, en este trabajo, las partículas que van fluyendo dentro de las vénulas se someten a un campo magnético externo. Como se mostrará más adelante, las fuerzas dominantes sobre las partículas que se utilizan en este trabajo son la fuerza de arrastre viscoso, las colisiones con los glóbulos rojos y blancos y la fuerza magnética generada por un imán. A continuación se explica como se determinan la fuerza de arrastre y la fuerza magnética generada por un imán.

1.4.1 Fuerza de arrastre

La fuerza de arrastre tiene su origen en la fuerza que ejerce un fluido alrededor de una partícula en la dirección del flujo y cuya magnitud para una partícula esférica está dada por la ley de Stokes,

$$F_v = 6\pi\eta au, \quad (1.5)$$

donde η es la viscosidad dinámica del fluido, a es el radio de la partícula y u es la velocidad del fluido. Al coeficiente $6\pi\eta a$ se le conoce como coeficiente de fricción viscoso. En el caso de la circulación sanguínea, el fluido no es Newtoniano. Entonces, con el fin de realizar una estimación de la viscosidad del fluido se toma un fluido de ley de potencia, que es una forma de fluido Newtoniano generalizado (fluido Newtoniano independiente del tiempo) en la cual la viscosidad está dada por [32]

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}, \quad (1.6)$$

donde K es el índice de consistencia del fluido, γ es la velocidad de corte y n es el índice de potencia de flujo. El valor de K es indicativo del valor de la viscosidad del medio. Cuando $n=1$, el fluido es Newtoniano. Mientras que en el caso de $n<1$ la viscosidad decrementa si la tasa de corte aumenta (shear thinning). Si $n>1$ la viscosidad incrementa con la tasa de corte (shear thickening). El modelo de adelgazamiento de la tasa de corte ($n<1$) es utilizado comúnmente para estudios de la sangre[32]. Es importante recalcar que este cálculo de la fuerza de arrastre no toma en cuenta ningún otro factor en los vasos sanguíneos. Cabe mencionar que este modelo de ley de potencia es eficaz cuando la tasa de corte se encuentra en valores intermedios.

En un estudio realizado por Windberger y colaboradores [34], se determinó la viscosidad de la sangre entera de distintas especies (incluyendo ratón) a un hematocrito del 40 % con diferentes tasas de corte. La tasa de corte para un contenedor cilíndrico está definida como $\dot{\gamma} = u_m/D$, siendo u_m la velocidad media de las partículas y D el diámetro del vaso. En este trabajo, para determinar la viscosidad de la sangre en distintos valores se realiza un ajuste por mínimos cuadrados de sus datos utilizando la ecuación 1.6 (figura 1.5).

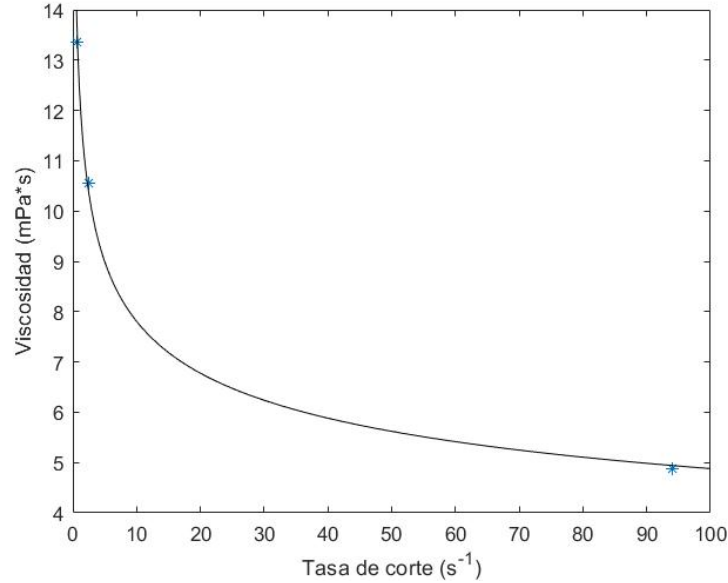


Figura 1.5: Ajuste de la ecuación 1.6 con los datos obtenidos del trabajo de Windberger y colaboradores (*) [34]. El ajuste provee una $K=12.49 (Pa \cdot s^n)$ y $n=0.79$.

1.4.2 Fuerza magnética

Para determinar la fuerza magnética aplicada a una partícula con propiedades magnéticas tras la aplicación de un campo magnético externo se sigue el procedimiento de Pengtao Yue y colaboradores [33] que parte de la fuerza magnética la cual está dada por

$$\vec{F}_m = \int_V \mu_0 (\vec{M} \cdot \nabla) \vec{H} dV, \quad (1.7)$$

donde \vec{M} es la magnetización de la partícula, \vec{H} es la intensidad del campo magnético externo aplicado y V el volumen de la partícula. Tomando en cuenta que el tamaño de las partículas es muy pequeño en comparación con las dimensiones del imán, el campo magnético externo se puede considerar una constante dentro del volumen de las partículas, con lo cual la magnetización está dada por la fórmula de Clausius-Mosotti $\vec{M} = \frac{3\chi}{3+\chi} \vec{H}$, donde χ es la susceptibilidad magnética del óxido de hierro (Fe_3O_4), que es material del que están hechas las partículas. Entonces la ecuación para la fuerza magnética se reduce a

$$\vec{F}_m = \frac{3\mu_0\chi V}{3 + \chi} (\vec{H} \cdot \nabla) \vec{H}. \quad (1.8)$$

Así mismo, si únicamente se considera la atracción de una partícula magnética a lo largo del eje z hacia el imán, y tomando en cuenta que $\vec{B} = \mu\vec{H}$, se logra obtener H_z con la ecuación 1.4 como

$$H_z = \frac{B_r}{2\mu} \left(\frac{L + z}{\sqrt{(L + z)^2 + R^2}} - \frac{z}{\sqrt{z^2 + R^2}} \right). \quad (1.9)$$

Entonces \vec{H} solo tiene componente en z y al desarrollar la ecuación 1.8 con estas consideraciones se puede aproximar la magnitud de la fuerza magnética como

$$F_m(z) = \frac{3}{4} \frac{\mu_0\chi V B_r^2}{\mu^2(3 + \chi)} \left(\frac{L + z}{\sqrt{(L + z)^2 + R^2}} - \frac{z}{\sqrt{z^2 + R^2}} \right) \left(\frac{1 - (L + z)^2((L + z)^2 + R^2)^{-1}}{\sqrt{(L + z)^2 + R^2}} + \frac{z^2(z^2 + R^2)^{-1} - 1}{\sqrt{z^2 + R^2}} \right). \quad (1.10)$$

En la tabla 1.1 se muestran las magnitudes de los parámetros utilizados. Cabe mencionar que esta aproximación de la fuerza magnética no toma en cuenta ninguna otra fuerza que altere la dirección de las partículas.

Parámetro	Magnitud
μ_0	$4\pi \times 10^{-7} \text{ N/A}^2$
χ	0.041 [46]
μ	$1.30 \times 10^{-6} \text{ N/A}^2$
a	$4.5 \times 10^{-7} \text{ m}$

Tabla 1.1: Tabla de magnitudes de los parámetros utilizados para determinar la fuerza magnética. El valor de la susceptibilidad magnética fue determinada a 26.6°C [46]. Los parámetros que no se aprecian en la tabla son dependientes de la distancia entre el imán y las partículas.

1.5 Ley de Hagen Poiseuille

La ley de Poiseuille permite determinar el flujo laminar de un fluido incompresible y Newtoniano (viscosidad constante) a través de un tubo o canal cilíndrico de longitud infinita (ver figura 1.6). Aunque este no es el caso de la circulación de la sangre (fluido adelgazante) en los vasos sanguíneos, nos permite realizar una generalización del comportamiento del perfil de velocidades del flujo sanguíneo.

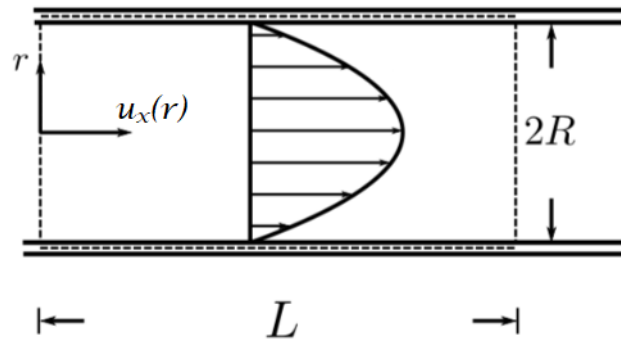


Figura 1.6: Flujo de Poiseuille en 2D.

El flujo es causado por un gradiente de presión $\frac{dp}{dx}$ en el eje horizontal y sabiendo que la velocidad axial, $u_x(r)$, es una función de la coordenada radial, r , la ecuación de continuidad de simetría axial de un fluido incompresible resulta en

$$\frac{\partial u_x}{\partial x} = 0. \quad (1.11)$$

Considerando lo anterior, las ecuaciones de Navier-Stokes para un fluido incompresible con viscosidad constante (Newtoniano) son reducidas a

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \eta \left\{ \frac{\partial^2 u_x}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_x}{\partial r} \right\}, \quad (1.12)$$

$$\frac{\partial p}{\partial r} = 0. \quad (1.13)$$

Como se aprecia en la ecuación 1.13, la presión es una función únicamente de x y esto permite integrar la ecuación 1.12 para obtener el perfil de velocidad como función de r

$$u_x(r) = \frac{r^2}{4\eta} \left(\frac{dp}{dx} \right) + C_1 \ln r + C_2, \quad (1.14)$$

donde las constantes C_1 y C_2 son constantes de integración determinadas por las condiciones de frontera. El valor de C_1 debe de ser 0 debido a que la velocidad no puede ser infinita. Por ende, la condición sin deslizamiento (no-slip) en la pared de la tubería requiere que $u_x(R) = 0$, lo que lleva a

$$C_2 = -\frac{R^2}{4\eta} \left(\frac{dp}{dx} \right). \quad (1.15)$$

Considerando que la velocidad máxima ocurre cuando $r=0$ y que dicha velocidad es $u_{max} = -\frac{R^2}{4\eta} \left(\frac{dp}{dx} \right)$, entonces el perfil de velocidad del flujo de Poiseuille en una tubería circular es

$$u_x(r) = u_{max} \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right), \quad (1.16)$$

donde las presiones p_1 y p_2 pueden ser medidas en 2 posiciones diferentes en la dirección del eje horizontal x para una distancia l , con lo cual se determina $\frac{dp}{dx} = (p_1 - p_2)/l$. En el caso del flujo sanguíneo, el perfil de velocidades obedece a una ecuación diferente al flujo parabólico y se conoce como perfil de ley de potencias [47][51] y sigue la siguiente ecuación

$$u_x(r) = u_{max} \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^k \right), \quad (1.17)$$

donde u_{max} es la velocidad máxima y k es el parámetro de modificación al perfil parabólico, el cual es mayor a 2. Esto hace que el perfil de velocidades se aplane en comparación al perfil parabólico.

1.6 Antecedentes

En esta sección se mostrarán los estudios realizados tanto de modelado como in vivo que se han realizado para un mejor entendimiento de la dinámica de partículas utilizando un campo magnético.

En el 2017 V. Hamdipoor y colaboradores [2] realizaron un estudio de simulaciones computacionales sobre la dinámica de micro/nanopartículas con propiedades magnéticas que fluyen por una red bidimensional de vasos sanguíneos y utilizaron un dispositivo háptico basado en un campo magnético, generado por bobinas de tipo Helmholtz, para dirigir a las partículas a través de la red vascular. Como se explicó anteriormente, dentro de los vasos sanguíneos hay diversas fuerzas que actúan sobre las partículas. Sin embargo, considerando que estos autores utilizaron partículas entre 0.4 y 1 μm de diámetro, únicamente se tomaron en cuenta las fuerzas dominantes sobre las partículas para simplificar el cálculo de las trayectorias y para facilitar el uso de este dispositivo en tiempo real. Las fuerzas consideradas fueron la fuerza de arrastre dada por la ley de Stokes y la fuerza magnética. Para simplificar el efecto que tienen los glóbulos rojos en la dinámica de las partículas, únicamente se utilizó el perfil de velocidad de la ley de potencias (Eq. 1.17). Los resultados muestran que el uso del dispositivo háptico y un ambiente virtual pueden mejorar significativamente el direccionamiento de partículas y por lo tanto podrían utilizarse para mejorar la focalización de fármacos en sitios específicos en redes vasculares complejas.

Un estudio más realista en cuanto a la inclusión de los diferentes fenómenos presentes en el flujo de partículas en vasos sanguíneos es el realizado por I. Rukshin y colaboradores en el 2017 [22]. Estos autores modelan el atrapamiento individual de partículas superparamagnéticas en un vaso sanguíneo hacia una región de la pared del vaso que pudiera representar la superficie de un tumor. Para llevar a cabo este estudio se tomó en cuenta la fuerza de arrastre viscosa debido al flujo sanguíneo, una fuerza magnética externa que lleva las partículas hacia el tumor, el movimiento Browniano debido a que el radio de las partículas modeladas es de 100 nm y finalmente la colisión entre partículas y glóbulos rojos. Esta información es incluida en una

ecuación diferencial estocástica que contiene un término difusivo que incluye el efecto del movimiento Browniano de las partículas y un término estocástico que depende del gradiente de velocidad local y que representa a las interacciones hidrodinámicas entre partículas y glóbulos rojos. Con esto se determina que la difusión causada por las colisiones entre partículas y eritrocitos se sobrepone al movimiento Browniano, lo que enfatiza la necesidad de incluir dichas interacciones y su contribución a la difusión lateral de las partículas más allá del efecto que tienen los glóbulos rojos en modificar la viscosidad de la sangre. Además se determinó que entre menor sea la viscosidad se logra una captura más fácil y más probable, a causa de que se tiene una menor resistencia.

El estudio del flujo de nano/micro partículas en la microcirculación y su manipulación con campos externos también ha resultado muy beneficioso para el modelado de los efectos que ocurren en un tejido como consecuencia de una disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo en una área focalizada de la microvasculatura como lo muestra el trabajo desarrollado por Jie-Min Jia y colaboradores en el 2016 [8]. Estos autores desarrollaron un nuevo método para poder estudiar la isquemia cerebral en vasos sanguíneos en el cerebro de un ratón y lo denominan SIMPLE, 'Stroke Induced with Magnetic Particles' (Accidente cerebrovascular isquémico inducido con partículas magnéticas). Esta técnica implica el uso de nanopartículas superparamagnéticas y la formación de agregados de dichas partículas dentro de los vasos sanguíneos por medio de microimanes de diferentes dimensiones. Esto permite inducir un accidente cerebrovascular isquémico focalizado en ratones despiertos así como controlar la duración de la oclusión, lo cual lo convierte en un método reversible en la oclusión de vasos en la microvasculatura. Con esto se logra una nueva forma de imitar un ataque isquémico transitorio que facilita el estudio del daño causado a diferentes células por la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo.

Adicionalmente, en el 2019 Chiu y colaboradores [4] estudiaron las variaciones del flujo sanguíneo en arteriolas del músculo cremáster de ratas una vez que se inducen agregados de nano/micropartículas utilizando un campo magnético externo, y en particular el efecto que tiene el cubrir nano/micropartículas magnéticas (de 50 y 250nm de diámetro) con Polietilenglicol

(PEG). Utilizando un método conocido como moteado láser, estos autores observaron cambios en el flujo sanguíneo que ocurren al colocar el imán cerca del músculo por un período de 14 minutos. Es importante denotar que el tamaño de las partículas también tiene una fuerte influencia en la recuperación del flujo una vez que el imán es retirado. En el caso de las partículas de 250 nm cubiertas con PEG, el flujo retorna a los valores basales cuando se deja de aplicar el campo magnético, mientras que en el caso donde se utilizan partículas sin PEG el flujo se recuperó únicamente al 70 %. Por otro lado, para las partículas de 50 nm, el flujo se recuperó en un 85 % mientras que en el caso donde no se utilizó PEG el flujo solo se incrementó ligeramente debido a que no se formaron agregados de partículas. Cabe mencionar que tras las oclusiones, tanto con partículas de 50 nm como de 250nm, se aprecian distintas oscilaciones del flujo, las cuales no son explicadas por los autores de este artículo. Estos resultados implican que el PEG mejora la captura de las nano/micropartículas magnéticas y reduce el riesgo de oclusión de las arteriolas por partículas pegadas a la pared endotelial al retirar el imán.

