

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

**Estudio de la distribución espacial de partículas a
través de una red de microcanales.**

Tesis que presenta:

Oscar Alejandro Aguila Torres

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias
en Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de la Tesis:

Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Apodaca, Nuevo León México.

Mayo, 2024

© Derechos reservados por
Oscar Alejandro Aguila Torres
2024

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

Dr. Angel David Reyes Figueroa

Dr. Carlos Ruiz Suarez

Dr. Moises Santillán Zerón

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Dr. Jesús Manuel Santana Solano, Director

Apodaca, Nuevo León México., 24 de Mayo de 2024

A mi abuela, María de los Ángeles Torres, mi madre, Ana Elvira Torres, a mi hermana, Mariana Zoé y por último, al amor de mi vida, Melissa Sevilla, quienes me han apoyado en distintos sentidos a que concluya satisfactoriamente esta etapa.

Agradecimientos

Al Dr. Bruno Escalante por buscar siempre lo mejor para los estudiantes, así como por sus consejos y el compartirme sus tan valiosas experiencias.

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

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

Expreso mi profunda gratitud a Amelia Ríos por sus comentarios tan asertivos respecto a las formas correctas de trabajar en el laboratorio.

A mis actuales y antiguos compañeros de laboratorio quienes hicieron más amenos los días en el laboratorio y que además me compartían de sus consejos en sus respectivas áreas de expertiz.

Al Dr. Moisés Santillán quien fue la primera persona que me abrió las puertas para adentrarme en la ciencia, además agradezco su gran disposición para apoyarme durante mis estudios de doctorado.

A mi mascota Luka, quien inconscientemente me ha brindado amor y cariño el cual ha sido muy valioso para continuar trabajando durante días difíciles.

A mi compañera de vida Melissa Sevilla, a quien agradezco tanto su amor y compañía, los cuales fueron un gran motor el cual me permitió poder concluir satisfactoriamente esta etapa.

Al Dr. Carlos Ruiz por aceptar formar parte de mi comité y el brindarme sus valiosas sugerencias respecto a mi trabajo.

Al Dr. Eduardo Sosa quien durante varios años me ha brindado valiosos consejos, los cuales me han ayudado a salir adelante en distintas situaciones complicadas.

Por último, agradezco al Dr. Jesús Santana por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios tanto de maestría como de doctorado bajo su tutela, además de su valioso apoyo, tanto académico como personal así como por el tiempo brindado para resolver mis dudas respecto al proyecto elaborado.

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Resumen	VII
Abstract	IX
1. Introducción	1
1.1. Circulación sanguínea	1
1.2. Reología sanguínea	2
1.2.1. Plasma	3
1.2.2. Glóbulos rojos	4
1.3. Hidrodinámica de los glóbulos rojos	5
1.4. Distribución de células sanguíneas: capa libre de células y marginación	7
1.4.1. Interacción glóbulo rojo - pared. Fuerza de sustentación	8
1.4.2. Interacciones hidrodinámicas entre glóbulos rojos: shear-induced diffusion	10
1.5. Marginación de partículas	12
2. Antecedentes	15
2.1. Análisis de la marginación de micropartículas en la microvasculatura utilizando un modelo in vivo	15
2.2. Antimarginación de micropartículas en convergencias	17
2.3. Justificación e hipótesis	19
2.3.1. Objetivo general	19
2.3.2. Objetivos específicos	19
3. Materiales y métodos	21
3.1. Red de microcanales para el estudio de la interacción de micropartículas con glóbulos rojos	21
3.1.1. Fabricación del dispositivo	21
3.1.1.1. Fotolitografía	22
3.1.1.2. Fabricación de réplicas de PDMS	25
3.2. Protocolo experimental	26
3.2.1. Preparación de la muestra	27
3.2.2. Condiciones experimentales	28
3.2.3. Análisis de imágenes	29
3.2.3.1. Análisis de los videos en campo claro	29
3.2.3.2. Análisis de los videos en fluorescencia	31

3.3. Número de partículas y distribución de rapidez como función del ancho del canal	32
3.4. Desplazamiento cuadrático medio y coeficiente de dispersión	35
4. Resultados y discusión	37
4.1. Fabricación y caracterización del dispositivo microfluídico: red de microcanales. .	37
4.2. Zona de marginación de micropartículas: capa libre de células	39
4.2.1. Variación de la CFL a través de bifurcaciones y confluencias de la red de microcanales	40
4.3. Caracterización de la dinámica de partículas en una suspensión glóbulos rojos/partículas	43
4.3.1. Influencia de los glóbulos rojos sobre la dinámica de las partículas: shear- induced diffusion	43
4.3.2. Distribución de rapidez de las micropartículas: diferenciación entre partículas que viajan cerca de la pared superior e inferior y aquellas que fluyen en el bulto	49
4.3.3. Perfiles de rapidez y distribución lateral de las micropartículas a través de la red de microcanales	52
4.3.4. Variación del coeficiente de dispersión como función del ancho de los microcanales	54
4.4. Cuantificación del número de partículas marginadas en la red de microcanales .	56
4.4.1. Variación del coeficiente de dispersión como función del wall shear rate .	58
4.4.2. Efecto de las convergencias en el número de partículas marginadas: antimarginación.	59
5. Conclusiones y perspectivas	63
5.1. Conclusiones	63
5.2. Perspectivas	64

Índice de Figuras

1.1.	Esquema general de una red vascular del sistema circulatorio. Imagen tomada de la web https://www.fisioterapia-online.com/glosario/vascularizacion	2
1.2.	Composición sanguínea. Estos porcentajes corresponden a seres humanos en condiciones saludables. Estos valores cambian bajo la presencia de patologías. Imagen tomada de la web es.wikipedia.org/wiki/Fraccionamientodesangre	3
1.3.	Factores que influyen en la viscosidad de la sangre. A) Viscosidad como función del hematocrito y B) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). Imagen tomada de [45].	3
1.4.	Micrografía electrónica de un glóbulo rojo, así como la composición de su citoesqueleto. Imagen tomada de [64].	4
1.5.	Movimiento tank-treading de un glóbulo rojo. Imagen tomada de [57].	7
1.6.	Distribución de las células sanguíneas en flujo. Los números 1 y 2 indican las zonas donde se llevan a cabo los efectos de los glóbulos rojos. Imagen tomada y modificada de [64].	8
1.7.	Inclinación de un glóbulo rojo como resultado de su interacción con la pared. Adicionalmente se muestra la distribución de presión entre la membrana y la pared. Imagen tomada y modificada de [58].	9
1.8.	Desarrollo de la fuerza de sustentación como resultado de la interacción de una vesícula con una pared. A) Primera etapa, la cual consiste en un movimiento rotacional de la membrana de un glóbulo rojo a velocidades de deformación baja ($\dot{\gamma} = 0.5 \text{ s}^{-1}$). La flecha de color blanco indica la dirección del flujo, donde la vesícula tiene una partícula anclada a la membrana (resaltada con un círculo rojo) que sirve como trazadora para observar su rotación. B) Comportamiento de la membrana de una vesícula en función del incremento de la velocidad de deformación. Al llegar a un valor crítico la vesícula se aleja significativamente de la pared (lift Force). Imágenes tomadas de [4] y [11] respectivamente.	10
1.9.	Interacción hidrodinámica entre dos glóbulos rojos. A) Esquema que indica dos glóbulos rojos viajando a distinta velocidad (de acuerdo al perfil de velocidad) y B) Posición relativa entre los dos eritrocitos previo y posterior a su colisión. Imagen tomada y modificada de [58].	11
1.10.	Esquema de la liberación controlada de fármacos utilizando micropartículas. Imagen tomada y modificada de [58].	12
1.11.	Interacción hidrodinámica entre una partícula esférica y un glóbulo rojo. Las líneas de la membrana del eritrocito representa las diferentes configuraciones posibles de la membrana. Imagen tomada de [81].	13
2.1.	Vasculatura del músculo cremáster de ratón. Fotografía tomada a una magnificación de 10X.	16

2.2.	Metodología empleada para la administración de partículas al torrente sanguíneo así como la visualización de la vasculatura en el microscopio.	16
2.3.	Mapa de colores de la distribución de partículas en una arteriola de 30 μm	17
2.4.	Sistema modelado para realizar las simulaciones, la convergencia tiene un diámetro de 18 μm	18
2.5.	Distribución de glóbulos rojos en la confluencia (A) y de micropartículas (B) a una distancia de 60 μm después del vértice de la confluencia. Imagen tomada de [9].	18
3.1.	Diseño (A) e impresión de la fotomáscara (B). Las zonas de color blanco indican la estructura del dispositivo, es decir, aquellas que se van a polimerizar en el molde maestro acorde a la fotoresina utilizada (SU-8 negativa).	22
3.2.	Esquema de las etapas descritas previamente para la realización del molde maestro. Se esquematizaron solo algunos pasos. El diseño que se muestra en la imagen es representativo de la técnica (no corresponde al diseño usado para este trabajo, sin embargo, este se muestra en la figura 3.1A). Imagen tomada y modificada de la siguiente página web www.biorender.com	24
3.3.	Fabricación de las réplicas de PDMS a partir del molde maestro.	26
3.4.	Protocolo para la toma de la muestra usada en los experimentos. A) Almacenamiento de la sangre en el tubo vacutainer, B) separación entre los distintos componentes de la muestra (debido al centrifugado), C) se repiten los pasos A y B por duplicado realizando lavados con PBS, D) previo a la realización del experimento se realiza una dilución (con PBS) de la sangre, E) se toma un volumen de partículas y F) se le agrega el volumen de partículas a la suspensión de glóbulos rojos.	27
3.5.	Montaje experimental. En la parte izquierda de la figura se observa una bomba de jeringa, el microscopio y la fluorescencia encendida.	28
3.6.	Diagrama de flujo de los pasos utilizados para el análisis de la capa libre de células. 1) Imagen cruda correspondiente a un video en campo claro tomado a 2000 FPS. 2) Apilamiento de imágenes (2000 imágenes), donde cada imagen está desfasada 1/2000 seg. 3) Métricas utilizadas para la proyección Z del apilamiento de imágenes. 4) y 5) corresponden a la imagen resultante para la desviación estándar y la mediana respectivamente.	30
3.7.	Curvas representativas de la medición de la CFL. La curva de color rojo representa la desviación estándar, mientras que la verde indica la mediana.	31
3.8.	Etapas del algoritmo del procesamiento de los videos en fluorescencia. A) Imagen en campo claro a una magnificación de $50\times$, B) Imagen en campo claro a una magnificación de $10\times$ donde se resaltan 3 partículas en un cuadro del video y C) Etapa final del algoritmo, donde se correlacionan temporalmente los centroides de las partículas para el seguimiento de las trayectorias.	32
3.9.	Número de partículas como función del ancho normalizado del canal. -0.5 y 0.5 representan las paredes laterales mientras que 0 indica el centro del canal.	34

3.10. Rapidez media de cada partícula como función del ancho del canal. Cada punto de color azul representa una partícula. -0.5 y 0.5 representan las paredes laterales mientras que 0 indica el centro del canal.	34
3.11. Evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio lateral de las partículas.	35
4.1. Diagrama de la red de microcanales, donde los cuadros indican las zonas analizadas. El color rojo corresponde al canal principal, los de color café y verde indican la primera bifurcación, el color negro y magenta corresponden a la segunda bifurcación. Finalmente, los de color amarillo y morado indican la primera y la segunda convergencia respectivamente.	38
4.2. A) Sección transversal correspondiente al canal principal (recuadro color rojo en la figura 4.1), B) Ancho (W) y largo (L) de las diferentes zonas de interés.	38
4.3. Medición de la capa libre de células en el canal principal. La curva de color rojo corresponde a la desviación estándar de los niveles de gris, mientras que la curva de color verde representa la mediana de los niveles de gris del video adquirido.	39
4.4. Variación del ancho de la capa libre de células en la zona de bifurcaciones del dispositivo.	41
4.5. Variación del ancho de la capa libre de células en la zona de convergencias del dispositivo. Los símbolos en negro indican la continuación de la pared interna y externa.	42
4.6. Medición de la CFL en la segunda convergencia. La curva de color rojo corresponde a la desviación estándar de los niveles de gris, mientras que la curva de color verde representa la mediana.	43
4.7. Comparativa de la velocidad lateral de las partículas en una suspensión sin glóbulos rojos (A) y a un hematocrito del 40 %(B) como función del ancho del canal.	44
4.8. Perfiles de rapidez de partículas en una suspensión sin glóbulos rojos A) y B) a un hematocrito del 40 %.	45
4.9. Desplazamiento cuadrático medio para ambas suspensiones.	45
4.10. Modificación experimental para observar la dinámica en Z.	46
4.11. Trayectorias representativas de las partículas en la vista lateral.	47
4.12. Evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio para ambas vistas.	48
4.13. Distribución de desplazamientos en la dirección Y (símbolos de color verde) y en la dirección Z (símbolos de color rojo).	49
4.14. A) Perfiles de rapidez de las partículas que viajan a diferentes alturas en el microcanal y B) Evolución del desplazamiento cuadrático medio para las partículas que viajan a diferentes alturas. En ambas curvas los puntos de color negro corresponden a las partículas que fluyen en el bulto mientras que los de color rojo a las partículas cerca de la pared.	50
4.15. Distribución lateral de partículas normalizada que viajan a diferentes alturas. Curva de color negro corresponde a las que fluyen en el centro, mientras que la de color rojo representa a las partículas cerca de la pared superior.	51

4.16. Distribución de desplazamientos de las partículas, donde la curva de color azul corresponde a la vista lateral (experimentos realizados a 2.5 mm respecto a la entrada), la de color rojo a las partículas que fluyen cerca de la pared superior mientras que la curva de color verde representa a las partículas que se mueven en el bulto (estas dos últimas curvas se analizaron al final del canal principal).	52
4.17. Comparativa de los perfiles de rapidez de las partículas en las diferentes zonas de interés, A) Canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia. En cada imagen la curva de color rojo corresponde a las partículas que viajan cerca de la pared, mientras que la de color negro a las partículas que fluyen en el centro del canal.	53
4.18. Comparativa de la distribución lateral de partículas en las diferentes zonas de interés. A) cuantifica al canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia. En cada imagen la curva de color rojo corresponde a las partículas que viajan cerca de la pared, mientras que la de color negro a las partículas que fluyen en el centro del canal.	54
4.19. Distribución de los coeficientes de dispersión con respecto al ancho del canal en las diferentes regiones de interés. A) canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia.	55
4.20. Porcentaje de partículas marginadas en el canal principal. La zona 1 corresponde a 2.5 mm respecto a la entrada y zona 2 a 1 cm.	56
4.21. Evolución del número de partículas marginadas (indicadas por los puntos de color rojo) en las bifurcaciones del sistema (representadas por la zona 3 y 4).	57
4.22. Coeficiente de dispersión en función del wall shear rate para cada una de las zonas analizadas.	58
4.23. Número de partículas marginadas a través de las zonas analizadas.	59
4.24. Coeficiente de dispersión en función del wall shear rate para cada una de las zonas analizadas. Los puntos de color negro representan a la primera y segunda convergencia respectivamente.	60
4.25. Porcentaje de partículas marginadas en las distintas zonas analizadas, el número 7 corresponde a una distancia de 700 μm respecto al vértice de la segunda convergencia.	61