Así mismo, para estudiar la dinámica de micropartículas en vénulas, es necesario también considerar el efecto que tienen los glóbulos blancos en el flujo sanguíneo. Los glóbulos blancos llevan a cabo su función fisiológica viajando en proximidad a la pared de los vasos debido a un proceso conocido como marginación, en el cual los leucocitos migran hacia la pared del vaso como resultado de las interacciones hidrodinámicas con los glóbulos rojos[42]. La dinámica de los eritrocitos es tal que al acercarse a las paredes se induce una fuerza de sustentación lateral causada por las interacciones hidrodinámicas con las paredes que impulsa a dichas células hacia el centro del vaso generándose una zona conocida como capa libre de células rojas. Por otro lado, las interacciones hidrodinámicas entre eritrocitos en regiones con altas concentraciones tienden a dirigir transversalmente a dichas células hacia las paredes de los vasos. Esto último en conjunto con las colisiones entre eritrocitos y leucocitos, la esfericidad de los leucocitos y su rigidez generan el fenómeno de marginación de los glóbulos blancos. Una vez que los leucocitos se marginan, una fracción de estas células entran en una segunda fase donde ruedan lentamente a lo largo del endotelio debido a la activación de los receptores de quimiocinas que se unen a los ligandos de quimiocinas presentes en el endotelio. Esto causa cambios de afinidad en las

integrinas de los leucocitos, lo que une a los leucocitos con la pared endotelial. Esta unión permite que dichas células comiencen a rodar sobre la pared de los vasos buscando un lugar para transmigrar el endotelio. Por lo tanto, los glóbulos blancos en la fase de rodamiento y que se mueven a una velocidad pequeña en comparación con la velocidad del fluido y los leucocitos en la fase de firma adhesión a la pared representan obstáculos para el flujo de los glóbulos rojos en las vénulas[44]. En el 2020, Wang y colaboradores [37] realizaron un estudio donde se modela el flujo de glóbulos rojos en condiciones comparables con el flujo sanguíneo en vénulas. Aunque el estudio fue llevado a cabo para determinar el efecto de la presencia de microtrombos en el flujo de eritrocitos en vasos, las dimensiones de los microtrombos (obstáculos) y ancho del vaso son comparables respectivamente con las dimensiones de los glóbulos blancos y el diámetro típico de una vénula. Estos autores realizaron simulaciones computacionales bidimensionales para determinar el efecto que tienen 2 obstáculos circulares (fijos en las paredes opuestas del vaso) en la deformación y velocidades de 2 glóbulos rojos. Para determinar el papel que juega el efecto combinado de los 2 obstáculos, la posición de uno de los obstáculos se coloca a una distancia axial que va desde 0 hasta 1.5 veces el ancho del vaso respecto al primer obstáculo. En todos los casos, los 2 eritrocitos parten con la misma orientación, posición longitudinal y distancia respecto al centro del vaso antes de interactuar con los obstáculos. La deformación de los eritrocitos es significativamente grande para el caso en que los dos obstáculos se encuentran en la misma posición longitudinal debido a que la sección transversal es significativamente reducida de tal forma que uno de los eritrocitos pasa antes que el otro. En cambio la deformación de las células rojas es máxima en el caso de que uno de los obstáculos se encuentra desplazado una fracción de su tamaño debido a que las dos células pasan simultáneamente entre los obstáculos y las paredes del vaso. Cuando la distancia axial entre los obstáculos es varias veces el diámetro de los obstáculos, cada obstáculo contribuye de forma independiente a la deformación de las células y dichas deformaciones celulares tienen un valor más pequeño en comparación con los casos anteriores. En cuanto a la velocidad de los eritrocitos, dichas células alcanzan una velocidad máxima cuando los obstáculos se encuentran en la misma posición lateral. Para el caso donde los obstáculos no coinciden en su posición longitudinal, los valores máximos de las velocidades

de cada célula coinciden con la posición del obstáculo que le genera la mayor desviación en la trayectoria, aunque con un valor más pequeño en comparación con el caso donde los 2 obstáculos se encuentran en la misma posición. Por lo tanto, la presencia de glóbulos blancos en las vénulas genera una interacción entre células que involucra un acoplamiento complejo entre las deformaciones y velocidades de los eritrocitos, así como desplazamientos en la dirección radial de dichas células.

1.7 Planteamiento del problema

Lo expresado en la sección anterior deja claro que la dinámica de partículas en vasos sanguíneos está lejos de entenderse completamente, particularmente en vénulas debido al efecto de los eritrocitos y leucocitos en las fases de rodamiento y de firme adhesión a la pared endotelial. El esfuerzo realizado para entender la dinámica de las nano/micro partículas dentro del flujo sanguíneo es debido a que se considera que las nano/micropartículas pueden ser útiles como vehículos para una liberación controlada de fármacos una vez que se logren adherir a la pared endotelial en sitios específicos dentro de la red vascular lo cual puede servir para el tratamiento de infecciones, cáncer, o de desórdenes inflamatorios, etc. Una posible vía para lograr esto es a través del efecto de la marginación que les ocurre a las partículas al fluir dentro de los vasos sanguíneos el cual es similar al efecto de la marginación experimentada por los glóbulos blancos y que se mencionó anteriormente. Es decir, la marginación de partículas se debe fundamentalmente a las interacciones hidrodinámicas entre las partículas y los glóbulos rojos lo que induce una migración lateral de partículas hacia la capa libre de células que se genera cerca de la pared endotelial. Sin embargo, este efecto es altamente dependiente del tamaño y forma de las partículas, así como de su rigidez. Adicionalmente, se ha mostrado recientemente (2018) con un modelo computacional[48] que el efecto de la marginación de partículas con tamaño y forma de plaquetas disminuye considerablemente al aumentar el número de glóbulos blancos en las fases de rodamiento y de firme adhesión, por lo que este efecto posiblemente no sea efectivo para el caso de las vénulas. Cabe señalar que para las simulaciones de la referencia

[48] se consideraron 3 casos con 1, 2 y 3 leucocitos, lo que implica que en un sistema real este efecto puede ser aún más importante. Una segunda vía para lograr un control sobre la dinámica de las partículas como se describió en la sección anterior es a través del uso de un campo magnético debido a que las nano/micro partículas se pueden atrapar en la pared endotelial para posteriormente liberarlas al retirar el imán. Así mismo, para lograr un estudio más detallado de la dinámica de las partículas es necesario el uso de micropartículas fluorescentes a las que se les pueda determinar sus trayectorias, así como de una posible adhesión a la pared endotelial. Para lograr esto en un modelo in vivo se necesita determinar el campo magnético con el cual se pueda lograr el atrapamiento y posterior liberación de las partículas, así como todos los efectos que influyen en su dinámica.

1.8 Hipótesis

El atrapamiento y liberación de partículas magnéticas en la microcirculación con el uso de un imán permite estudiar detalladamente la dinámica de las partículas en los vasos sanguíneos.

1.9 Objetivo general

Caracterizar la dinámica de micropartículas en un sistema in vivo con la aplicación de un campo magnético externo para fomentar el atrapamiento de micropartículas en la microcirculación.

1.9.1 Objetivos específicos

1. Generar un arreglo experimental para la aplicación de un campo magnético externo aplicado en la microcirculación de un modelo in vivo.
2. Determinar los diferentes factores que influyen sobre la dinámica de micropartículas que fluyen en vénulas post-capilares con la influencia de un campo magnético externo.

2

Materiales y métodos

2.1 Cirugía

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de entre 6 y 8 semanas de vida, los cuales son posicionados en una base de acrílico (Figura 2.1) para después proceder a hacer la cirugía. Es importante denotar que todos los procedimientos realizados en el presente trabajo en ratones se llevaron a cabo de acuerdo a las regulaciones Federales para la Experimentación Animal y Cuidado, siguiendo los protocolos éticos de experimentación animal aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del CINVESTAV-IPN.



Figura 2.1: Base de Acrílico.

Antes de la cirugía, el ratón se anestesia con una solución de Ketamina/Xilacina (60mg/kg) que se confirma con la pérdida de reflejos del ratón al generar una pequeña presión en la cola después de un corto periodo de tiempo. El ratón se coloca en forma supina en la base de acrílico (Figura 2.1) y se le fijan sus extremidades a la misma base utilizando cinta, cuidando que el escroto este sobre la base de polidimetilsiloxano (PDMS). Así mismo, con la ayuda de un hilo de sutura se estira la cabeza para fijarla y permitir el acceso al área de interés. La cirugía se divide en 2 secciones con propósitos diferentes que, en conjunto, nos ayudarán a lograr los objetivos antes planteados.

2.1.1 Cateterización de la vena yugular

La cateterización de la vena yugular se hace con el fin de introducir las partículas superparamagnéticas fluorescentes a la circulación del ratón. La cateterización se realiza con base en el artículo de Feng y colaboradores [18]. Se hace un corte vertical a la derecha de la tráquea (teniendo el hocico del ratón en dirección al cirujano), a la altura de la clavícula. De ahí se busca la vena yugular, separando el tejido adiposo, como se muestra en la figura 2.2. Con los hilos de sutura se debe aplicar un poco de tensión para evitar un sangrado prominente. Con pinzas finas se toma una pequeña sección de la vena para después realizar un pequeño corte a la vena, con el fin de insertar el catéter. Para confirmar que el catéter entró en la vena y que no existe fuga se le inyecta un buffer de fosfato salino. Esta solución no afecta de ninguna manera

el organismo, puesto que esta solución emula el líquido extracelular y mantiene el pH estable.

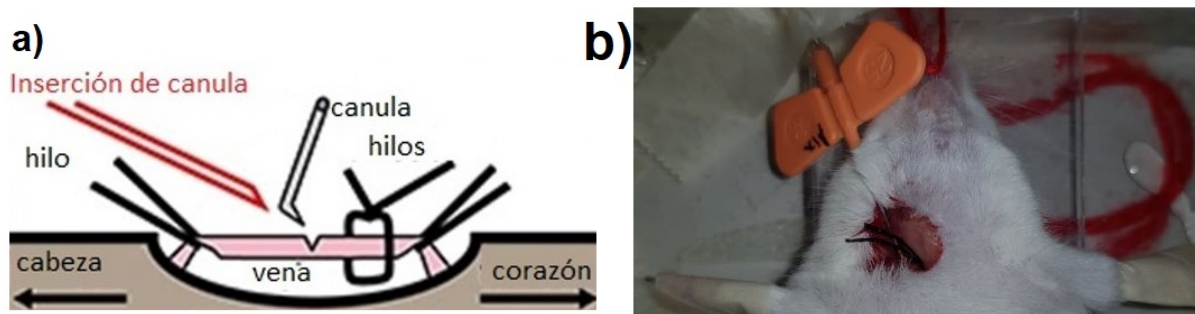


Figura 2.2: a) Representación de la canulación de la vena yugular. b) Canulación de la vena yugular.

2.1.2 Extracción del músculo cremáster en el testículo

El músculo cremáster es una capa delgada que el organismo del ratón utiliza para dar soporte y mantener la temperatura de los testículos. Al ser una capa delgada (aproximadamente $98.5 \mu m$ de grosor en ratones [36]) es un excelente medio para visualizar la microcirculación, en particular permite visualizar el flujo de glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas. Se debe extraer el testículo del ratón jalando el escroto para después proceder a hacer un corte. En dicho corte y con cuidado, se insertan las tijeras y se busca separar el tejido adiposo del testículo, además se quita el tejido circundante. Posteriormente, con unas pinzas se debe sujetar un pequeño segmento del testículo. Después del paso anterior, se puede observar a una capa delgada y transparente que envuelve al testículo. A esa capa delgada se le realiza una pequeña incisión. Esta capa delgada es el músculo cremáster. El corte debe hacerse tan abajo y tan arriba como se pueda. El corte en dirección hacia abajo permite tener la mayor cantidad de músculo para trabajar, mientras que el corte hacia arriba permitirá extraer el testículo y el tejido adiposo y poder extender el músculo. Al testículo y tejido adiposo que se extrae se le hace un nudo con un hilo y se corta lo que permite una mayor visualización del músculo sin obstrucciones. Por último, el músculo cremáster se extiende sobre la base de PDMS y se fija con agujas de acupuntura de manera que se tenga un mayor espacio para visualizar los vasos sanguíneos. Este

procedimiento se realiza con el cuidado suficiente con el fin de lograr el menor sangrado posible. Una vez terminada las cirugías, el músculo es irrigado frecuentemente con PBS para mantenerlo húmedo y a temperatura normal (37°C). En la figura 2.3a se muestra un esquema del músculo cremáster, donde se esquematizan algunos vasos sanguíneos y en la figura 2.3b se observa una imagen del músculo cremáster obtenida en este trabajo.

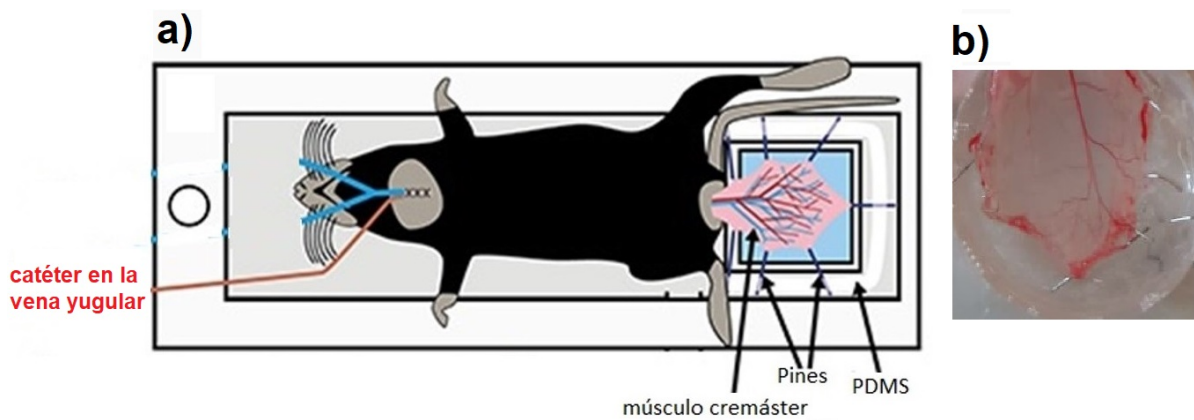


Figura 2.3: a) Esquema de la cirugía completa. b) Visualización del músculo cremáster.

2.1.3 Montaje en microscopio

Una vez realizada la cirugía se procede a montar la base de acrílico con el ratón (como se muestra en la figura 2.4a) en un microscopio Olympus BX-51. Así mismo, el flujo de partículas se observa con el uso de una cámara rápida Photron 60K-M1 y una fuente de luz de fluorescencia Olympus modelo U-LH100HG. Una visualización con microscopía de campo claro de los vasos sanguíneos se muestra en la figura 2.4b.

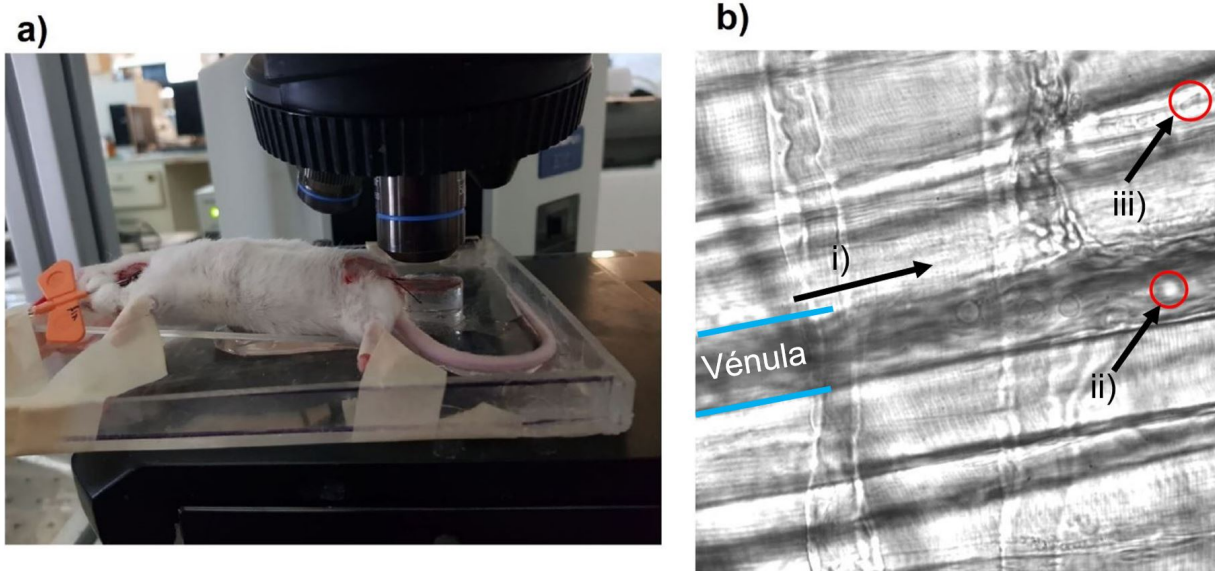


Figura 2.4: a) Montaje del ratón en el microscopio. b) Imagen tomada de la microcirculación, donde i) muestra la dirección del flujo en una vénula, ii) muestra la presencia de glóbulos blancos, iii) muestra un glóbulo rojo fluyendo en un capilar.