Resumen

En el flujo sanguíneo existe una segregación de las células sanguíneas, tanto plaquetas como glóbulos blancos viajan en la periferia de los vasos mientras que los glóbulos rojos fluyen en el centro. A la migración lateral tanto de plaquetas como de células blancas hacia la capa libre de células se le conoce como *marginación*, este fenómeno ha motivado a la fabricación de partículas de distintas características con el objetivo de que lleven a cabo este proceso, lo cual las volvería un potencial candidato para ser utilizadas como acarreadores de fármacos [10][47][66]. Diversos estudios han reportado que las partículas se marginan en vasos individuales, tanto utilizando sistemas *in vivo* [41], modelos *in vitro* [18] así como simulaciones computacionales [81]. Sin embargo, la principal limitante de los trabajos publicados es que el enfoque se centra a estudiar la marginación a nivel de vasos (o canales) individuales, por lo que el estudio en redes vasculares realistas es prácticamente escaso. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evalúa el efecto de una red de microcanales sobre la marginación de partículas esféricas de $2\ \mu\text{m}$ de diámetro para lo cual se grabaron videos del flujo de partículas en una suspensión con glóbulos rojos, los cuales fueron analizados utilizando técnicas de análisis de imágenes. Se caracterizaron los siguientes parámetros: distribución lateral de partículas, el coeficiente de dispersión así como el perfil de velocidad. Estos datos se evaluaron en distintas zonas de la red de microcanales, lo cual nos permitió comparar el efecto tanto de las bifurcaciones como de las convergencias. Los resultados obtenidos muestran que existe una gran heterogeneidad en la distribución de glóbulos rojos a través de los microcanales, resaltando el desarrollo de una capa libre de células central conforme fluyen por las convergencias, además se resaltan los efectos geométricos sobre la marginación de partículas, donde las bifurcaciones promueven un incremento en el número de partículas cerca de las paredes mientras que en las convergencias ocurre una antimarginación. Por último, se lograron caracterizar los coeficientes de dispersión de las partículas en la red de microcanales, demostrando la relación lineal que existe con la velocidad de deformación (shear rate ($\dot{\gamma}$)).

Abstract

There is a segregation of blood cells in the circulatory system, with both platelets and leucocytes traveling in the periphery of blood vessels, while erythrocytes flow in the vessel core. *Margination* is known as the lateral migration of both platelets and white cells towards the cell free layer, the latter has motivated the manufacturing of particles with different characteristics aiming to carry out this process, which would make them potential candidates to use it as drug carriers [10] [47][66]. Various studies have reported that particles marginate in individual vessels, both using *in vivo* systems [41], *in vitro* models [18], and computational simulations [81]. However, the main limitation in published works is the focus on studying margination at the level of individual vessels (or channels), so the study in realistic vascular networks is practically scarce. Based on the above, this work evaluates the margination effect of spherical particles with diameter of $2\ \mu\text{m}$ flowing through a microchannel network, for which videos of particle flow in a suspension with red blood cells were recorded and analyzed using image analysis techniques. The following parameters were characterized: lateral distribution of particles, dispersion coefficient, and velocity profile. These data were evaluated in different zones of the microchannel network, allowing us to compare the effect of both bifurcations and convergences. The results obtained show that there is great heterogeneity in the distribution of red blood cells through the microchannels, highlighting the development of a central free cell layer as they flow through the convergences. Furthermore, the geometric effects on particle margination are emphasized, where bifurcations promote an increase in the number of particles near the walls, while in convergences, anti-margination occurs. Finally, the dispersion coefficients of the particles in the microchannel network were characterized, demonstrating the linear relationship with the shear rate ($\dot{\gamma}$).

1

Introducción

1.1 Circulación sanguínea

La sangre se distribuye a través de los vasos sanguíneos por todo el cuerpo transportando oxígeno y nutrientes hacia todas las células que lo componen, y al mismo tiempo retirando el dióxido de carbono. Todo este proceso se lleva a cabo gracias a la fuerza ejercida por el corazón. Desde un punto de vista general, el sistema circulatorio está integrado por tres partes: el corazón, los vasos sanguíneos y la sangre. Existe una gran heterogeneidad en cuanto a la distribución de los vasos sanguíneos en función de su tamaño (diámetro), los cuales se clasifican de la siguiente manera: arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas. Asimismo, están interconectados unos con otros, formando arquitecturas complejas conocidas como redes vasculares (ver fig. 1.1). De manera general, las redes vasculares parten de los vasos de mayor diámetro, las arterias (diámetros $> 300 \mu\text{m}$), las cuales se ramifican para conformar arteriolas (diámetros $\geq 10 \mu\text{m}$ y $< 300 \mu\text{m}$) hasta llegar a los vasos de menor diámetro, los cuales son los capilares (diámetro $< 10 \mu\text{m}$). Posteriormente, encontramos a las vénulas y por último a las venas, cuyos diámetros son comparables a los de las arteriolas y arterias respectivamente. En las redes vasculares encontramos dos tipos de ramificaciones, bifurcaciones y convergencias, donde las primeras se llevan a cabo del lado arterial (arterias y arteriolas) y las últimas del lado venoso (vénulas y venas). Finalmente, los capilares son los conductos que conectan a la parte arterial con la parte venosa.

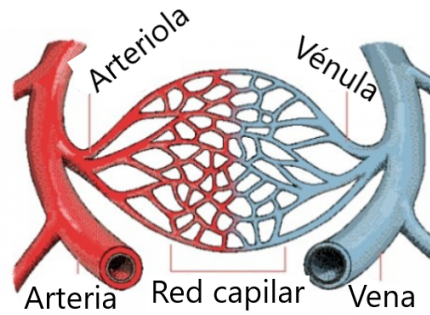


Figura 1.1: Esquema general de una red vascular del sistema circulatorio. Imagen tomada de la web <https://www.fisioterapia-online.com/glosario/vascularizacion>.

1.2 Reología sanguínea

La sangre está integrada principalmente por dos componentes: células sanguíneas (45%), dentro de las cuales encontramos a los glóbulos rojos (44%), glóbulos blancos (.3%) y plaquetas (.7%); todas ellas inmersas en el plasma (55% del volumen total de la sangre). Los porcentajes previamente descritos corresponden a los seres humanos bajo condiciones saludables, y estos valores pueden verse afectados en función de la presencia de distintas patologías (ver fig. 1.2). Una de las fuerzas relevantes en el flujo sanguíneo es el estrés de corte (shear stress τ) el cual está definido como una fuerza tangencial aplicada sobre una superficie, donde esta fuerza es la responsable de la deformación de los glóbulos rojos y juega un papel importante sobre la pared vascular debido a que las células endoteliales son las encargadas de sensar su efecto. Por otro lado, la velocidad de deformación (shear rate ($\dot{\gamma}$)) está relacionada con los gradientes de velocidad, es decir, las diferencias en las velocidades entre las regiones que fluyen a baja velocidad (cerca de las paredes) con respecto al centro del canal (altas velocidades). Desde la perspectiva reológica, la sangre es un fluido no newtoniano de tipo adelgazante, es decir, su viscosidad disminuye en función de la velocidad de deformación. Otro factor importante que determina su viscosidad es el porcentaje de células rojas presentes, es decir, el hematocrito (ver fig. 1.3A). Debido a que el presente trabajo se centra en estudiar a los glóbulos rojos, en las secciones posteriores solo se describirá con mayor detalle acerca de los eritrocitos.

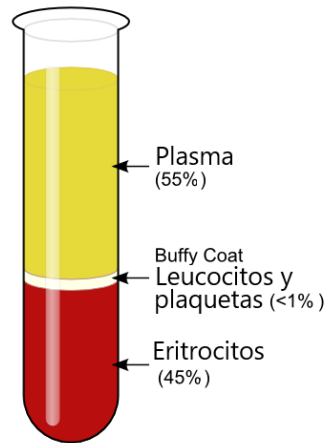


Figura 1.2: Composición sanguínea. Estos porcentajes corresponden a seres humanos en condiciones saludables. Estos valores cambian bajo la presencia de patologías. Imagen tomada de la web es.wikipedia.org/wiki/Fraccionamiento_de_sangre.

1.2.1 Plasma

El plasma está integrado por electrolitos, proteínas, hormonas, entre otras macromoléculas. De forma individual se le considera un fluido newtoniano con una viscosidad de ~ 1.2 cP. Sin embargo, es solo un componente de toda la sangre. Dadas las proteínas que integran al plasma (principalmente fibrinógeno), estas son las responsables de la tendencia de los glóbulos rojos a agregarse a valores bajos de shear rate (velocidad de deformación) (ver fig. 1.3B). Conforme esta velocidad de deformación va incrementado los agregados tienden a romperse, lo cual ocasiona que la viscosidad comience a disminuir.

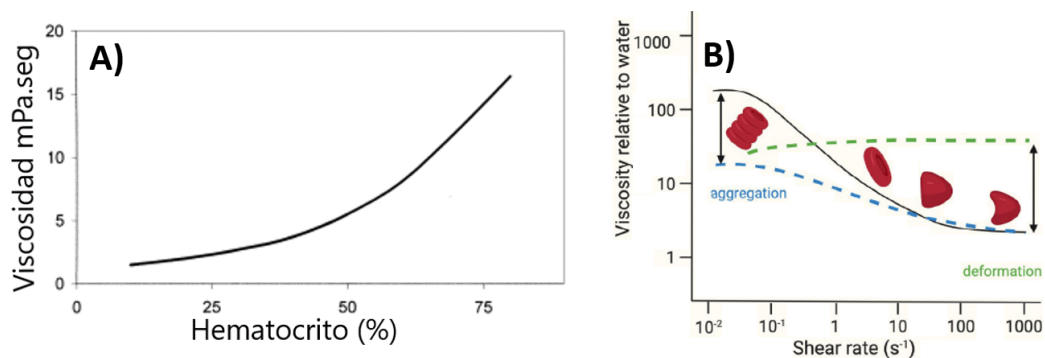


Figura 1.3: Factores que influyen en la viscosidad de la sangre. A) Viscosidad como función del hematocrito y B) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). Imagen tomada de [45].

1.2.2 Glóbulos rojos

Bajo condiciones saludables las células sanguíneas más abundantes son los glóbulos rojos, también conocidos como eritrocitos. Dada su alta concentración en sangre, los eritrocitos influyen significativamente en la reología sanguínea. Estas células se forman en la médula ósea a través de un proceso conocido como eritropoyesis en el cual llevan a cabo un proceso de maduración (diferenciación), donde pierden su núcleo antes de entrar a la circulación (en forma de reticulocitos). En la sangre, los eritrocitos se encuentran suspendidos en un medio isotónico, y bajo estas condiciones presentan una morfología de disco bicóncavo de $8 \mu\text{m}$ de diámetro y $2 \mu\text{m}$ de grosor (ver fig. 1.4). Estructuralmente, estas células están compuestas de 2 envolturas: una capa externa y una interna. La primera está integrada por una bicapa lipídica fluida decorada con proteínas membranales, mientras que la capa interna está compuesta por un citoesqueleto, el cual está integrado por las siguientes proteínas, espectrina, actina y la proteína 4.1. Estos elementos forman una malla bidimensional la cual es responsable de mantener la estructura de la célula [50]. Los nodos de esta malla están anclados a la bicapa a través de proteínas transmembranales, y estos anclajes son móviles en la membrana, por lo que, tanto el citoesqueleto como los lípidos pueden desplazarse uno con respecto al otro (ver fig. 1.4). De igual manera, esta red puede estirarse a través del desplazamiento de las proteínas de anclaje mientras la superficie de la membrana se mantiene constante [19][51]. Asimismo, la membrana envuelve una solución de hemoglobina cuya viscosidad es de $\sim 6 \text{ cP}$, donde esta proteína es la responsable de transportar tanto oxígeno como dióxido de carbono hacia las células del organismo. En resumen, la ausencia de un núcleo en conjunto con el citoesqueleto dan como resultado que los glóbulos rojos puedan deformarse al ser sometidos a fuerzas externas, y al mismo tiempo recuperar su morfología, a lo cual se le conoce como propiedad de memoria [23]. Adicionalmente, poseen una gran relación área/volumen, lo que permite que la membrana conserve su integridad al sufrir una deformación.

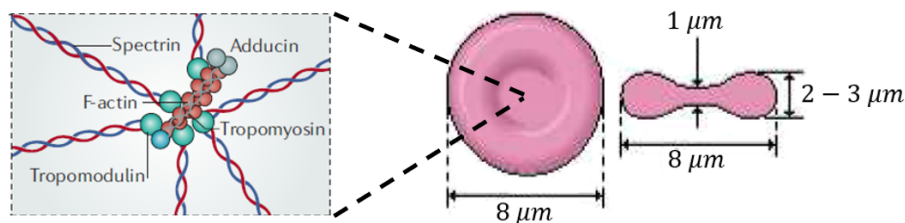


Figura 1.4: Micrografía electrónica de un glóbulo rojo, así como la composición de su citoesqueleto. Imagen tomada de [64].

Como consecuencia, cualquier factor que afecte tanto la concentración de estas células, así como sus propiedades mecánicas repercutirá en la viscosidad de la sangre. Para ejemplificar lo anterior, si se rigidiza la membrana de los eritrocitos (por ejemplo con glutaraldehído) la viscosidad prácticamente se mantendrá constante en función de la velocidad de deformación lo que complicaría el flujo de estas células por los capilares. Aunado a lo anterior, aumentaría la probabilidad de un taponamiento de estos vasos lo que desencadenaría en un ataque al corazón. De manera general, tanto plaquetas como glóbulos blancos son consideradas células rígidas en comparación a los glóbulos rojos.