2.1.4 Partículas superparamagnéticas fluorescentes

Las partículas superparamagnéticas fluorescentes que se utilizaron en este trabajo son fabricadas por "Bangs Laboratories, Inc" y tienen una concentración del 1% (v/v). Estas partículas cuentan con cristales de óxido de hierro dispersos en un polímero de poliestireno y tienen un diámetro medio de $0.9 \mu\text{m}$ que varía entre $0.4 \mu\text{m}$ y $1.2 \mu\text{m}$. Cabe mencionar que la distribución de tamaños obedece a una distribución Gaussiana. La fluorescencia de este tipo de partículas se debe a un etiquetado interno que consiste en hinchar microesferas poliméricas en una solución orgánica de tinte/solvente, donde el tinte se difunde en la matriz del polímero atrapándolo cuando el solvente es removido. Esto tiene distintos beneficios como permitir la funcionalización de las partículas, protección contra blanqueamiento, amplio rango de tamaños ($20 \text{ nm} - 90 \mu\text{m}$). La longitud de onda de excitación/emisión es de $480/520$, respectivamente [30]. Cabe recalcar que estas partículas tienen una densidad en el rango de $1.5\text{-}2.1 \text{ g/cm}^3$.

2.2 Arreglo experimental con el imán

El arreglo experimental propuesto para la aplicación del campo magnético se basa en 2 formas de posicionamiento de un imán cilíndrico de 2 mm de longitud por 1 mm de diámetro (Jiaozuo Zhelin Magnet Co., Ltd). El primer tipo de posicionamiento se llevó a cabo con el uso de una cuña de PDMS que se coloca sobre el músculo cremáster con el fin de que el eje del imán cilíndrico tenga una inclinación de aproximadamente 45° a la dirección del flujo del vaso sanguíneo que se va a analizar. También es importante mencionar que el imán y el músculo están separados una distancia de 2.4mm aproximadamente. La imagen de la cuña se muestra en la figura 2.5. Esta cuña se fabricó con PDMS debido a que es un material fácilmente manejable, ligero y biocompatible. Así mismo, en la figura 2.6 se muestra un esquema del posicionamiento de la cuña sobre el músculo cremáster. Ahí se observa el distanciamiento aproximado entre el imán y el músculo antes mencionado.



Figura 2.5: Cuña de PDMS con el imán.

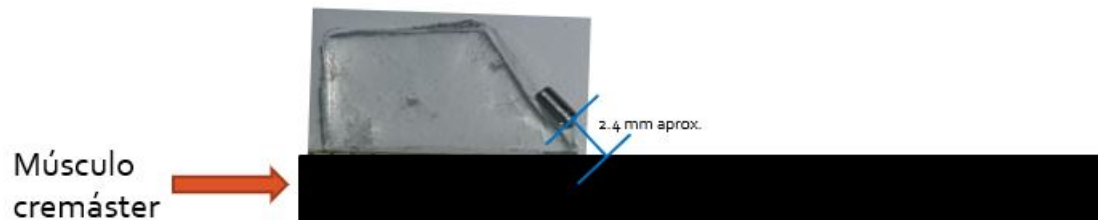


Figura 2.6: Esquematización del posicionamiento de la cuña sobre el músculo cremáster.

El segundo tipo de posicionamiento es con el imán cilíndrico puesto de manera vertical

en contacto con el músculo cremáster, con el fin de aplicar un campo magnético de mayor intensidad. En este caso se opta por colocar el imán sobre el músculo de tal manera que el eje del imán apunte en la dirección de una arteriola que se encuentra a aproximadamente a 2 mm de la zona de interés (con vénulas postcapilares). Para estos experimentos se requiere que el imán se coloque sobre el músculo antes de iniciar la grabación del video y de haber inyectado las micropartículas. Las partículas se inyectan después de 10-15 segundos de haber iniciado la grabación. Posteriormente, se permite que el imán actúe sobre las partículas que van fluyendo en el vaso por 15 segundos, después de lo cual es retirado. Finalmente, se continúa con la grabación por otros 60-65 segundos adicionales con el fin de observar el flujo de las partículas atrapadas por el campo.

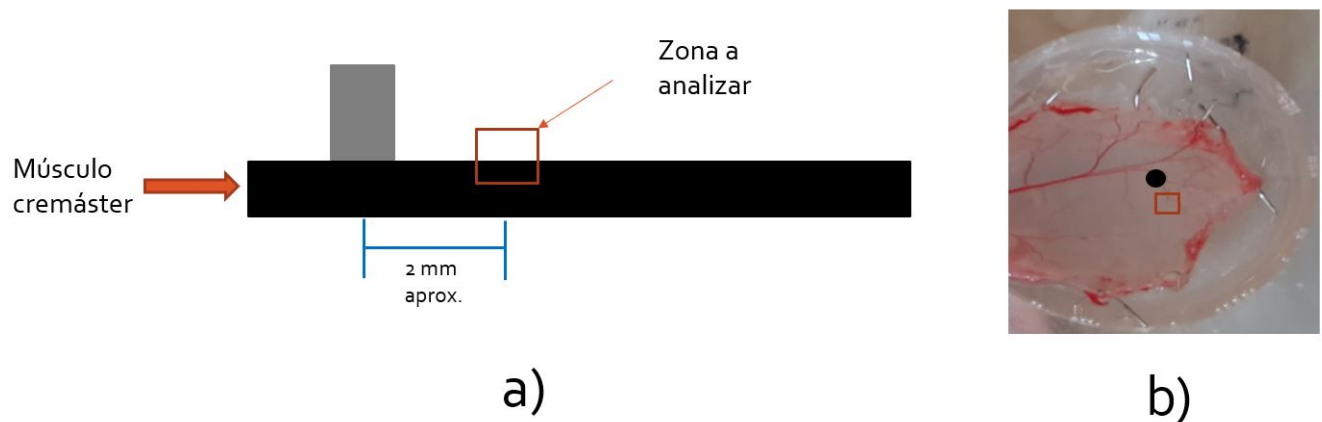


Figura 2.7: a) Esquema de una vista lateral del posicionamiento del imán. b) Imagen esquemática del posicionamiento del imán (disco negro) y zona de interés (cuadrado rojo) sobre el músculo cremáster.

2.3 Análisis de imágenes y videos

El análisis de los videos se realiza mediante el procesamiento de las imágenes, que conforman cada video, con lo cual se determina la dinámica de las partículas al fluir por los vasos sanguíneos (vénulas). Cada imagen contiene una cantidad substancial de información, como intensidad de

brillantez de cada partícula en el torrente sanguíneo, posición, tamaño, etc. Cada píxel en la imagen posee un nivel de gris lo que permite determinar áreas, ubicación de partículas, tamaño, etc. Una imagen representativa de la información que cada píxel contiene se aprecia en la figura 2.8. Cada píxel tiene un valor de nivel de gris con valores que van desde 1 hasta 256 unidades, donde 1 representa el negro y 256 representa el blanco, con lo que se pueden diferenciar diferentes aspectos de una imagen.

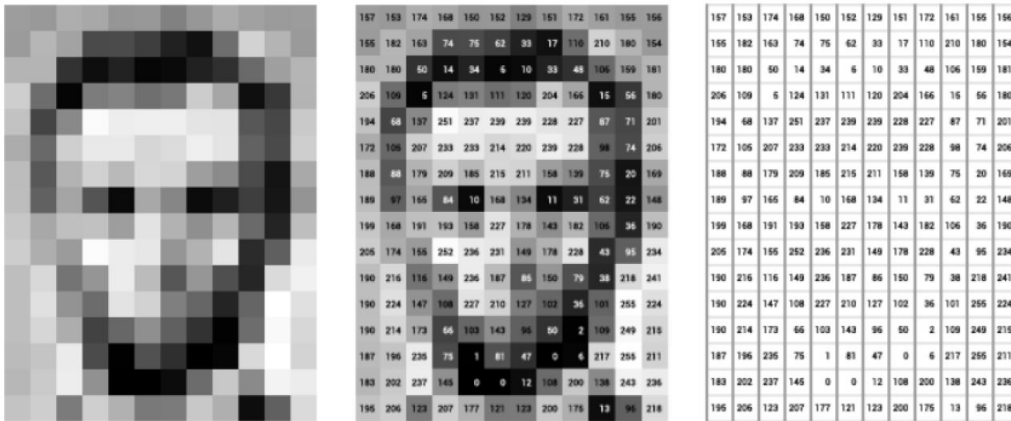


Figura 2.8: Representación de la información obtenida con los píxeles de una imagen.

Antes de iniciar el análisis, se debe de conocer el tamaño de los píxeles que conforman la imagen en micras. Para obtener este valor, se utilizó una regla micrométrica que contiene franjas oscuras en un fondo transparente con una separación de $10 \mu m$ a la cual se le toma una imagen para medir la distancia entre las franjas en píxeles. Con esto se determinó una relación de $1 \text{ píxel} = 0.36 \mu m$.

Los videos a analizar se tomaron a 60 cuadros por segundo con una duración de 90 segundos en cada grabación, utilizando un objetivo de larga distancia focal de 50X. Cada video tiene una resolución de 512×512 píxeles los cuales equivalen a un área de $186 \times 186 \mu m^2$. Los videos se toman en campo de fluorescencia para una óptima visualización de las partículas que van fluyendo en los vasos sanguíneos.

Para la detección de partículas y trayectorias en esos videos se utilizó el algoritmo de Crocker y Grier [10] con el fin de calcular las posiciones y trayectorias de las partículas en

la microvasculatura. Este algoritmo consiste en 5 fases para el seguimiento de las trayectorias. Estas 5 fases son:

1. Restauración de la imagen. Las imágenes digitalizadas usualmente sufren imperfecciones como distorsión geométrica o contraste no uniforme. Con el fin de mejorar la imagen se hace una matriz de convolución con kernels que resaltan regiones que contengan niveles de gris que conforman gaussianas de revolución que corresponden a las manchas brillantes de las partículas mientras que el fondo de la imagen es suavizado.
2. Localización de partículas. Se toma la sección más brillante de la candidata a partícula y se realiza una dilatación en escala de grises.
3. Refinamiento de estimaciones de ubicación. Se toma un área alrededor del píxel más brillante (se asume que esa región es el centro de la partícula).
4. Discriminación de ruido y seguimiento de profundidad. Se genera una distribución de probabilidad que es usada para estimar la posición en z de las partículas. Esto también permite la estimación del error de z en cada cuadro.
5. Ligando ubicaciones para construir las trayectorias. Al encontrar las posiciones de las partículas en el video, se ligan las ubicaciones de cada imagen con la de las subsecuentes para generar las trayectorias de las partículas. Para esto se busca la ubicación más probable en 2 imágenes consecutivas. En el caso de que las partículas sean indistinguibles, la trayectoria se determina con la proximidad entre 2 imágenes. El algoritmo para ligar trayectorias fue realizado considerando la dinámica de partículas Brownianas que no interactúan entre ellas y que tienen asociado un coeficiente de difusión D. Entonces, la probabilidad de que una partícula Browniana se desplace a una distancia δ en el plano (2D) al tiempo τ está dada por

$$P(\delta|\tau) = \frac{1}{4\pi D\tau} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\tau}\right). \quad (2.1)$$

Para que esta fase sea fácil de implementar es necesario que los desplazamientos de las partículas entre 2 cuadros sucesivos del video sea menor a la distancia típica entre las distintas partículas, de otra manera se pueden tener errores en la construcción de las trayectorias. Con todo esto se logra obtener las trayectorias de las partículas y proceder a correlacionarlas con los vasos sanguíneos en imágenes en campo claro (ver figura 2.9).

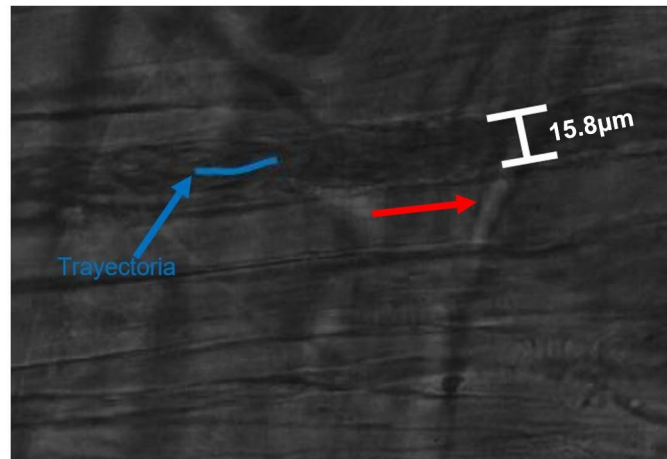


Figura 2.9: Visualización representativa de la trayectoria de una partícula fluyendo por un vaso sanguíneo. La flecha roja indica la dirección del flujo sanguíneo.

3

Resultados y discusión

3.1 Flujo sanguíneo en presencia de glóbulos blancos

Antes de presentar los resultados de este trabajo es importante recordar que existen distintas fuerzas en la microcirculación que determinan la dinámica de las partículas, explicadas en la sección 1.4. Otro factor que genera cambios en las trayectorias de las partículas son los glóbulos blancos (leucocitos) que fluyen en los vasos sanguíneos, en particular los que se encuentran en la fase de rodamiento y de firme adhesión al endotelio. Los leucocitos que rodean la pared endotelial también interactúan con los eritrocitos y con nano/micropartículas que pudieran fluir en los vasos sanguíneos, algunas de las cuales ya se han estudiado con el uso de simulaciones en 2-D. Vijay Pappu y Prosenjit Bagchi [43] observaron que las interacciones hidrodinámicas entre leucocito y eritrocito son dependientes de si el leucocito se encuentra adherido a la pared del canal, y de ser así, los eritrocitos no tienen dificultad al rodearlo. Así mismo, Migliorini y colaboradores [45] determinan que la colisión de los eritrocitos con los leucocitos, que ruedan sobre las paredes del canal, causa un cambio brusco en la trayectoria del eritrocito con el fin de rodear al leucocito, así como un aumento notable en la fuerza (aplicada en el eje en dirección

al flujo) y en el torque. También concluyen que la colisión tiende a favorecer la adhesión de los leucocitos, que resulta de la aplicación de una fuerza dirigida en dirección a la pared del vaso.

Para mostrar las fuertes interacciones entre eritrocitos y leucocitos en la fase de rodamiento, en el presente trabajo se muestra la colisión entre dichas células en una vénula post-capilar de aproximadamente $30.7 \mu m$ (figura 3.1), esto se muestra en la figura 3.1. Las imágenes se obtuvieron aproximadamente 90 minutos después del inicio de la cateterización de la vena yugular. En la figura 3.1a se muestra el inicio de la colisión y se observa la morfología tanto del eritrocito como del leucocito. Así mismo, en la figura 3.1b se observa el eritrocito rodeando el leucocito para continuar su camino en la circulación, este evento ocurre en 0.21 s tras la colisión. En la figura se visualizan 5 leucocitos enfocados de los cuales, con base en su desplazamiento, se obtiene una velocidad promedio de $0.04 \pm 0.02 \mu m/s$. Considerando que la velocidad de flujo promedio en este caso es de $154.9 \mu m/s$ (obtenido mediante la reconstrucción de las trayectorias de las partículas y promediando sus velocidades), la velocidad de los leucocitos resulta ser despreciable, lo que los convierte temporalmente en obstáculos para el flujo de los glóbulos rojos al modificar significativamente su dinámica como lo muestra la figura 3.1.

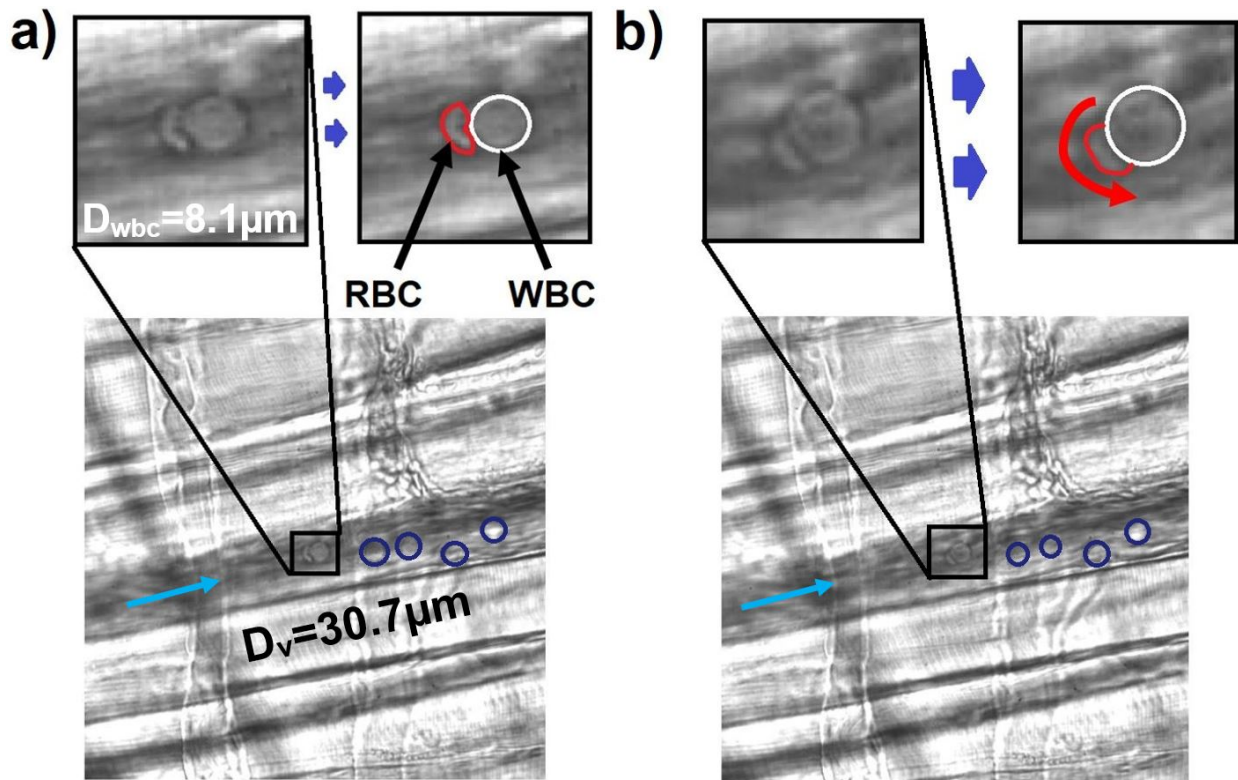


Figura 3.1: a) Colisión de un glóbulo rojo (RBC) con un leucocito (WBC) fijo en la pared de una vénula post-capilar. La flecha indica la dirección del flujo. Así mismo, se muestran 2 recuadros destacando la diferencia en la morfología de las 2 células. b) Desplazamiento del glóbulo rojo después de 0.21 s de la colisión. La flecha roja indica el giro del glóbulo rojo para rodear al leucocito y continuar fluyendo. Los círculos azules señalan a leucocitos rodando en el vaso.

3.2 Análisis del movimiento del músculo

El uso del músculo cremáster para el estudio de la dinámica de partículas dentro del flujo sanguíneo cuenta con la problemática de que dicho músculo presenta un patrón de movimiento aparentemente cíclico debido a la contracción y relajación. Para calcular correctamente las trayectorias de las partículas es necesario conocer dicho patrón de movimiento. En este trabajo se hace uso de las partículas que se pegan a la pared de los vasos como se muestra en la Figura 3.2. Cabe mencionar que las partículas se encuentran adheridas a la pared del vaso durante

todo el tiempo de grabación del video. En la Figura 3.2a se muestra una partícula fluorescente marcada con un círculo rojo y el área en la que esta se desplaza (rectángulo azul). Cabe señalar que esta imagen se obtuvo al superponer la región donde se localiza la partícula sobre una imagen de campo claro con el fin de resaltar únicamente la posición de dicha partícula en el vaso. La componente X y Y de la trayectoria de dicha partícula se muestra en las Figuras 3.2b y 3.2c. Como se puede observar, la trayectoria es cíclica con periodos de movimiento y de reposo, lo cual representa adecuadamente el movimiento horizontal del músculo en el pedestal de PDMS. En estos trazos se observa que también existen pequeñas variaciones en las posiciones en X y Y cuando el músculo se encuentra en reposo. Estos pequeños desplazamientos pudieran ser causados por colisiones con los eritrocitos y leucocitos presentes en la circulación, donde la amplitud de dichos desplazamientos no superan las $1.33 \mu\text{m}$ en X y $0.4 \mu\text{m}$ en Y. Esto desplazamientos son despreciables si se considera que la velocidad media del flujo en este es de $126.4 \mu\text{m/s}$.

Ahora, aplicando la Transformada rápida de Fourier logramos obtener el espectro de frecuencia de las componentes X y Y de la trayectoria del músculo, logrando obtener gráficas como las de la figura 3.3. Recordando que los videos han sido obtenidos a 60 cuadros por segundo, entonces, la figura 3.3 muestra que el máximo ocurre a una frecuencia de 1.9 Hz. Con esto se muestra que existe cierta periodicidad en la contracción y relajación del músculo cremáster. Es importante recalcar que, en este caso, aproximadamente 60 % del tiempo del video el músculo se encuentra en reposo.

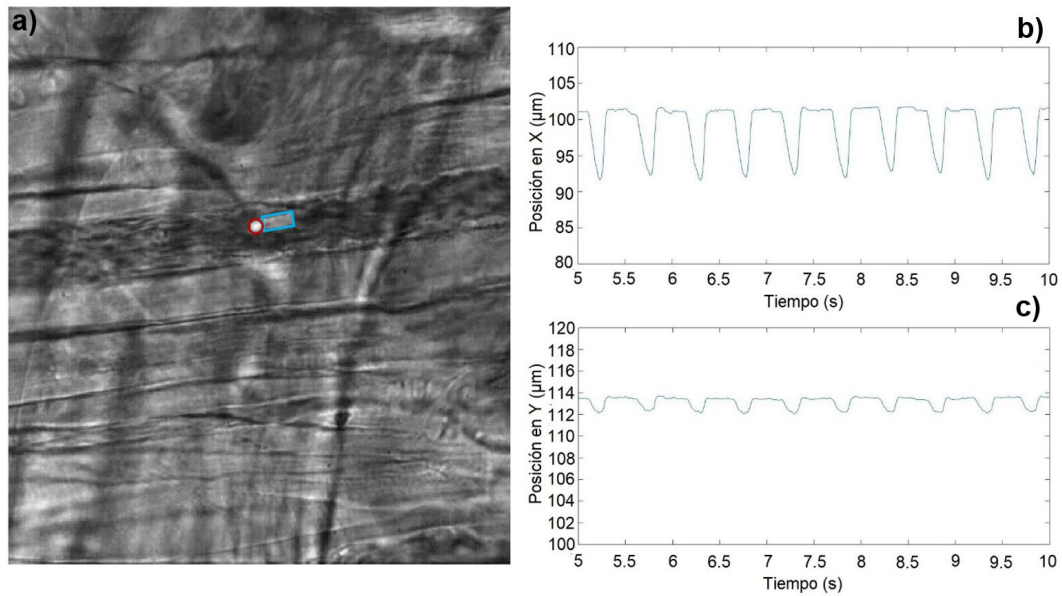


Figura 3.2: a) Partícula adherida a la pared vaso sanguíneo (círculo rojo) y la región del desplazamiento de dicha partícula (rectángulo azul). Componentes X (b) y Y (c) de la trayectoria de una partícula fluorescente adherida a la pared endotelial de una vena. El diámetro del vaso es de $15.8 \mu m$.

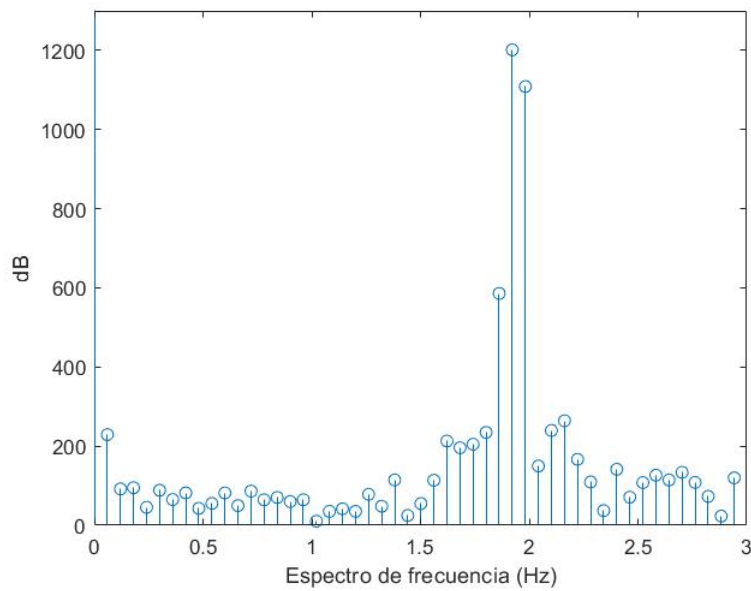


Figura 3.3: Espectro de frecuencia de la contracción del músculo en la dirección X.

Con el fin de determinar si diferentes regiones del músculo se desplazan con la misma frecuencia, se calculó la trayectoria de dos partículas pegadas a la pared endotelial, las cuales están marcadas con círculos rojos en la Figura 3.5. Cabe señalar que en la Figura 3.5 se superpusieron las regiones donde se encuentran las partículas pegadas a la pared endotelial tomadas con microscopia de fluorescencia en una imagen de campo claro. En la figura 3.5 se muestran los trazos de las componentes X de las trayectorias de las dos partículas. En el caso de la partícula de la derecha (partícula 1), parte de su trayectoria se sale del borde de la imagen por lo que cuando no se observa, se asume que la partícula se localiza en una posición justamente en el borde de la imagen y que corresponde a las regiones planas en el trazo de la componente X de la trayectoria de dicha partícula. Como se puede observar, a pesar de localizarse a una distancia aproximada de $132.8 \mu\text{m}$ el movimiento de ambas partículas está sincronizado. Esto sugiere que existe una sintonía en el movimiento de contracción y relajación de las dos regiones del musculo. Esta misma característica se puede apreciar en el espectro de frecuencia del desplazamiento de ambas partículas (Figura 3.6). Aquí se puede observar que la frecuencia en que ocurre la contracción es bastante similar en ambas partículas. Es importante mencionar que, en este experimento, los desplazamientos de las partículas cuando el músculo está en reposo no superan $0.9 \mu\text{m}$ en X y $1.6 \mu\text{m}$ en Y.

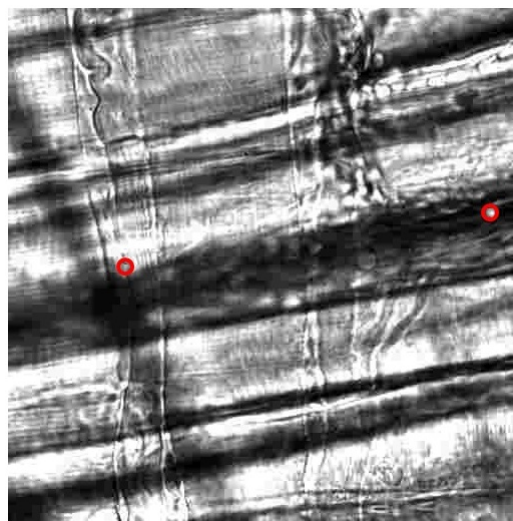


Figura 3.4: Posición de las partículas adheridas en el vaso sanguíneo (círculos rojos).

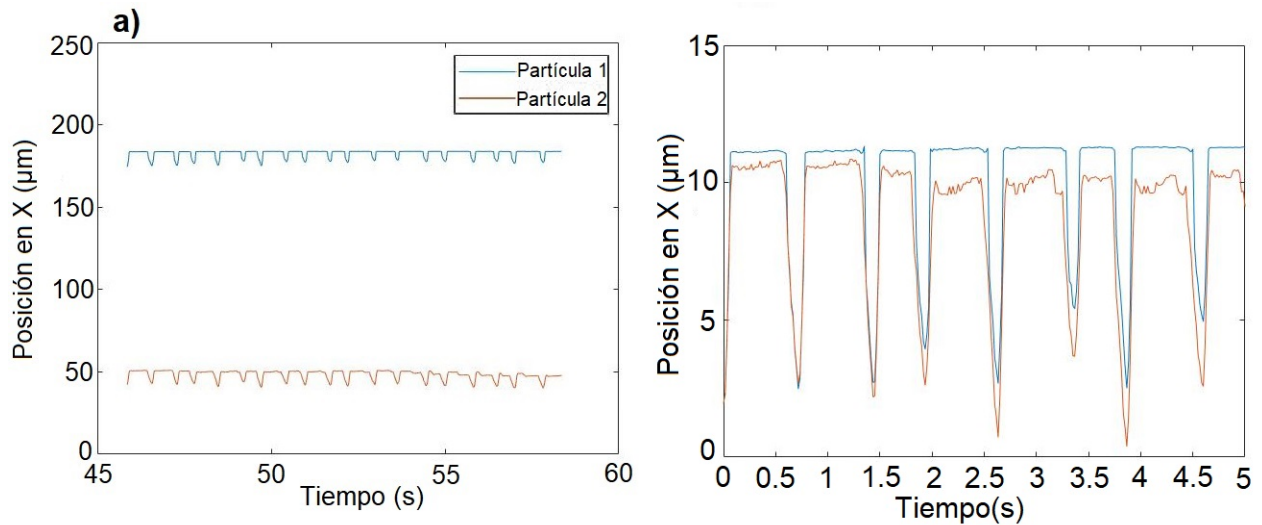


Figura 3.5: a) Componente X de las trayectorias de 2 partículas fluorescentes adheridas a la pared endotelial de una vénula y que se encuentran a una distancia aproximada de $132.8 \mu\text{m}$. b) Superposición de las componentes X de las trayectorias de 2 partículas para mostrar que se desplazan en fase.

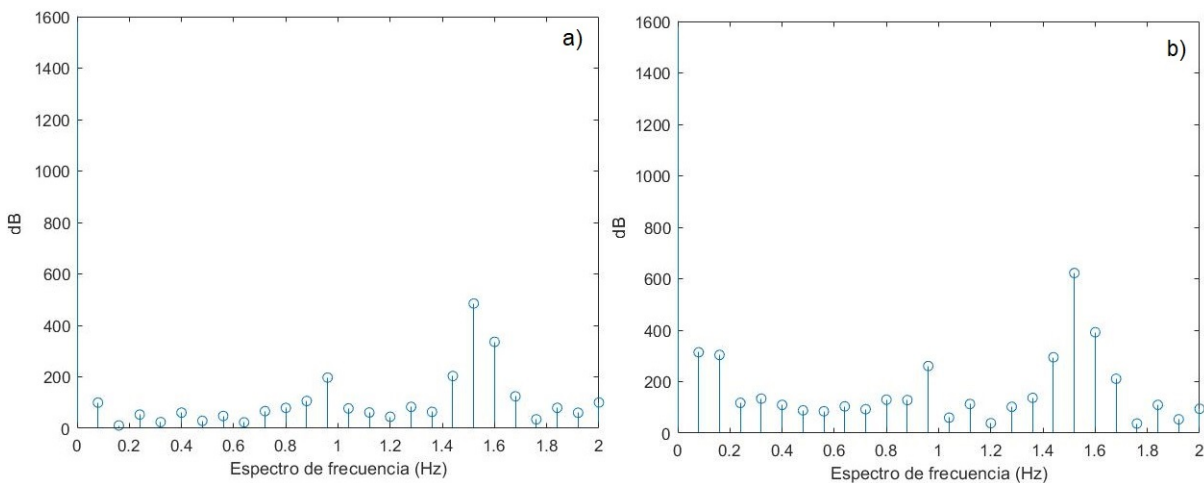


Figura 3.6: a) Espectro de frecuencias de la partícula 1. b) Espectro de frecuencias de la partícula 2. La frecuencia en ambos casos es 1.5 Hz.

En base a lo descrito y a que es posible el seguimiento indirecto del movimiento del músculo a través de las trayectorias de las partículas, se realizó la corrección de las trayectorias de las

partículas que fluyen dentro de los vasos.