1.3 Hidrodinámica de los glóbulos rojos

Las ecuaciones que describen la dinámica de un fluido son las de Navier-Stokes (ec. 1.1 y 1.2), las cuales son el resultado de aplicar la segunda ley de Newton a un elemento de volumen del fluido y la conservación de masa (ec. 1.2):

$$\overbrace{\rho \left(\frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + \vec{V}(\vec{V} \cdot \nabla) \right)}^{\text{fuerzas inerciales}} = \overbrace{-\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{V}}^{\text{fuerzas viscosas}}, \quad (1.1)$$

$$\nabla \cdot \vec{V} = 0. \quad (1.2)$$

Para describir la hidrodinámica de un elemento del fluido es necesario resolver las ecuaciones de Navier-Stokes, las cuales tienen soluciones analíticas para un número limitado de casos particulares, por lo que se resuelven en mayor medida a través de aproximaciones numéricas. Uno de los casos para el cual estas ecuaciones tienen solución analítica es cuando el flujo es estacionario y laminar. Esta última característica está definida por el número de Reynolds, el cual es una cantidad adimensional que relaciona la influencia de las fuerzas inerciales respecto a las viscosas,

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu}. \quad (1.3)$$

Cuando el número de Reynolds $Re \ll 1$, las fuerzas inerciales prácticamente no tienen relevancia, y los efectos que predominan son de origen viscoso. Bajo estas condiciones se dice que el comportamiento del flujo es laminar, por lo tanto, las ecuaciones de Navier-Stokes se simplifican a las ecuaciones de Stokes (ec. 1.4 y 1.2).

$$-\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{V} = 0. \quad (1.4)$$

Por lo tanto, para entender la hidrodinámica de los glóbulos rojos, es decir, la influencia que tienen los glóbulos rojos sobre el fluido alrededor de ellos es necesario calcular tanto la velocidad como la presión. Como ya se ha mencionado, los eritrocitos juegan un papel de suma importancia en el organismo, por lo que el estudiar tanto su dinámica como sus propiedades mecánicas ha sido tema relevante en las últimas décadas [4][23][58]. Sin embargo, no todo ha sido elucidado. Enfatizando en la dinámica de los eritrocitos se han desarrollado diversos modelos para su estudio, por ejemplo, modelándolos como vesículas y burbujas, desde un punto de vista experimental y de simulación computacional [16][33]. Desde el punto de vista experimental, en el 2012 Oishi y colaboradores [57] analizaron experimentalmente la hidrodinámica de los glóbulos rojos utilizando la microscopía confocal, para lo cual montaron una platina móvil al microscopio con el objetivo de mantener en el mismo campo visual a los eritrocitos y realizar un seguimiento con mayor precisión. Para estudiar tanto la deformación como la dinámica de la membrana de los glóbulos rojos anclaron partículas fluorescentes de $0.2 \mu\text{m}$, cuyo protocolo consistía en dejar incubando a las nanopartículas con los eritrocitos durante varias horas para garantizar su anclaje. Como resultado de su deformabilidad, la hidrodinámica de los glóbulos rojos es bastante compleja, dado que perturban significativamente el fluido alrededor de ellos, tal y como se observa en la figura 1.5, donde las flechas de colores indican la dirección y magnitud de la velocidad del fluido. Se puede observar con bastante claridad que el fluido circundante al glóbulo rojo lleva tanto la misma dirección como la velocidad de la membrana del eritrocito. A este tipo de movimiento se le conoce como *tank treading* (TT), el cual está caracterizado por un movimiento rotacional de la membrana manteniendo un ángulo de inclinación constante (respecto a la dirección de flujo) y se ha encontrado que esta dinámica está presente cuando la relación de viscosidades (λ) entre el fluido interno (del glóbulo rojo) y el fluido externo (plasma) es alrededor de 3 [32]. Trabajos teóricos predicen que el movimiento TT depende principalmente del índice de esfericidad [35], del esfuerzo de corte generado por el flujo, la viscosidad de la membrana del eritrocito [57][75] y de su propiedad de memoria [23].

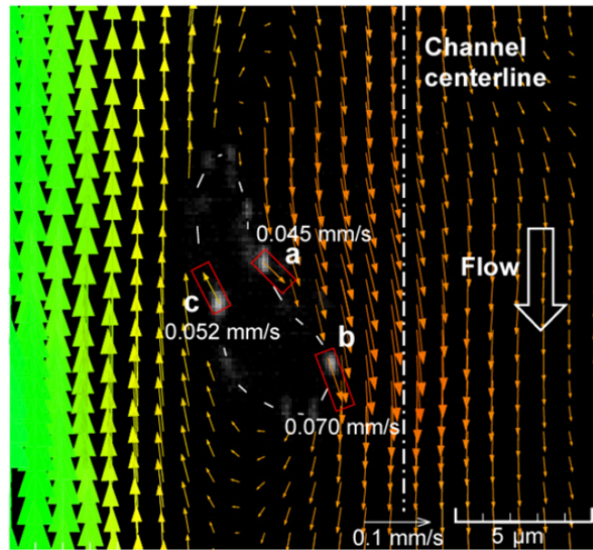


Figura 1.5: Movimiento tank-treading de un glóbulo rojo. Imagen tomada de [57].

1.4 Distribución de células sanguíneas: capa libre de células y marginación

En la sección anterior se discutió acerca de la hidrodinámica de los glóbulos rojos (ver sec. 1.3) y como modifican el fluido alrededor de ellos. En el flujo sanguíneo los eritrocitos llevan a cabo dos efectos que causan su desplazamiento en el plano perpendicular al flujo, cuando viajan cerca de las paredes (ver llaves de color verde en la fig. 1.6) y cuando fluyen alrededor del centro del canal (ver llaves de color rojo en la fig. 1.6). Como resultado de su deformabilidad y la acción del esfuerzo de corte (shear stress), los eritrocitos se deforman cuando fluyen cerca de las paredes. Dicha deformación es asimétrica, es decir, existe una diferencia entre la curvatura de la parte posterior del eritrocito respecto a la de la parte anterior. Esta discrepancia de curvaturas genera una diferencia de presiones, lo que resulta en una fuerza de elevación que tiende a alejar a los glóbulos rojos de las paredes. Esta fuerza de sustentación (elevación) da como resultado la formación de una zona libre de eritrocitos, a lo que le conoce como *capa libre de células*. Conforme se van alejando de las paredes estas células entran en contacto con el resto de células rojas, lo que resulta en colisiones entre ellas mismas, las cuales generan desplazamientos aleatorios perpendiculares (respecto a la dirección de flujo) dando como resultado un efecto conocido como shear-induced diffusion (ver las flechas de color negro en la fig. 1.6). Ahora bien, ¿que efecto tienen estas interacciones entre glóbulos rojos sobre las plaquetas y células blancas?.

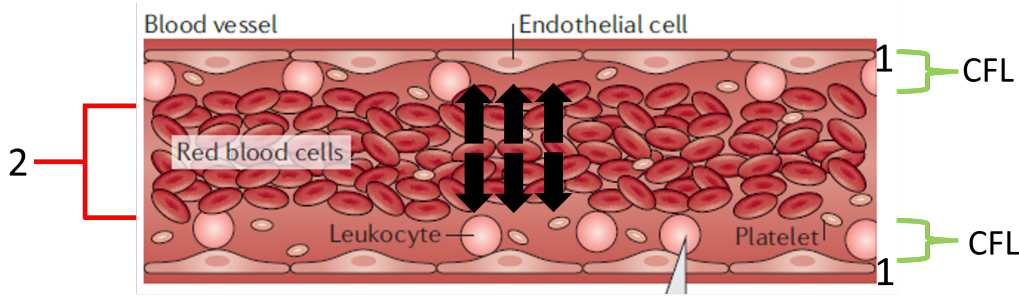


Figura 1.6: Distribución de las células sanguíneas en flujo. Los números 1 y 2 indican las zonas donde se llevan a cabo los efectos de los glóbulos rojos. Imagen tomada y modificada de [64].