Con el fin de determinar los intervalos de tiempo donde la corrección del movimiento del músculo es necesaria, se visualizan los intervalos de tiempo donde ocurre la contracción y relajación del músculo y únicamente se corrige esa parte de la trayectoria. Esto se logra al sobreponer los trazos de la trayectoria de la partícula fija con el intervalo de tiempo en que las partículas fluyen en el vaso como se ilustra en la Figura 3.7a. En esa figura se observa un rectángulo de color verde que corresponde a el intervalo de tiempo en que se detecto una partícula fluyendo en el vaso. En este caso la trayectoria inicia su recorrido en el intervalo de tiempo cuando el músculo está en reposo y el resto del tiempo se encuentra afectada por el movimiento del músculo. Los cambios en algunos casos son evidentes, como en el caso de la figura 3.7b donde la línea de color rojo es la trayectoria sin la correccion y la línea en verde es la trayectoria aplicando la corrección. Existen casos en los que las trayectorias cuentan con ciertos cambios abruptos en el direccionamiento, e.g. que una sección de las trayectorias tiene un direccionamiento contrario al flujo. En estos casos esa sección se considera inválida y por ende, se opta por eliminar dicha sección de las trayectoria.

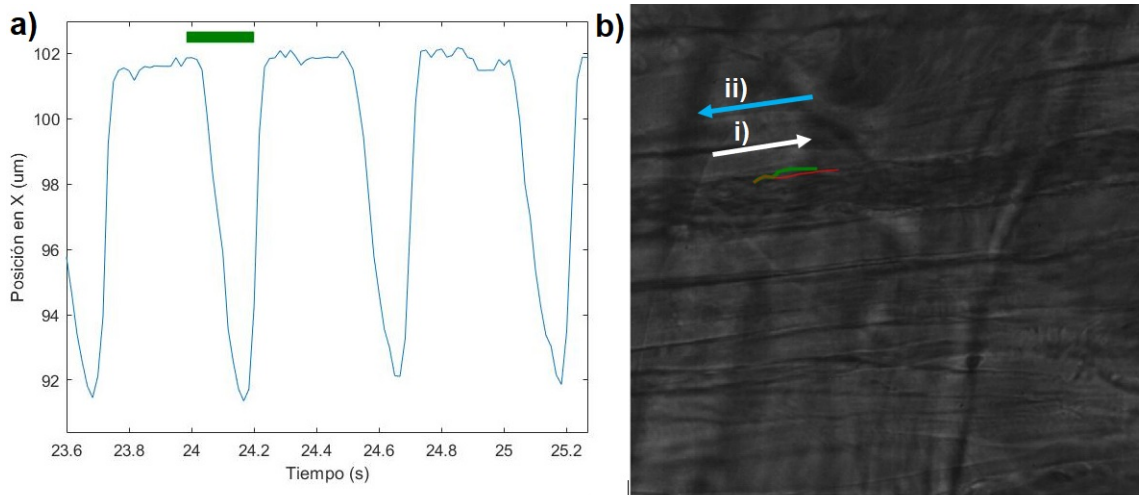


Figura 3.7: a) Componente X de la trayectoria de una partícula fija a la pared de un vaso correspondiente a la Figura 3.2. El rectángulo verde en la parte superior izquierda indica el intervalo de tiempo en el que fue detectada una partícula que fluye dentro del vaso (figura 3.7) y que incluye un intervalo de tiempo donde el músculo se encuentra en movimiento y otro donde se mantiene en reposo. b) Trayectoria corregida (verde) y trayectoria sin corrección (roja) donde, se indica la dirección del flujo sanguíneo i) y la dirección de contracción del músculo ii).

3.3 Inducción magnética del imán cilíndrico a lo largo de su eje

Para determinar la inducción magnética del imán a lo largo de su eje, se tomaron imágenes a diferentes distancias entre el extremo de un sensor axial de campo magnético de un Gaussmetro digital Lakeshore modelo 410 y el extremo de un imán cilíndrico de Neodimio-Hierro-boro (NdFeB, diámetro=1 mm, longitud=2 mm y $B_r=1200$ mT) utilizando un microscopio Aigo, equipado con un objetivo de 4X (figura 3.8a). En la figura 3.8b también se incluye el ajuste a los datos experimentales de la inducción magnética utilizando la ecuación 1.4. Como se puede observar, la ecuación 1.4 reproduce correctamente la inducción magnética y nos permite obtener un valor para B_r , resultando en un valor de 0.54 T. Sin embargo, este valor es diferente al que

proporciona el fabricante de 1.2 T. Un caso similar ocurre en el trabajo de Jie-Min Jia y colaboradores [8] donde fue necesario hacer un escalamiento de 1.5 al valor de B_r con el fin de calcular la fuerza magnética sobre partículas superparamagnéticas (ver sección 1.6).

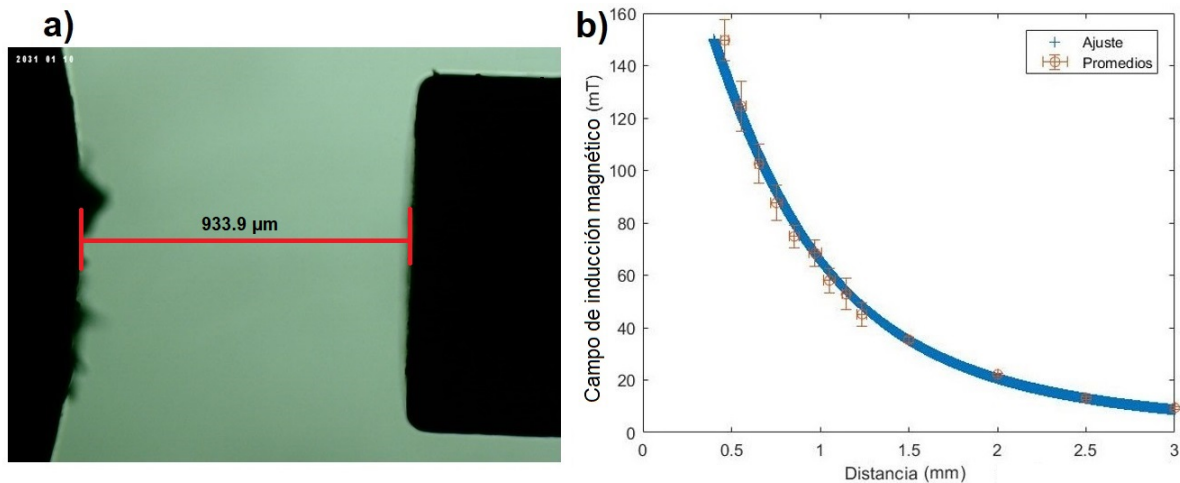


Figura 3.8: a) Imagen en vista superior del sensor (extremo izquierdo) junto con un imán cilíndrico (extremo derecho), obtenida con un microscopio Aigo. b) Inducción magnética a lo largo del eje cilíndrico del imán.

3.4 Análisis sin campo magnético

En esta sección se presentan los resultados del flujo de partículas sin haber aplicado el campo magnético para el atrapamiento y concentración de las partículas dentro de las vénulas. Para esto se obtienen las trayectorias de las partículas y se trazan sobre los vasos sanguíneos, lo cual se aprecia en la figura 3.9. Cabe mencionar que estas trayectorias se encuentran distribuidas en toda la duración de los videos. En la Figura 3.9 se muestran las trayectorias de las partículas correspondientes a 2 ratones donde dichas trayectorias están superpuestas sobre imágenes tomadas con microscopía de campo claro. En la Figura 3.9i se pueden apreciar algunas características de las trayectorias de las partículas que fluyen en las vénulas. Como se ha descrito anteriormente, en las vénulas las trayectorias de las partículas pueden depender de

varios factores que incluyen las interacciones hidrodinámicas con los glóbulos rojos (que a su vez interactúan fuertemente con leucocitos) y glóbulos blancos e incluso con las paredes de los vasos. Las trayectorias de las partículas en ocasiones forman curvas que pueden ser indicativas de que la partícula rodea a leucocitos fijos en la pared del vaso. En la figura 3.9i se aprecia un ejemplo de una trayectoria con una curva que coincide con la ubicación de un leucocito fijo en el vaso. Es importante denotar que el video en campo claro de donde se obtiene esta imagen se obtuvo aproximadamente 5 minutos antes del video tomado con microscopia de fluorescencia. Sin embargo, la velocidad del leucocito durante el intervalo de tiempo que se tomó el video de campo claro es cercana a cero (aprox. $0.06 \mu\text{m/s}$), por lo que se puede asumir que el leucocito está en reposo. Cabe mencionar que algunos leucocitos no se visualizan nitidamente y por lo tanto la curvatura de algunas trayectorias no se puede asociar directamente a la presencia de dichas células.

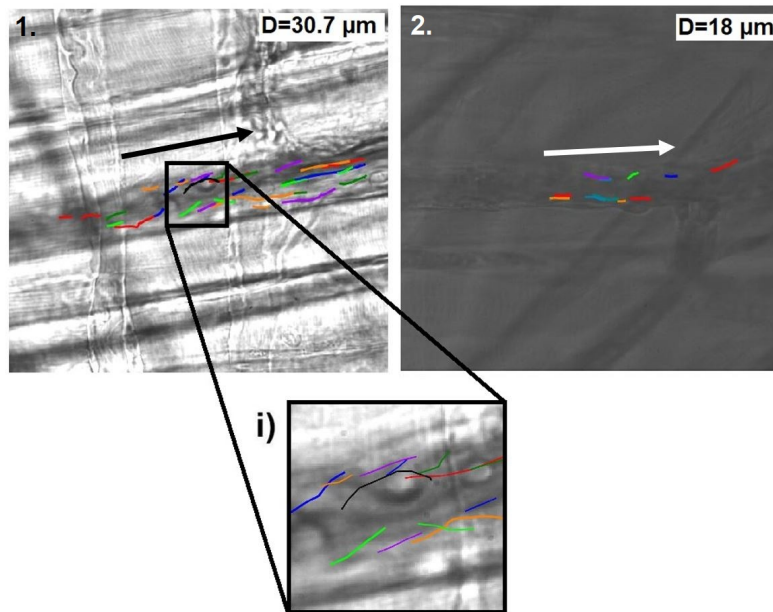


Figura 3.9: Trayectorias trazadas en 2 vénulas y que fueron obtenidas de 2 ratones. Las flechas son indicativas de la dirección del flujo en cada vaso. i) La trayectoria en color negro muestra a una partícula que probablemente altera su trayectoria debido a la presencia de un leucocito fijo a la pared del vaso.

Cabe señalar que, de acuerdo a lo establecido en la sección 1.5 del perfil de velocidad de la ley de potencias para los eritrocitos, es de esperarse que la velocidad de las partículas que fluyen cerca de la pared del vaso sea menor que la velocidad de partículas que fluyen en el centro del vaso. Para determinar la dependencia de la velocidad de las partículas con su posición lateral, se divide el vaso en diferentes secciones a lo ancho del canal (un ejemplo se observa en la figura 3.10) para después promediar las velocidades en cada división. En esta sección se presenta el análisis de videos obtenidos de 2 ratones y se describirán como experimento 1 y 2. Cabe mencionar que el ancho de las secciones en el experimento 1 son de $6.12 \mu\text{m}$ mientras que el ancho de las secciones del experimento 2 son de $3.6 \mu\text{m}$. Así mismo, en las Figuras 3.11a y 3.11c se muestran los valores de las medias de velocidades de las trayectorias correspondientes al experimento 1 y 2 respectivamente. En estas Figuras se puede notar los grandes valores de la desviación estándar de las diferentes trayectorias los cuales son debidos a la gran variabilidad en la velocidad de las partículas. La media de las velocidades en cada sección se muestran en las gráficas de barras en las figuras 3.11b y 3.11d, así como su correspondiente desviación estándar, considerando 1 sección central, y promediando los resultados de las 2 intermedias y las 2 exteriores. Es importante denotar que el experimento 1 muestra trayectorias obtenidas en 2 videos tomados el mismo día con 7 minutos de separación entre sí pero en la misma región.

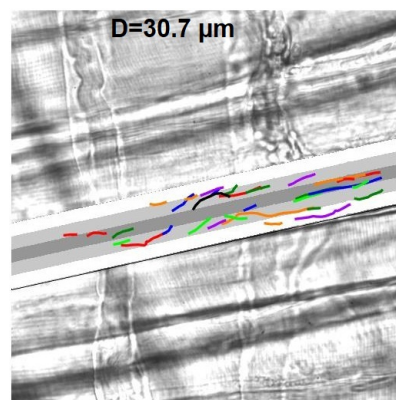


Figura 3.10: Imagen representativa de las divisiones que se realizan a lo ancho de los vasos sanguíneos para determinar la dependencia de la velocidad con la posición radial de las partículas.

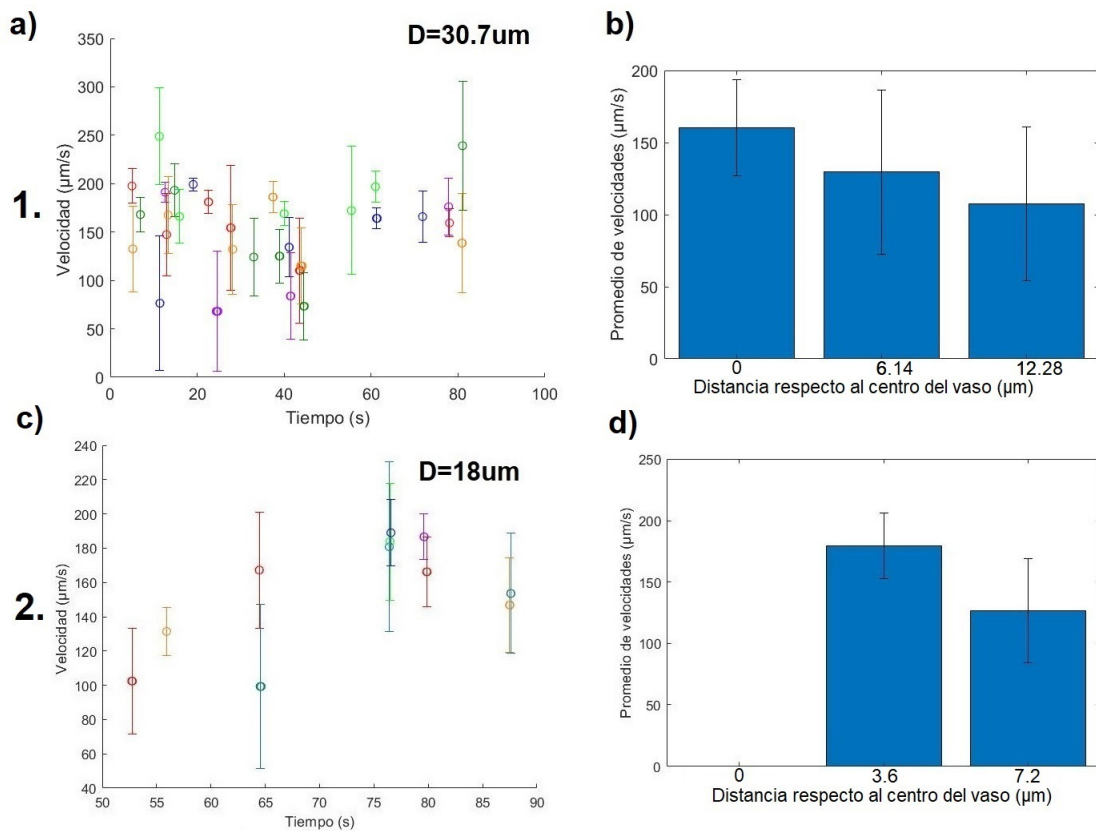


Figura 3.11: a) y c) Valores de las medias de las velocidades de todas partículas (cada una representada con un color) de los experimentos 1 y 2, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. b) y d) Gráfica de barras con los promedios de velocidades de cada sección de 2 experimentos. Las divisiones del experimento 1 son de $6.12 \mu\text{m}$ de ancho mientras que las del experimento 2 son de $3.6 \mu\text{m}$.

En el caso del experimento 1, al observar la tendencia esperada según la ley de potencias para el perfil de velocidad, se determina el valor aproximado del parámetro de modificación k de la ecuación 1.17 realizando un ajuste por mínimos cuadrados (figura 3.11b). El ajuste se muestra en la Figura 3.12 resultando en $k = 4.57$. Cabe mencionar que el ajuste no se realizó en el experimento 2 por que no se detectaron partículas en el centro del vaso.

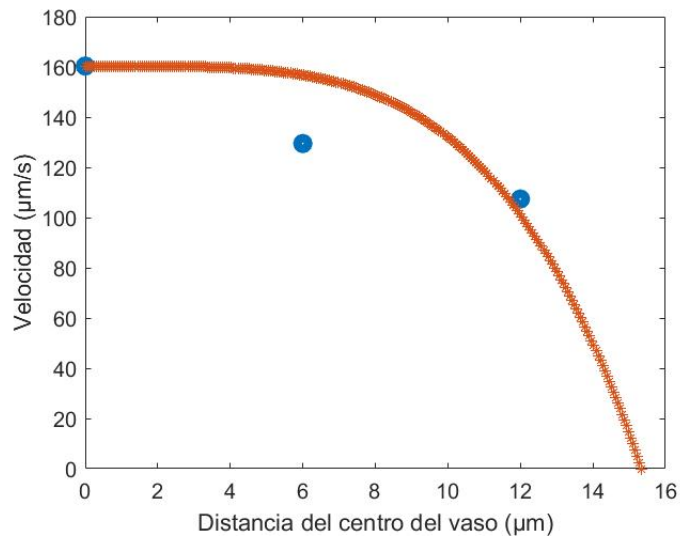


Figura 3.12: Ajuste del perfil de velocidad (línea roja) utilizando los datos del experimento 1 (círculos azules).

3.5 Análisis con campo magnético

3.5.1 Posicionamiento del imán utilizando una cuña de PDMS

En esta sección se muestran los resultados del flujo de las partículas en vénulas haciendo uso de un imán adherido a una cuña de PDMS para la aplicación del campo magnético para atrapar las partículas y aumentar su concentración en una región del vaso (ver figura 2.6) de tal forma que al retirar el imán las partículas puedan continuar fluyendo por los vasos. Al posicionar la cuña, la distancia medida a lo largo del eje cilíndrico entre el centro de la base del imán y el músculo cremáster es de 2.4 mm, donde dicho eje está colocado con una inclinación de -45° respecto al plano horizontal. En este caso el imán permanece cerca del músculo aproximadamente 15 seg. Este arreglo resulta ser efectivo ya que se logra realizar un atrapamiento y posterior liberación de partículas en una vénula post-capilar. Cuando se retira el imán, pasan aproximadamente 7 segundos antes de visualizar las partículas en la vénula enfocada. Esto posiblemente se deba

a que las partículas en realidad fueron atrapadas en regiones que se encuentran a cientos de micras de la zona de interés. Lo primero que se aprecia al retirar el imán es un agregado de partículas fluyendo en la circulación, el cual se asume que se encontraba retenido por el campo magnético del imán debido a su aparición poco tiempo después de retirar el imán. En la figura 3.13 se muestra el aglomerado dentro de un círculo rojo, el cual tiene un tamaño de $12\ \mu\text{m}$ en un vaso de $18.7\ \mu\text{m}$. Cabe señalar que en esta figura únicamente se superpuso la región donde se observa el agregado de partículas tomado con microscopia de fluorescencia sobre una imagen del músculo tomada con campo claro.

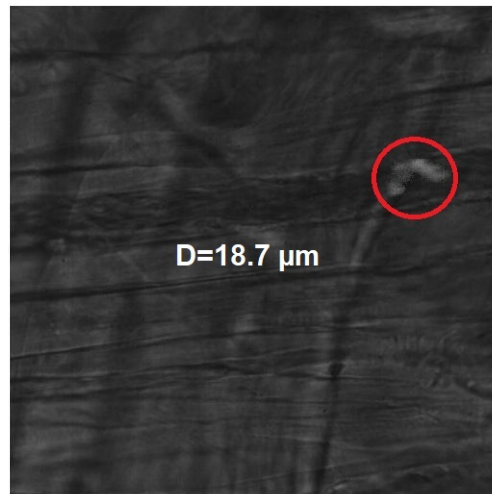


Figura 3.13: Imagen representativa de un aglomerado de partículas en la microcirculación.

Es imperativo mencionar que las ecuaciones 1.4 y 1.10 únicamente estiman el valor del campo magnético y de la fuerza magnética a lo largo del eje del imán, lo que no permite determinar el campo de inducción y la fuerza magnética en regiones alejadas del eje del imán. La distancia más cercana del imán al músculo es de aproximadamente $1.6\ \text{mm}$. Sin embargo, al no estar en dirección al eje no se estimó el campo de inducción y la fuerza magnética. Esta distancia parece ser suficiente para frenar las partículas. En la figura 3.14 se aprecian las trayectorias de las partículas superpuestas en el vaso y la velocidad media de cada trayectoria en el momento en que fueron detectadas durante el experimento. En la Figura 3.14b se indica con una flecha naranja el instante de tiempo en que se retira el imán. Como se puede apreciar, antes de retirar

el imán hay poca circulación de partículas y al retirarlo existe un aumento significativo en la cantidad de partículas que fluyen en el vaso. Es de esperarse que al aplicar un campo magnético por un tiempo mayor, como en el trabajo de Chien Yu Chiu y colaboradores [4] que fue de aproximadamente 14 minutos, la cantidad de partículas al retirar el imán sea considerablemente mayor.

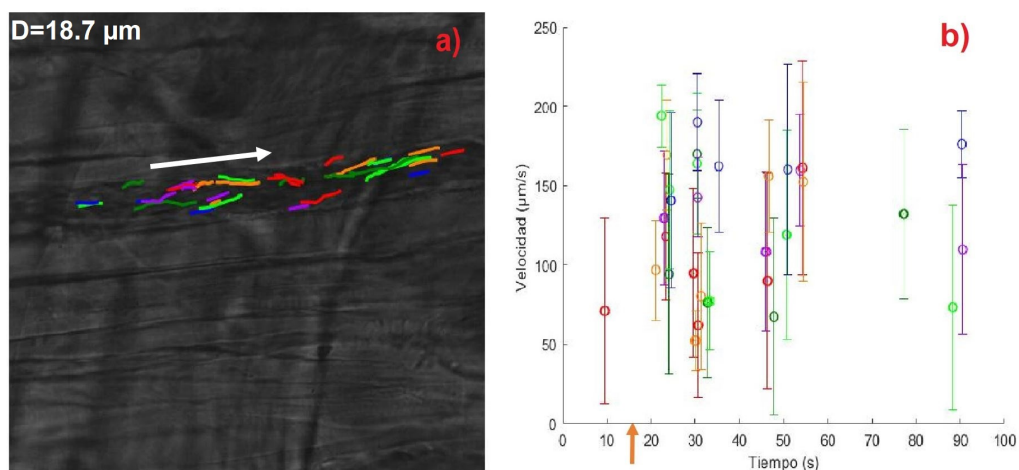


Figura 3.14: a) Trayectorias superpuestas sobre el vaso del experimento utilizando una cuña y después de la aplicación del campo magnético (la flecha blanca indica la dirección del flujo). b) Promedio de velocidades de todas las trayectorias del experimento (la flecha naranja sobre el eje horizontal indica el momento en que se retira el imán).

Ahora si se divide el vaso en 5 secciones de $3.5 \mu\text{m}$ y se promedian las velocidades por sección se obtiene lo mostrado en la figura 3.15. Se puede observar que los valores de la velocidad media tiene la tendencia esperada. Es decir, que el valor máximo de las partículas ocurre en el centro del vaso lo que sugiere que también se cumple la ley de potencias para el perfil de velocidades. Así mismo, para este experimento se determina el valor aproximado del parámetro de modificación del perfil parabólico k de la ecuación 1.17 con un ajuste por mínimos cuadrados, resultando en $k = 4.60$ el cual se muestra en la figura 3.16.

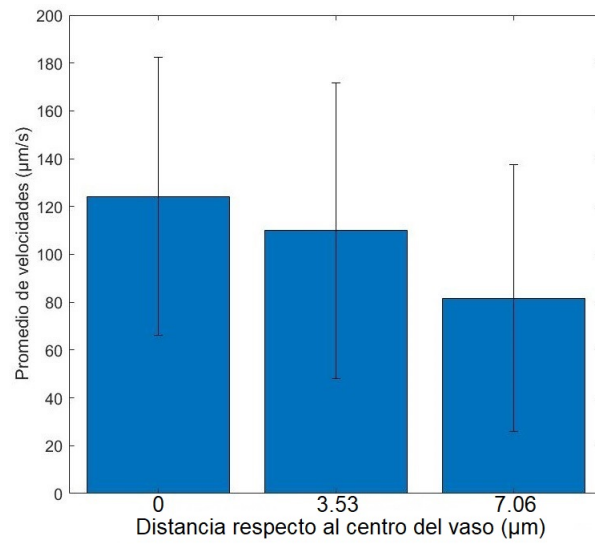


Figura 3.15: Gráfica de barras de los promedios de velocidades, de 3 secciones del vaso de 3.53 μm , correspondiente a los datos de la Figura 3.14.

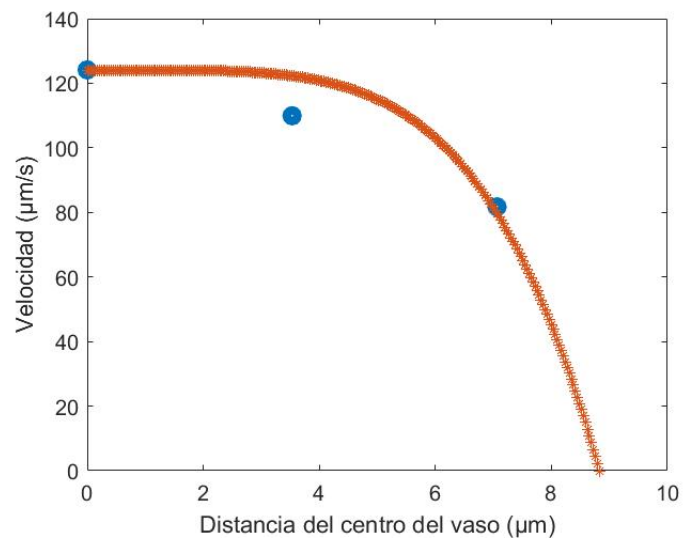


Figura 3.16: Ajuste del perfil de velocidad (línea roja) utilizando los datos de la figura 3.15 (círculos azules).

3.5.2 Posicionamiento del imán sobre el músculo cremáster

En esta sección se muestran los resultados del flujo de partículas obtenidos de la aplicación del campo magnético con la segunda metodología (expuesta en la sección 2.2) colocando el imán por aproximadamente 15 segundos sobre una arteriola que suministra sangre a la zona de interés y que se encuentra a una distancia aproximada de 2 mm de dicho imán. En la Figura 3.17a se muestran las trayectorias de las partículas superpuestas en una imagen de campo claro donde se puede observar que las partículas fluyen por 2 vasos de diferente diámetro. En la Figura 3.17b se muestra la velocidad media de cada trayectoria y el instante de tiempo en que las trayectorias fueron reconstruidas dentro del tiempo de la duración del video. En esta misma figura se muestra con una flecha naranja sobre el eje horizontal el instante de tiempo en que el imán es retirado del músculo. Se puede observar que en el vaso de mayor diámetro ($D=18.2 \mu\text{m}$) las partículas continúan fluyendo antes de retirar el imán y tampoco se observa un aumento en la cantidad de partículas fluyendo en el vaso tras retirar el imán. Sin embargo, en el vaso de menor diámetro ($D=5.8 \mu\text{m}$) se puede apreciar el flujo de 3 partículas después de aproximadamente 3.5 seg de retirar el imán. Esto indica que es probable que las partículas hayan sido atrapadas por el imán pero que hayan fluido por el vaso de menor diámetro. Con esto se puede suponer que las partículas si están siendo atrapadas por el imán, aunque la distancia de separación entre el imán y la zona de interés causa que sea difícil determinar el camino de las partículas por la red vascular. Además en la figura 3.17c se puede observar un agregado de $4.2 \mu\text{m}$ que fluye en el vaso de $5.8 \mu\text{m}$ de diámetro, el cual se marca con una flecha azul que indica la dirección del flujo sanguíneo. Este agregado de partículas se muestra en un círculo rojo en la figura 3.17c y se aprecia después de 3.5 segundos de retirar el imán (flecha naranja de la figura 3.17b). Así mismo, en la figura 3.17d se muestra la gráfica del perfil de velocidad, el cual resulta ser plano.

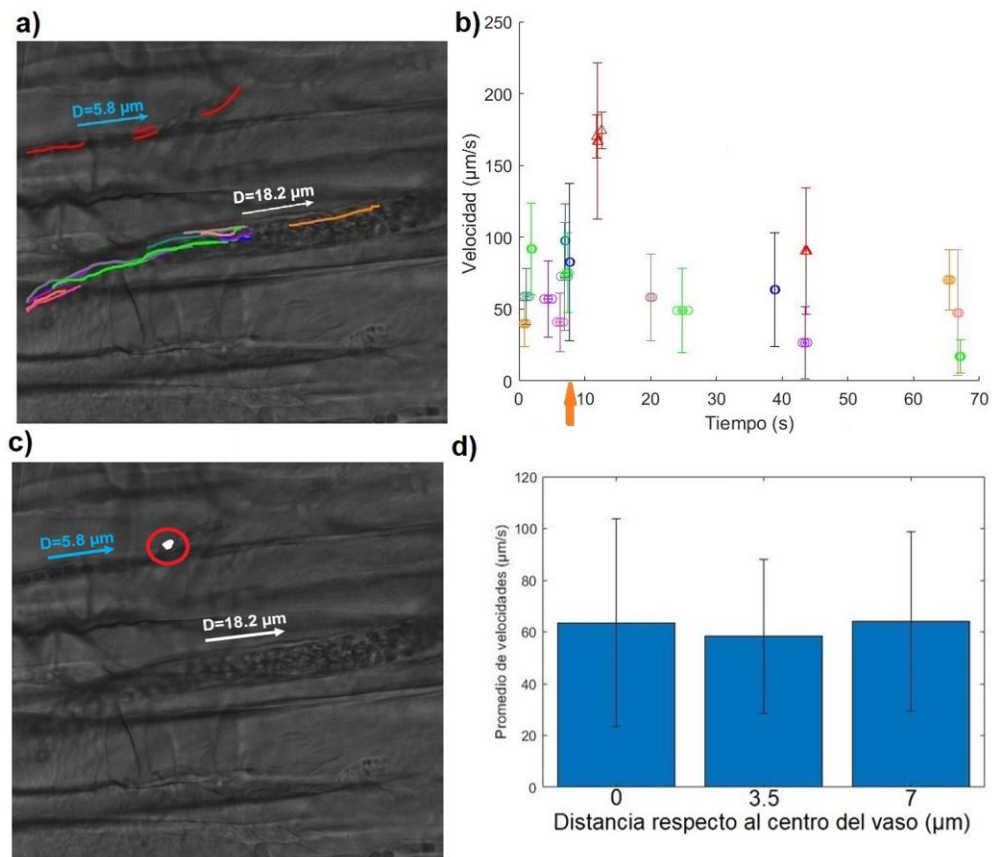


Figura 3.17: a) Trayectorias superpuestas sobre los vasos. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo de cada vaso. b) Velocidad media de las trayectorias que fluyen en el vaso de diámetro $D=18.2 \mu\text{m}$ (círculos vacíos). Los triángulos de color rojo indican la velocidad media de las trayectorias correspondientes al vaso que se encuentra en la parte superior de la imagen (de diámetro $D=5.8 \mu\text{m}$). c) Imagen representativa de un aglomerado de partículas en un vaso sanguíneo. d) Perfil de velocidad de las partículas en el vaso ($D=18.2 \mu\text{m}$).

Ahora se mostrarán los resultados de otro experimento con las mismas condiciones del anterior. En la figura 3.18a se aprecian las trayectorias de las partículas superpuestas sobre los vasos. Se puede observar que las trayectorias se reconstruyeron en 2 vasos diferentes, uno de aproximadamente $15.3 \mu\text{m}$ (dirección de flujo indicada con una flecha de color blanco) y otro de $6 \mu\text{m}$ (dirección de flujo indicada con una flecha de color azul). En la Figura 3.18b se muestra la velocidad media de cada una de las trayectorias, donde se aprecian intervalos

de tiempo donde no fluyen partículas por ninguno de los 2 vasos. La flecha naranja indica el instante de tiempo en que es retirado el imán del músculo. Aunque el número de partículas que fluyen por el vaso de mayor diámetro es muy reducido con lo cual no se puede observar una influencia del atrapamiento de las partículas por el campo magnético, en el vaso de menor diámetro se observa el flujo de partículas después de aproximadamente 3 segundos de haber retirado el imán, lo que indica que probablemente eso se deba al efecto del campo magnético. Cabe mencionar que para este experimento no se determinó el perfil de velocidades debido a que la concentración de partículas en el vaso de $15.3 \mu\text{m}$ es muy baja.