Fisiológicamente, tanto plaquetas como células blancas en el flujo sanguíneo llevan a cabo un fenómeno conocido como marginación [14][53][61][80], el cual hace referencia a la migración radial que llevan estas células hacia la capa libre de células. Este fenómeno es el resultado de la interacción hidrodinámica entre las plaquetas y leucocitos con los eritrocitos (ver fig. 1.6). Es decir, en el flujo sanguíneo se lleva a cabo una segregación, donde las células blancas y plaquetas viajan en la periferia mientras que los glóbulos rojos en el centro del canal. En las siguientes dos secciones se explicará más acerca de los mecanismos presentes en la marginación biológica.

1.4.1 Interacción glóbulo rojo - pared. Fuerza de sustentación

Los glóbulos rojos en el flujo sanguíneo se deforman debido a una fuerza conocida como estrés de corte cuya magnitud disminuye con respecto a la distancia con las paredes. La geometría de un eritrocito al deformarse presenta una asimetría entre la parte frontal con respecto a la parte posterior de su membrana [29][34]. Como consecuencia de esta asimetría longitudinal y la presencia de las paredes, se genera una diferencia de presión entre los puntos más cercanos de la membrana con la pared y la pared, lo que da como resultado una fuerza de elevación, la cual tiende a alejar al glóbulo rojo de las paredes [11] (ver fig. 1.7). Esta interacción se desarrolla en 3 etapas: la primera se lleva a cabo a bajas velocidades de deformación ($\dot{\gamma}$), aquí el glóbulo rojo comienza a moverse con un movimiento rotacional de su membrana, donde la parte posterior al punto de contacto presenta una mayor curvatura respecto a la parte anterior (ver fig. 1.8 A). Conforme la velocidad de deformación va incrementando ($\dot{\gamma}$ intermedios correspondientes a la segunda etapa) la célula comienza a incrementar su velocidad rotacional, lo que genera un ángulo de inclinación constante entre la membrana y la dirección de flujo. Finalmente, si se continúa aumentando la velocidad de deformación hasta un valor crítico ($\dot{\gamma}_c$), la célula comienza a alejarse de la pared conforme se va desarrollando una diferencia de presión entre la membrana

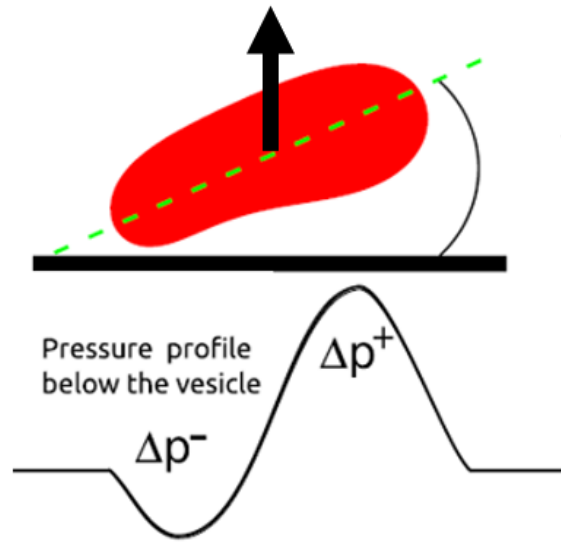


Figura 1.7: Inclinación de un glóbulo rojo como resultado de su interacción con la pared. Adicionalmente se muestra la distribución de presión entre la membrana y la pared. Imagen tomada y modificada de [58].

y la pared (ver fig. 1.7 y 1.8B). Este efecto es el responsable de la formación de una capa libre de células (CFL) en la periferia de los canales, la cual está caracterizada por tener una ausencia de eritrocitos (o una baja concentración) y un delgado grosor ($2\text{-}4\ \mu\text{m}$). La formación de la CFL fue reportada por primera vez por Poiseuille en su investigación acerca de la circulación en el mesenterio de rana en 1835 [60]. La relevancia reológica y fisiológica de esta CFL fue reportada por Fahraeus y Lindqvist en 1931 [25], donde mostraron que la viscosidad de la sangre que fluye en pequeños tubos decaiga como función de la disminución del diámetro, esto como resultado de la aparición de la capa libre de células, lo cual es conocido como *Efecto Fahraeus-Lindqvist*. En el 2005 Abkarian y colaboradores analizaron experimentalmente las variables involucradas en esta fuerza de elevación, para lo cual sintetizaron vesículas de distintas características para realizar sus estudios [4]. Mediante el uso de análisis dimensional encontraron que la fuerza de elevación depende de la viscosidad (μ), la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), el tamaño de la vesícula (R^2) y de una función adimensional que depende de la distancia con la pared ($\frac{R}{h}$) y del volumen reducido (v). Para resaltar la dependencia de esta fuerza de elevación con las propiedades mecánicas de las células sanguíneas realizaron la siguiente comparación. Si se considera el flujo en una vénula, la magnitud de la fuerza de elevación para los glóbulos rojos es de $155\ \text{pN}$, mientras que para un leucocito es de $46\ \text{pN}$,

$$F_l = \mu \dot{\gamma} \frac{R^3}{h} f(1 - v). \quad (1.5)$$

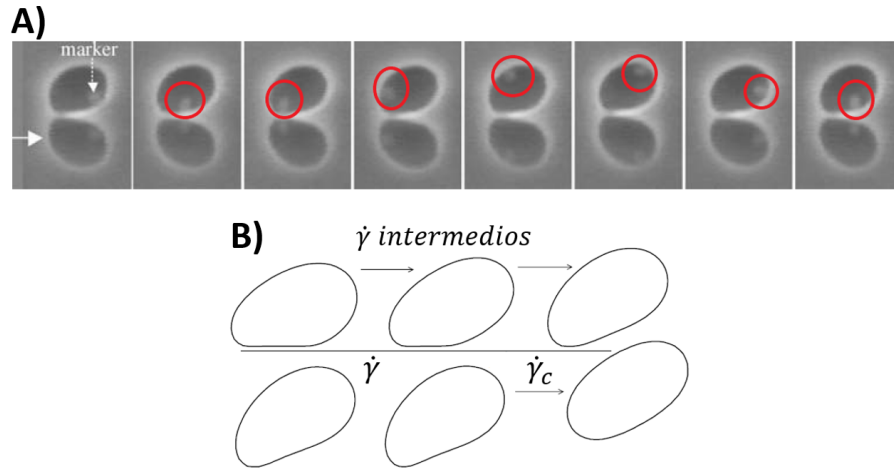


Figura 1.8: Desarrollo de la fuerza de sustentación como resultado de la interacción de una vesícula con una pared. A) Primera etapa, la cual consiste en un movimiento rotacional de la membrana de un glóbulo rojo a velocidades de deformación baja ($\dot{\gamma} = 0.5 \text{ s}^{-1}$). La flecha de color blanco indica la dirección del flujo, donde la vesícula tiene una partícula anclada a la membrana (resaltada con un círculo rojo) que sirve como trazadora para observar su rotación. B) Comportamiento de la membrana de una vesícula en función del incremento de la velocidad de deformación. Al llegar a un valor crítico la vesícula se aleja significativamente de la pared (lift Force). Imágenes tomadas de [4] y [11] respectivamente.