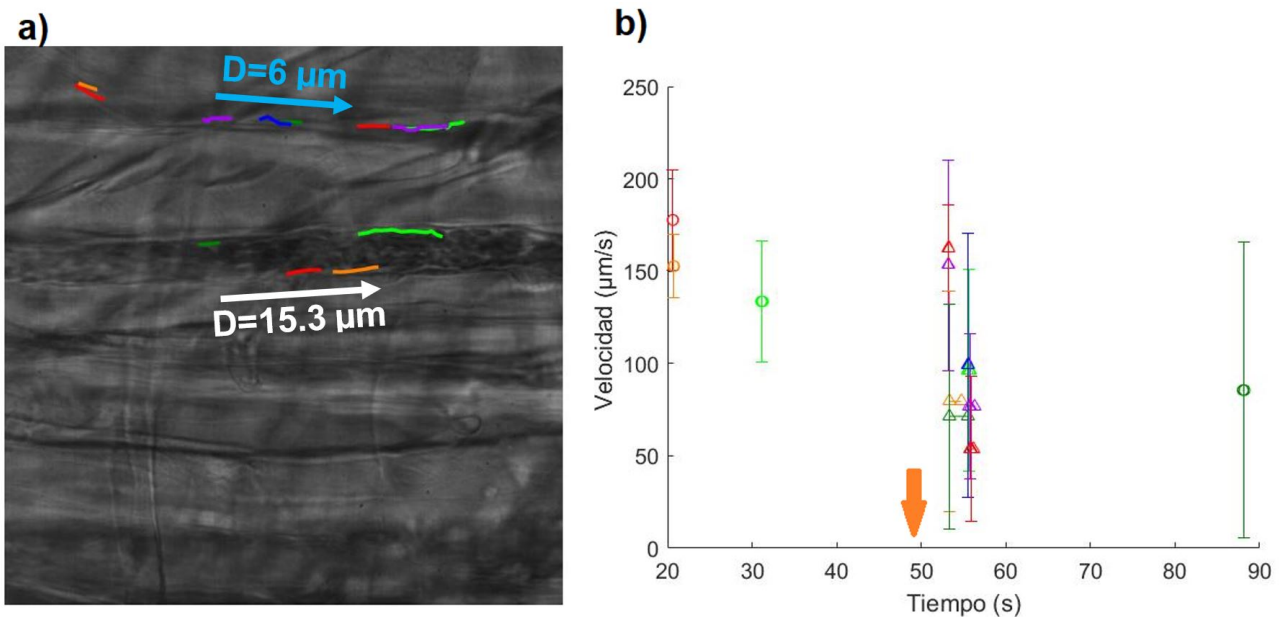


Figura 3.18: a) Trayectorias superpuestas sobre los vasos. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo. b) Velocidad media de las trayectorias que fluyen en el vaso de diámetro $D=15.3 \mu\text{m}$ (círculos vacíos). Los triángulos indican la velocidad media de las trayectorias correspondientes al vaso que se encuentra en la parte superior de la imagen (de diámetro $D=6 \mu\text{m}$) y la flecha naranja indica el retiro del imán.

3.5.2.1. Comparativa entre las fuerzas que actúan sobre las partículas dentro de las vénulas post-capilares

Utilizando la ecuación 1.10, se estima la magnitud de la fuerza magnética generada sobre las partículas a lo largo del eje cilíndrico del imán. Considerando los valores de la tabla 1.1, se logra aproximar la magnitud de la fuerza magnética mostrada en la figura 3.19a. En esta figura se puede apreciar que aproximadamente a los 2 mm el imán comienza a ejercer una fuerza sobre las partículas. Así mismo, la fuerza magnética aplicada a una partícula causa que esta se desplace en dirección de la superficie del imán a una velocidad dependiente de la magnitud de la fuerza. En otras palabras, entre mayor sea la distancia entre el imán y la partícula, la velocidad de dicha partícula será menor. Para determinar dicha velocidad se iguala la fuerza magnética con la fuerza de arrastre que el fluido ejerce sobre la partícula cuando esta se desplaza a una velocidad u que se muestra en la Figura 3.19b [35]. Al igual que en la figura 3.19a se puede apreciar que aproximadamente a los 2 mm las partículas comienzan a responder al campo magnético. Es importante señalar que para obtener valores más realistas de esta velocidad se debe de incluir explícitamente el efecto de la presencia de los eritrocitos y leucocitos de forma similar a como se realizó en la referencia [22].

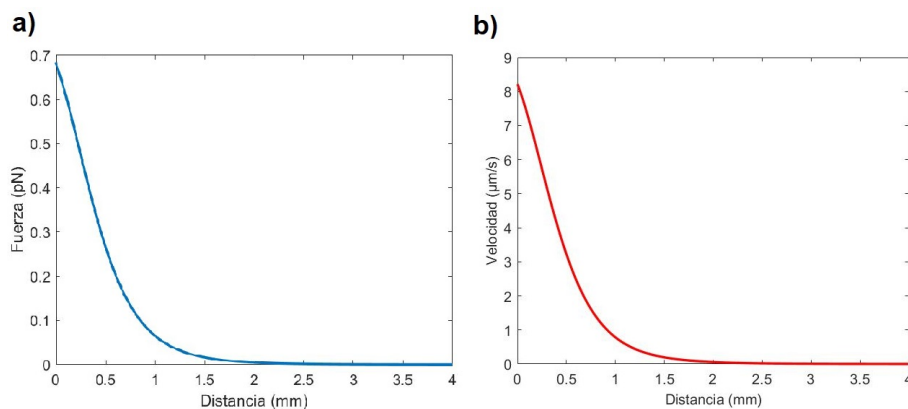


Figura 3.19: a) Gráfica de la fuerza magnética ejercida sobre una partícula a diferentes distancias a lo largo del eje del imán cilíndrico. b) Velocidad sobre una partícula magnética inducida por el efecto del campo magnético que ejerce el imán a lo largo del eje cilíndrico.

Como se describió anteriormente, la magnitud de la fuerza de arrastre está dada por la ley de Stokes denotada en la ecuación 1.5. Para esto tomamos los resultados representativos del primer experimento de la sección 3.5.2 incluyendo el diámetro del vaso y la velocidad media del flujo de partículas. Además partimos de la Figura 1.5 para determinar la viscosidad para la tasa de corte correspondiente. Sabiendo que la velocidad media de las partículas (u_m) es de $60.5 \mu\text{m/s}$ y que la tasa de corte es de $3.32 (s^{-1})$, se obtiene que la viscosidad es de $9.7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$. Entonces la fuerza de arrastre ejercida en partículas con radio promedio de $0.45 \mu\text{m}$ resulta ser de 5 pN . Cabe señalar que el número de Reynolds, que se define como el cociente entre las fuerzas inerciales y viscosas, está dado por $Re = \frac{\rho \cdot D \cdot u}{\eta}$ y resulta ser 1.2×10^{-4} , donde ρ es la densidad del fluido. Esto indica que en estas condiciones dominan las fuerzas viscosas sobre las inerciales.

Con el fin de apreciar mejor la relación entre la fuerza magnética y la fuerza de arrastre se calcula el número de Richardson denominado como Ψ que indica con que magnitud una fuerza es mayor a otra [35]. Determinando el número de Richardson y considerando la fuerza magnética a $100 \mu\text{m}$ de 0.61 pN (ecuación 3.1), se puede apreciar que la fuerza predominante en las vénulas post-capilares es la fuerza de arrastre (considerando la velocidad promedio).

$$\Psi = \frac{F_m}{F_v} = \frac{0.61 \text{ pN}}{5 \text{ pN}} = 0.12. \quad (3.1)$$

Para realizar una comparación de la fuerza magnética a diferentes distancias, se compara la fuerza magnética a distancias de 30 y de $100 \mu\text{m}$ ($100 \mu\text{m}$ es el grosor aproximado del músculo cremáster) utilizando el valor de B_r obtenido en este trabajo. Cabe señalar que el fabricante del imán proporciona un valor de $B_r = 1.2 \text{ T}$ por lo que también se incluye este caso para tener en cuenta una posible subestimación de la fuerza. Los resultados se aprecian en la tabla 3.1. Se puede observar que si se considera el valor de B_r que proporciona el fabricante la fuerza magnética aumenta casi 5 veces.

Distancia (μm)	a) Fuerza (pN)	a) Ψ	b) Fuerza (pN)	b) Ψ
30	0.66	0.13	3.2	0.64
100	0.61	0.12	3.0	0.59

Tabla 3.1: Tabla de los valores de fuerza y el número de Richardson (Ψ) a diferentes distancias considerando a) $\text{Br}=0.54$ T y b) $\text{Br}=1.2$ T.

Debido a que en las vénulas están presentes diversos fenómenos que determinan la dinámica de las partículas en la microcirculación y que fueron descritos en la sección 1.4, a continuación se calcula el número de Peclet (Pe), que es una cantidad adimensional definida como el cociente entre la tasa de advección y la tasa de difusión. Adicionalmente al movimiento Browniano, las partículas están sujetas a una dispersión inducida por el estrés de corte dentro del flujo sanguíneo. Es decir, los movimientos aleatorios de los glóbulos rojos inducidos por las interacciones hidrodinámicas entre dichas células generan movimientos aleatorios en las partículas debidos a las interacciones hidrodinámicas entre las partículas y los glóbulos rojos. Los movimientos aleatorios de las partículas son de naturaleza difusiva de tal manera que se puede asociar un coeficiente de difusión total a la dinámica de las partículas $D_T = D_b + D_{sh}$. Una forma de estimarlo en la circulación es considerar el tiempo de difusión dado por $t_d = a^2/D_T$ y el tiempo debido a la advección del fluido $t_s = a/u$, donde D_b es el coeficiente de difusión determinado por la ecuación Stokes-Einstein $D_b = k_B T / 6\pi\eta a = 5.2 \times 10^{-14} [\frac{\text{m}^2}{\text{s}}]$ siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta (37°C en el ratón) y u la velocidad media del flujo sanguíneo. El coeficiente de difusión por el estrés de corte está dado por $D_{sh} = K_{sh}(r_{RBC})^2\dot{\gamma} = 1.38 \times 10^{-12} [\frac{\text{m}^2}{\text{s}}]$ donde r_{RBC} es el radio medio de los glóbulos rojos en ratón ($r_{RBC} = 2.9 \mu\text{m}$ [49]) $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte obtenida según la sección 1.4.1 de 3.3 s^{-1} y K_{sh} es un coeficiente adimensional que depende de la concentración de glóbulos rojos siendo aproximadamente 5×10^{-2} [50]. Entonces el número de Peclet está definido por $Pe = \frac{t_d}{t_s}$, y en este caso resulta en $Pe = 18.9$, lo que indica claramente que domina la advección del fluido sanguíneo sobre la difusión de las partículas. En otras palabras, entre mayor sea el número de

Peclet existe una menor contribución de la difusión, indicando una dependencia mayor a la fuerza de arrastre del flujo sanguíneo.

Ahora se procede a determinar una variable adimensional C_g , siendo esta un cociente entre la fuerza de la gravedad y la fuerza de arrastre causada por el fluido en partículas de diámetro d resultando en $C_g = \frac{(\rho_p - \rho_f)(g \cos \alpha)d^2}{18\eta u}$ [40], donde ρ_p y ρ_f son las densidades de la partícula (1.5 g/cm³) y el fluido (1.057 g/cm³ [41]), respectivamente, g es la aceleración gravitacional (9.81 m/s²), u es la velocidad media del fluido y α es la inclinación del vaso (en este caso no se toma inclinación). Contrario al número de Peclet, entre menor sea C_g habrá una mayor dependencia al arrastre del fluido. En este caso el valor que se obtiene es $C_g = 3.33 \times 10^{-4}$, indicando que la advección también domina sobre la fuerza gravitatoria.

Los resultados anteriores indican que la fuerza de arrastre en partículas de 0.9 μm de diámetro en vénulas post-capilares claramente domina sobre al efecto de la difusión Browniana y sobre la fuerza gravitatoria ejercida sobre dichas partículas. Sin embargo, el cálculo del número de Richardson indica que la fuerza magnética tiene un papel importante a pesar de que es más pequeña que la fuerza de arrastre. Esto último concuerda con lo que se observa experimentalmente, en particular con la formación de agregados de partículas en las zonas donde se aplica el campo magnético. Así mismo en el simulaciones de Nacev y colaboradores [35], se observa que a pesar de que la fuerza magnética es menor a la fuerza de arrastre, aun así se logran atrapar partículas. Es de esperarse que exista un cambio de fenomenología al disminuir el diámetro de las partículas. Por ejemplo, al realizar el cálculo con partículas con las mismas propiedades que las usadas en este trabajo con un diámetro de 400 nm que es cercano a lo reportado en trabajos previos[5] y bajo las mismas condiciones del flujo de las vénulas, el número de Peclet se reduce a 8.04, lo que implica que el movimiento Browniano empieza a jugar un papel importante. Adicionalmente, usando los mismos parámetros del campo magnético que los que se usaron en la Tabla 3.1 para una distancia de 100 μm , la magnitud de la fuerza de arrastre es un orden de magnitud mayor a la fuerza magnética. Cabe mencionar que el umbral en que el movimiento Browniano y la advección son semejantes es en partículas de 100 nm

siendo $Pe_{100} = 1.63$. Es importante recalcar que la fuerza magnética también tiene una menor influencia entre menor sea el diámetro de las partículas por lo que es necesaria la aplicación de un campo magnético de mayor intensidad para poder atraparlas en algún sitio específico.

3.6 Discusión

Además de los experimentos mostrados en el presente trabajo también se realizaron experimentos in-vitro con capilares de vidrio de aproximadamente $50\ \mu\text{m}$ de diámetro interno y una velocidad de flujo comparable a la observada en las vénulas para emular el flujo de las partículas dentro de los vasos sanguíneos y determinar el campo magnético necesario para inducir un cambio de trayectoria de las partículas. En estos experimentos se utilizó un imán cilíndrico de $5\ \text{mm}$ de diámetro y $3\ \text{mm}$ de altura. Con este imán se determinó que con un campo magnético del orden de $80\ \text{mT}$ se puede observar claramente la atracción de las partículas hacia el imán. Con estos experimentos se decidió adquirir imanes cilíndricos de $2\ \text{mm}$ de largo y $1\ \text{mm}$ de diámetro tal manera que a $1\ \text{mm}$ de distancia de la base del imán sobre el eje cilíndrico el campo magnético generado fuera de aproximadamente $80\ \text{mT}$.

Es importante señalar que el cálculo del campo magnético según la ecuación 1.4 puede estar subestimando el valor real de la fuerza magnética debido a que según el fabricante del imán B_r es $1200\ \text{mT}$ y no $540\ \text{mT}$ como el obtenido en la sección 3.3, por lo que se debe hacer un escalamiento de 2.2 similar a lo realizado por Jie-Min Jia y colaboradores [8] donde usan un escalamiento de 1.5 en un imán de Neodimio (NdFeB) de las mismas dimensiones y que genera valores comparables de campo magnético a los de este trabajo. Además se debe considerar que no se determinó experimentalmente la susceptibilidad magnética en este trabajo.

Algunos aspectos a considerar son que para el estudio de la fuerza de arrastre, se utiliza la velocidad media del flujo de las partículas, pero dicha velocidad fluctúa entre $50\ \mu\text{m/s}$ y $200\ \mu\text{m/s}$, lo que generaría un aumento en el cociente (Ec. 3.1) para el caso de las velocidades más pequeñas. Cabe denotar que a pesar de que los perfiles de velocidades son estimaciones y requieren más información para un mejor análisis estadístico (figuras 3.12 y 3.16), estos muestran el comportamiento esperado al obtener un valor estimado para el parámetro de modificación k mayor a 2. En otras palabras se observa un aplanamiento en el perfil de velocidades en comparación con el perfil parabólico.

De igual manera, aunque no se determinó experimentalmente la concentración de los leucocitos en vénulas post-capilares, es necesario considerar que su presencia influye en las trayectorias de las partículas. Estos valores si se han determinado en otros trabajos, siendo la concentración de leucocitos de 5800/ μl , el porcentaje de leucocitos en fase de rodamiento de 15 % y los leucocitos adheridos a la pared endotelial de 400/ mm^2 [38].

Así mismo, es importante mencionar que aunque se conoce que el grosor del músculo cremáster es de aproximadamente 98.5 μm [36], en este trabajo no se estimó la distancia del imán al vaso a analizar.

4

Conclusiones y persepectivas

4.1 Conclusiones

Con este trabajo se logró estudiar la microcirculación y un método de manipulación de partículas en un modelo in vivo. Este estudio fue realizado en ratones visualizando las vénulas post-capilares en el músculo cremáster que se encuentra en el testículo de los ratones. La manipulación se realizó con un imán cilíndrico de 1 mm de diámetro y, basándose en los resultados obtenidos, se puede suponer que aplicando un campo magnético a 1.6 mm con una inclinación de 45° es suficiente para lograr atrapar las partículas superparamagnéticas. Con esto se puede considerar que el arreglo experimental mostrado en este trabajo es apropiado para el atrapamiento y liberación de partículas superparamagnéticas, junto con el análisis de sus trayectorias. De igual manera, se observa que los leucocitos y eritrocitos presentes en la circulación influyen en las trayectorias de las partículas superparamagnéticas. Cabe mencionar que a pesar de que la fuerza de arrastre supera a los demás factores presentes en la circulación, los resultados sugieren que se puede lograr el atrapamiento de las partículas en la pared endotelial. Esto puede deberse tanto a las interacciones hidrodinámicas que marginan parcialmente a las

partículas y al campo magnético presente que fomenta su direccionamiento hacia la pared. Así mismo se puede suponer que la formación de agregados es causada por la atracción que genera el campo magnético a las partículas superparamagnéticas y a la atracción entre estas partículas una vez presente el campo. En un futuro es necesario lograr un arreglo experimental que permita la visualización de agregados en la sección donde se encuentra el imán.

4.2 Perspectivas

Como perspectivas a futuro, se considera lo siguiente:

1. Realizar una mayor estadística (mayor número de experimentos) para un mejor entendimiento de la manipulación de partículas e incluso para perfeccionar este tipo de acercamiento al modelo de estudio de la obstrucción de vasos.
2. Elaborar un arreglo experimental que no solo permita las variaciones en el campo magnético, sino también la visualización eficaz de la región de interés (zonas donde se forman las cadenas debidas al campo).
3. Replicar in vivo lo realizado en las simulaciones de Freund y Shapiro[6] variando la magnitud del campo magnético y su direccionamiento. Determinar los parámetros apropiados para dirigir partículas a la capa libre de células, es decir, lograr una forma óptima para generar la migración lateral de partículas. Y una vez realizado esto, tratar de focalizar una reacción en un punto del organismo funcionalizando partículas superparamagnéticas.

Bibliografía

- [1] CAMACHO, J. M., SOSA, V., *Alternative method to calculate the magnetic field of permanent magnets with azimuthal symmetry* Revista Mexicana de Física, Sección: Educación 59.1 (2013), pp. 8-17. ISSN: 0035-001X.
- [2] HAMDIPoor, VAHID, AFZAL, MUHAMMAD RAHEEL, ET. AL., *Haptic-based manipulation scheme of magnetic nanoparticles in a multi-branch blood vessel for targeted drug delivery*, MDPI, Micromachines 9.1 (2018), pp. 1-18. DOI: 10.3390/mi9010014.
- [3] JOHAN J.F. VERHOEF AND THOMAS J. ANCHORDOQUY, *Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery*, National Institute of Health 3.6 (2013), pp. 499-503. DOI: 10.1007/s13346-013-0176-5 .
- [4] CHIU, CHIEN-YU, CHUNG, TZE-WEN ET. AL., *Effects of PEGylation on capture of dextran-coated magnetic nanoparticles in microcirculation*, International Journal of Nanomedicine, Dovepress 14 (2019), pp. 4767-4780. DOI: 10.2147/IJN.S204844.
- [5] YUNN-HWA MA, SI-YI CHEN, SHU-JU TU, HUNG-WEI YANG, HAO-LI LIU, *Manipulation of magnetic nanoparticle retention and hemodynamic consequences in microcirculation: assessment by laser speckle imaging*, International Journal of nanomedicine (2012), pp. 2817-2827. DOI: 10.2147/IJN.S31730.
- [6] FREUND, J. B., SHAPIRO, B., *Transport of particles by magnetic forces and cellular blood flow in a model microvessel*, Physics of fluids 24.51904 (2012), pp. 1-12. DOI: 10.1063/1.4718752.
- [7] TASCI, TONGUC O., DISHARON, DANTE, ET. AL., *Enhanced fibrinolysis with magnetically powered colloidal microwheels*, Advanced Science News 13.1700954 (2017), pp. 1-11. DOI: 10.1002/sml.201700954.

- [8] JIA, JIE-MIN, CHOWDARY, PRAVEEN D., ET. AL., *Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles*, Nature America Inc. 14.2 (2017), pp. 160-171. DOI: 10.1038/NMeth.4105.
- [9] ÁGUILA, OSCAR, ET. AL., *Captura y marginación de partículas en la microvasculatura de un modelo in vivo*, Cinvestav Unidad Monterrey (2019)
- [10] CROCKER, JOHN C., GRIER, DAVID G., *Methods of digital video microscopy for colloidal studies*, Journal of colloid and interface science 179.217 (1995), pp. 298-310. DOI: 10.1006/jcis.1996.0217.
- [11] YE, HUILIN, SHEN, ZHIQIANG, YU, LE, WEI, MEI, LI, YING, *Manipulating nanoparticles transport within bloodflow through external forces: an exemplar of mechanics in nanomedicine*, The Royal Society Publishing 474 (2018), pp. 1-25. DOI: 10.1098/rspa.2017.0845.
- [12] JUSTIN G. TEEGUARDEN, PAUL M. HINDERLITER, GALYA ORR, BRIAN D. THRALL, AND JOEL G. POUNDS, *Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments*, Toxicological sciences 95.2 (2007), pp. 300-312. DOI: 10.1093/toxsci/kfl165.
- [13] SIEMIONOW, MARIA, NANHEKHAN, L. V., *Introduction of cremaster muscle chamber technique for long-term intravital microscopy*, Lippincott Williams and Wilkins 43.2 (1999), pp. 161-166. PMID: 10454323.
- [14] ANDERSON, G. L., ACLAND, R. D., SIEMIONOW, M., MCCABE, S. J., *Vascular isolation of the rat cremaster muscle*, Microvascular Research 36.1 (1987), pp. 56-63. DOI: 10.1016/0026-2862(88)90038-6 .
- [15] BERT MÜLLER, SABRINA LANG, MARCO DOMINIETTO, MARKUS RUDIN, GEORG SCHULZ, HANS DEYHLE, MARCO GERMANN, FRANZ PFEIFFER, CHRISTIAN DAVID,

- TIMM WEITKAMP, *High-resolution tomographic imaging of microvessels*, International Society for Optical Engineering 7078 (2008), pp. 1-10. DOI: 10.1117/12.794157.
- [16] FIDEL RAMÓN ROMERO, ARMANDO MANSILLA OLIVARES, AMELIA RIVERA CRUZ, *Neurofisiología para estudiantes de medicina*, UNAM.
- [17] BAGHER, POONEH, SEGAL, STEVEN S., *The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation*, Jove 52 (2011), pp. 1-5 . DOI: 10.3791/2874.
- [18] JING FENG, YVONNE FITZ, YAN LI, MELINDA FERNANDEZ, IRENE CORTES PUCH, DONG WANG, STEPHANIE PAZNIOKAS, BRANDON BUCHER, XIZHONG CUI, STEVEN B. SOLOMON, *Catheterization of the Carotid Artery and Jugular Vein to Perform Hemodynamic Measures, Infusions and Blood Sampling in a Conscious Rat Model*, Jove 95.e51881 (2015), pp. 1-6. DOI: 10.3791/51881.
- [19] LIMA, RUI, ISHIKAWA, TAKUJI, IMAI, YOHSUKE, TAKEDA, MOTOHIRO, WADA, SHIGEO, YAMAGUCHI, TAKAMI, *Radial dispersion of the red blood cells in blood flowing through glass capillaries: The role of hematocrit and geometry*, Elsevier 41.10 (2008), pp. 2188-2196. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2008.04.033.
- [20] BENTO, DAVID, RODRIGUEZ, RAQUEL O., FAUSTINO, VERA, PINHO, DIANA, FERNANDES, CARLA S., PEREIRA, ANA I., GARCIA, VALDEMAR, MIRANDA, JOÃO M., LIMA, RUI, *Deformation of red blood cells, air bubbles, and droplets in microfluidic devices: flow visualizations and measurements*, micromachines 9.151 (2018), pp. 1-18. DOI: 10.3390/mi9040151.
- Manshadi, Mohammad K. D., Saadat, Mahsa, Mohamadi, Mehdi, Shamsi, Milad, Dejam, Morteza, Kamali, Reza, Sanati-Nezhad, Amir
- [21] MANSHADI, MOHAMMAD K. D., ET AL., *Delivery of magnetic micro/nanoparticles and magnetic-based drug/cargo into arterial flow for targeted therapy*, Taylor and Francis 25.1 (2018), pp. 1963-1973. DOI: 10.1080/10717544.2018.1497106.

- [22] RUKSHIN, IRIS, MOHRENWEISER, JOSEF, YUE, PENGTAO, AFKHAMI, SHAHRIAR, *Modeling superparamagnetic particles in blood flow for applications in magnetic drug targeting*, Fluids (MDPI) 2-29 (2017), pp. 1-12. DOI: 10.3390/fluids2020029.
- [23] LIMA, RUI, ISHIKAWA, TAKUJI, TAKEDA, MOTOHIRO, TANAKA, SHUJI, IMAI, YO-SUKE, TSUBOTA, KEN-ICHI, WADA, SHIGEO, YAMAGUCHI, TAKAMI, *Measurement of erythrocyte motions in microchannels by using a confocal micro-PTV system*, ASME 2007 Summer Bioengineering Conference (2007), pp. 285-286. DOI: 10.1115/SBC2007-175969.
- [24] VAHAK MARGHUSSIAN, *Nano-Glass Ceramics*, School of Metallurgy and Materials Engineering, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran (2015).
- [25] SMITH, THOMAS L., WONG-GIBBONS, DONNA, MAULTSBY, JANE, *Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields*, Journal of orthopaedic research 22 (2003), pp. 80-84. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00157-8.
- [26] MCKAY, JULIA C., PRATO, FRANK S., THOMAS, ALEX W., *A literature review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in microvasculature*, Bioelectromagnetics 43 (2007), pp. 321-334. DOI: 10.3233/CH-2009-1243.
- [27] OHKUBO, CHIYOJI, OKANO, HIDEYUKI, *Magnetic field influences on the microcirculation*, Electromagnetic Fields in Biology and Medicine (2015).
- [28] MIN-CHENG ZHONG, XUN-BIN WEI, JIN-HUA ZHOU, ZI-QIANG WANG, YIN-MEI LI, *Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers*, Nature communications 4.1768 (2013), pp. 17. DOI: 10.1038/ncomms2786.
- [29] PATRICK LIE JOHANSEN, FEDERICO FENAROLI, LASSE EVENSEN, GARETH GRIFFITHS, GERBRAND KOSTER, *Optical micromanipulation of nanoparticles and cells inside living zebrafish*, Nature communications 7.10974 (2016), pp. 1-9. DOI: 10.1038/ncomms10974.
- [30] BANGS LABORATORIES, INC, *Fluorescent/Dyed microspheres*, Bangs Laboratories, Inc, 2013.

- [31] BANGS LABORATORIES, INC, *Safety Data sheet*, Bangs Laboratories, Inc, rev:2020.
- [32] ANTONIO FASANO AND ADELIA SEQUEIRA, *Hemomath*, vol. 18, Springer, 2007.
- [33] PENGTAO YUE, SHERNITA LEE, SHAHRIAR AFKHAMI AND YURIKO RENARDY, *On the motion of superparamagnetic particles in magnetic drug targeting*, SpringerWien NewYork, Acta Mechanica 223 (2011), pp. 505-527. DOI: 10.3791/2874.
- [34] U. WINDBERGER, A. BARTHOLOVITSCH, R. PLASENZOTTI, K. J. KORAK AND G. HEINZE, *Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data*, Experimental physiology 88.3 (2003), pp. 431-440. DOI: 10.1113/eph8802496.
- [35] A. NACEV, C. BENI, O. BRUNO, B. SHAPIRO, *The behaviors of ferromagnetic nanoparticles in and around blood vessels under applied magnetic fields*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 323 (2010), pp. 651-668. DOI: 10.1016/j.jmmm.2010.09.008.
- [36] SILVIO BAEZ, *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*, Microvascula Research, Elsevier 5.3 (1972), pp. 384-394. DOI: 10.1016/0026-2862(73)90054-X.
- [37] ZE-XIAO WANG, JIAN GUAN, LEI CHEN, WEN-QUAN TAO, *A study on thrombus influenced red blood cell flow in microvasculature using moving particle semi-implicit method*, International Journal of Heat and Fluid Flow 81 (2020), pp. 1-11. DOI: 10.1016/j.ijheatfluidflow.2019.108520.
- [38] SIMON ALEXANDER KRANIG, TRIM LAJQI, RAPHAELA TSCHADA, MAYLIS BRAUN, NAVINA KUSS, JOHANNES PÖSCHL, HANNES HUDALLA, *Leukocyte Infiltration of Cremaster Muscle in Mice Assessed by Intravital Microscopy*, JOVE 158 (2020), pp. 1-10. DOI: 10.3791/60509.
- [39] DOUGLAS A. STEEBER, MATTHEW A. CAMPBELL†, ABDUL BASIT, KLAUS LEY, AND THOMAS F. TEDDER, *Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes*

- during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression, PNAS 95 (1998), pp. 7562-7567. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7562.
- [40] YIGUANG YAN AND JOEL KOPLIK, *Transport and sedimentation of suspended particles in inertial pressure-driven flow*, Physics of fluids 21.1 (2009), pp. 1-9. DOI: 10.1063/1.3070919.
- [41] A. C. RICHES, J. G. SHARP, D. BRYNMOR THOMAS AND S. VAUGHAN SMITH, *Blood volume determination in the mouse*, J Physiol 228.2 (1973), pp. 279-284. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010086.
- [42] DMITRY A. FEDOSOV, JULIA FORNLEITNER, AND GERHARD GOMPPER, *Margination of White Blood Cells in Microcapillary Flow*, Physical Review Letters 108 (2012), pp. 1-5. DOI: 10.1103/PhysRevLett.108.028104.
- [43] VIJAY PAPPU AND PROSENJIT BAGCHI, *Hydrodynamic interaction between erythrocytes and leukocytes affects rheology of blood in microvessels*, IOS Press 44 (2007), pp. 191-215. PMID: 17851167.
- [44] ROUVEN SCHOPPMAYER AND JAAP D VAN BUUL, *The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions*, Current Opinion in Physiology 19 (2021), pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.cophys.2020.06.003.
- [45] CRISTIANO MIGLIORINI, YUEHONG QIAN, HUDONG CHEN, EDWARD B. BROWN, RAKESH K. JAIN, AND LANCE L. MUNN, *Red Blood Cells Augment Leukocyte Rolling in a Virtual Blood Vessel*, Biophysical Journal 83.4 (2002), pp. 1834-1841. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73948-9.
- [46] PING HU, TIAN CHANG, WEN-JING CHEN, JIE DENG, SHI-LEI LI, YE-GAI ZUO A, LU KANG, FAN YANG, MEGAN HOSTETTER, ALEX A. VOLINSKY, *Temperature effects on magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by the sol-gel explosion-assisted method*, Journal of Alloys and Compounds 773 (2018), pp. 605-611. DOI: 10.1016/j.jallcom.2018.09.238.

- [47] JEFFREY J. BISHOP, PATRICIA R. NANCE, ALEKSANDER S. POPEL, MARCOS INTAGLIETTA, AND PAUL C. JOHNSON, *Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules*, American Physiological Society 280 (2000), pp. H222-H236. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.1.H222.
- [48] HUNG-YU CHANG, ALIREZA YAZDANI, XUEJIN LI, KONSTANTINOS A. A. DOUGLAS, CHRISTOS S. MANTZOROS, AND GEORGE EM KARNIADAKIS, *Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow*, Biophysical Journal 115 (2018), pp. 1371-1382. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.08.031.
- [49] K. NAMDEE, M. CARRASCO-TEJA, M. B. FISH, P. CHAROENPHOL AND O. ENIOLA-ADEFESO, *Effect of Variation in hemorheology between human and animal blood on the binding efficacy of vascular-targeted carriers*, Nature: Scientific Reports 5.11631 (2015), pp. 1-14. DOI: 10.1038/srep11631.
- [50] ANDREW D. GRIEF, GILES RICHARDSON, *Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 293.1 (2005), pp. 455-463. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.02.040.
- [51] ZHANGYI ZHONG, HONGXIN SONG, TOCO YUEN PING CHUI, BENNO L. PETRIG, AND STEPHEN A. BURNS, *Noninvasive Measurements and Analysis of Blood Velocity Profiles in Human Retinal Vessels*, Investigative Ophthalmology and Visual Science 52.7 (2011), pp. 4151-4157. DOI: 10.1167/iovs.10-6940.