1.4.2 Interacciones hidrodinámicas entre glóbulos rojos: shear-induced diffusion

En la microcirculación, el número de Reynolds es bajo ($Re \ll 1$, para vasos sanguíneos $< 300 \mu\text{m}$ de diámetro) por lo que los mecanismos de transporte están gobernados por las fuerzas viscosas (efectos inerciales son despreciables) y están descritos por las ecuaciones de Stokes (ver ec. 1.2 y 1.4). Como resultado, para que exista una migración lateral (cross-stream migration) es necesario romper con la simetría de Stokes, característica que cumplen los eritrocitos debido a su deformabilidad. Con base en esto, su migración lateral está dada por las interacciones hidrodinámicas entre estas células (y la presencia de la pared, tal y como se explicó en la sección anterior). Detallando un poco más acerca de este fenómeno, vamos a considerar una interacción entre dos eritrocitos (interacción por pares), suponiendo que estas dos células se encuentran fluyendo por un gradiente de velocidades (ver fig. 1.9A). Paulatinamente, la célula que viaja a mayor velocidad alcanzará a aquella de menor velocidad. En ese momento ambas células colisionarán (interacción hidrodinámica) y se generará un desplazamiento lateral (ΔY del orden de una fracción del tamaño del eritrocito), es decir, ambas células se encontrarán

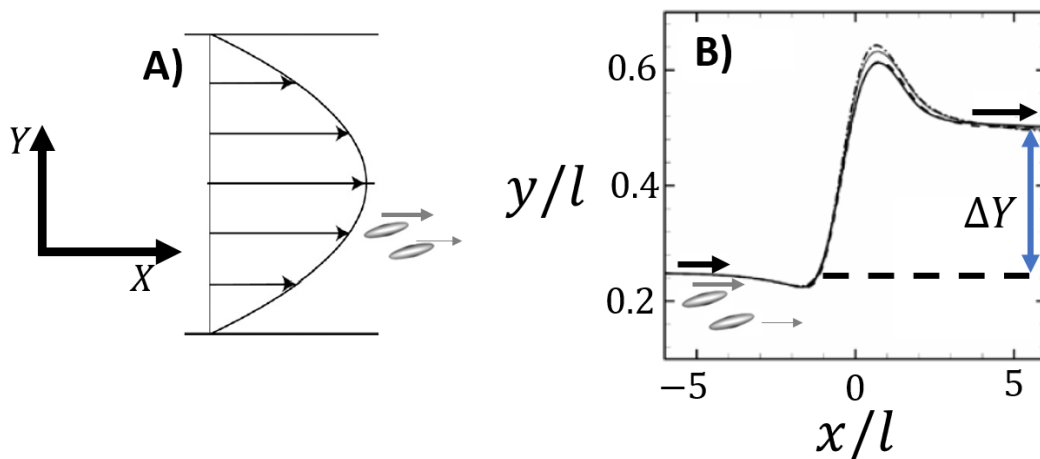


Figura 1.9: Interacción hidrodinámica entre dos glóbulos rojos. A) Esquema que indica dos glóbulos rojos viajando a distinta velocidad (de acuerdo al perfil de velocidad) y B) Posición relativa entre los dos eritrocitos previo y posterior a su colisión. Imagen tomada y modificada de [58].

en una posición distinta respecto a su ubicación previa a la colisión (ver fig.1.9B). Ahora bien, si consideramos un número grande de interacciones (debido a la alta concentración de eritrocitos) estos desplazamientos laterales forman un movimiento aleatorio difusivo, a lo que se le conoce como *shear-induced diffusion* [28][44]. Sin embargo, debido a que estos desplazamientos son originados por interacciones hidrodinámicas y no por la agitación térmica de las moléculas (movimiento browniano), estos movimientos aleatorios están caracterizados por un coeficiente de dispersión que depende de la frecuencia de colisión entre 2 células donde los parámetros involucrados son los siguientes, la sección transversal de colisión (que depende de a^2 , donde a es el radio de la célula), la velocidad a la que se aproximan las células ($\dot{\gamma}$) y del volumen celular (ϕ), así como de una constante que describe las propiedades mecánicas de las células (k) (ver ec. 1.6),

$$D_y = k\dot{\gamma}\phi a^2. \quad (1.6)$$

Entonces, a manera de resumen, la dinámica de los glóbulos rojos se explica por la coexistencia entre los dos efectos explicados anteriormente, la fuerza de elevación (como resultado de la interacción de los eritrocitos con las paredes) y la interacción entre células rojas (*shear-induced diffusion*). Estos efectos, en conjunto con las propiedades mecánicas y la baja concentración de células blancas y plaquetas dan como resultado que la marginación se lleve a cabo.

1.5 Marginación de partículas

Teniendo como referencia la marginación biológica, en los últimos años se ha explorado el uso de partículas para la liberación controlada de fármacos a través del torrente sanguíneo, donde los blancos terapéuticos se encuentran tanto en las paredes de los vasos (receptores) como en los tejidos, por lo que el transporte del fármaco mediante el torrente sanguíneo hacia la capa libre de células (marginación) es un requisito para dicha liberación en conjunto con una posterior interacción fármaco - receptor (adhesión). Lo anterior se observa de manera esquemática en la figura 1.10, donde el objetivo de estos sistemas es administrar las partículas (de distintas características) en la circulación para que estas se marginen hacia la capa libre de células (como resultado de la interacción con los glóbulos rojos). Una vez que las partículas se marginan puede ocurrir una adhesión a la pared endotelial, lo que desencadenaría una liberación del fármaco. Estos sistemas ya han sido utilizados en enfermedades cardiovasculares, el cáncer (imagenología) y la inflamación [10][47][66], donde el objetivo principal es lograr tanto una reducción de las dosis así como los efectos adversos. Dentro de los parámetros explorados en cuanto a la fabricación de partículas están los siguientes, forma, tamaño, rigidez y superficie (conocidos como parámetros 4's por su traducción al inglés). La mayoría de los trabajos en esta dirección se han focalizado en la forma y tamaño de las partículas [2][18], así como la dependencia de la marginación con el hematocrito y el estrés de corte [43][67][81]. Todos estos trabajos se han realizado bajo condiciones no realistas, es decir, idealizan las condiciones bajo las cuales se realizan los experimentos (variables/valores alejados de los fisiológicos).

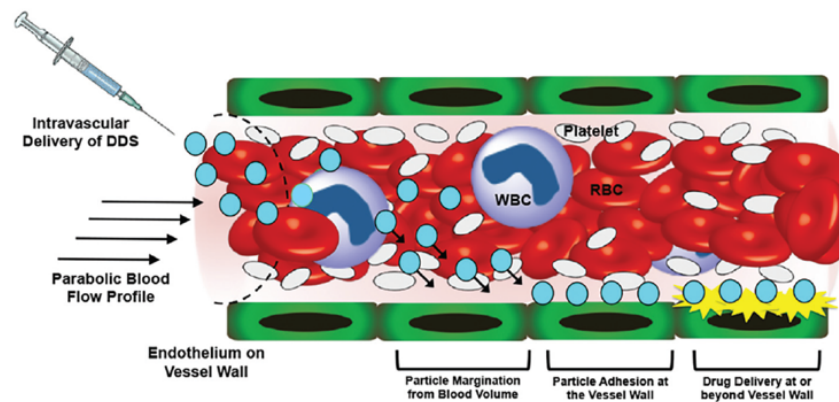


Figura 1.10: Esquema de la liberación controlada de fármacos utilizando micropartículas. Imagen tomada y modificada de [58].

A manera de resumen, se ha encontrado que el tamaño óptimo de las partículas tiene que ser superior a $0.5 \mu\text{m}$, ya que para diámetros inferiores a este valor se ha reportado que las partículas no se marginan de forma eficiente debido a la relevancia que toma el movimiento browniano a estas escalas, generando que una vez marginadas las partículas tiendan a regresar hacia el centro del canal [41]. De igual manera, se ha demostrado mediante el uso de simulaciones computacionales que la migración lateral de partículas hacia la capa libre de células es debido a las interacciones hidrodinámicas con los glóbulos rojos (ver fig. 1.11), donde la perturbación generada por los eritrocitos ocasiona que las partículas se desplacen lateralmente hacia las paredes [20][81]. Otro mecanismo por el cual las partículas llegan a la capa libre de células es el *efecto cascada*. Este efecto se refiere a un movimiento lateral abrupto que llevan a cabo aquellas partículas que viajan a una distancia muy proxima de las paredes (alrededor de $10 \mu\text{m}$) hacia la capa libre de células, como resultado a la formación de microestructuras y cavidades creadas por los glóbulos rojos (clusters) [76]. Estas cavidades sirven como atajo para que las partículas se marginen de una manera más rapida, como resultado de un mayor desplazamiento generado por la colisión con estos clusters. Específicamente, el proceso de marginación a través del efecto cascada se lleva a cabo por tres eventos: 1) un movimiento difusivo lento, 2) migración lateral abrupta hacia las paredes (efecto cascada) y 3) el movimiento a través de la capa libre de células. Aunque ya existe evidencia sobre la marginación de partículas y su dependencia con algunas variables (velocidad de deformación, hematocrito), la mayoría de los trabajos reportados ha dejado de lado si la marginación prevalece en redes vasculares, aspecto de gran relevancia

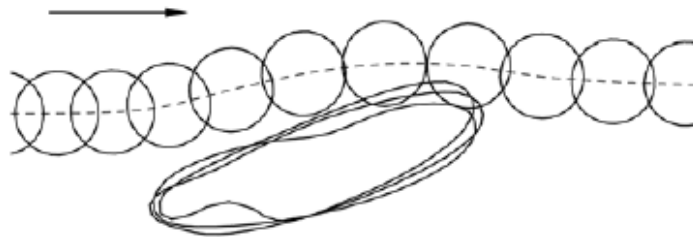


Figura 1.11: Interacción hidrodinámica entre una partícula esférica y un glóbulo rojo. Las líneas de la membrana del eritrocito representa las diferentes configuraciones posibles de la membrana. Imagen tomada de [81].

puesto que una de las principales características morfológicas de la vasculatura son las sucesivas ramificaciones (se detalló acerca de las principales características en la sección 1.1). Este tema ha cobrado relevancia con tres trabajos publicados recientemente donde se aborda la marginación de partículas y células rígidas en redes vasculares [9][52][70]. Sin embargo, estos estudios se realizaron aislando características de estos arreglos, es decir, analizando de forma independiente la influencia de bifurcaciones y convergencias. Con base en lo anterior, la principal motivación del presente trabajo es analizar la influencia de una red vascular (utilizando un modelo in vitro) sobre la marginación de partículas.

2

Antecedentes

El objetivo de este capítulo es mostrar algunos de los trabajos que se utilizaron como referencia para desarrollar esta tesis, así como mostrar un panorama general de los enfoques utilizados para comprender el fenómeno de marginación.

2.1 Análisis de la marginación de micropartículas en la microvasculatura utilizando un modelo in vivo

Un estudio realizado recientemente [74], muestra que es posible observar el efecto de la marginación de micropartículas en vasos sanguíneos de la microvasculatura del músculo cremáster de ratón. Como parte de la metodología implementada, se realizaron dos cirugías al modelo animal. En primer lugar se realizó la canulación de la vena yugular, esto con el objetivo de administrar de manera sistémica a las partículas, garantizando la distribución por todo el torrente sanguíneo. Posteriormente, se realizó la apertura del músculo cremáster, el cual dadas sus características físicas como lo son la alta transparencia y un delgado grosor ($\approx 200 \mu\text{m}$) lo hacen un gran candidato para observar la vasculatura a través del microscopio. En la figura 2.1 se puede visualizar una imagen representativa de la vasculatura del cremáster de ratón. Para ambas cirugías se siguió el protocolo implementado por [22]. Para este trabajo se administraron partículas esféricas fluorescentes de $1 \mu\text{m}$ de diámetro y se analizó su distribución en arteriolas desde 10 a $40 \mu\text{m}$ de diámetro. Después de la realización de ambas cirugías, se colocó al ratón en la platina del microscopio para la realización de los experimentos (ver fig. 2.2) donde se grabaron videos en fluorescencia con la ayuda de una cámara rápida (la cual estaba montada

2.1. Análisis de la marginación de micropartículas en la microvasculatura utilizando un modelo in vivo

16

en

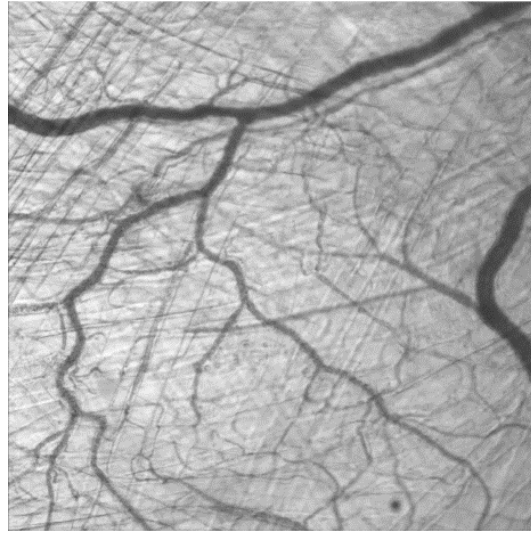


Figura 2.1: Vasculatura del músculo cremáster de ratón. Fotografía tomada a una magnificación de 10X.

el microscopio). Los resultados del presente estudio arrojaron que la marginación de partículas prevalecía en vasos de hasta $16\ \mu\text{m}$ de diámetro, mientras que para diámetros inferiores se encontró una distribución uniforme de las partículas. En la figura 2.3 se muestra uno de los resultados representativos. Se puede visualizar con bastante claridad (de acuerdo al mapa de colores) que las partículas se encuentran ubicadas de forma preferencial cerca de las paredes, es decir, están marginadas. Una de las aportaciones de este trabajo es el umbral reportado para la marginación ($\geq 16\ \mu\text{m}$) y la evidencia de este fenómeno en bifurcaciones de un modelo in vivo. Además de lo anterior, también se cuantificaron las velocidades en los distintos vasos sanguíneos.

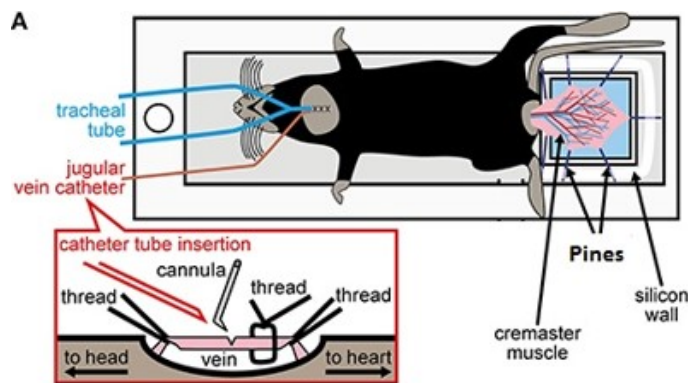


Figura 2.2: Metodología empleada para la administración de partículas al torrente sanguíneo así como la visualización de la vasculatura en el microscopio.

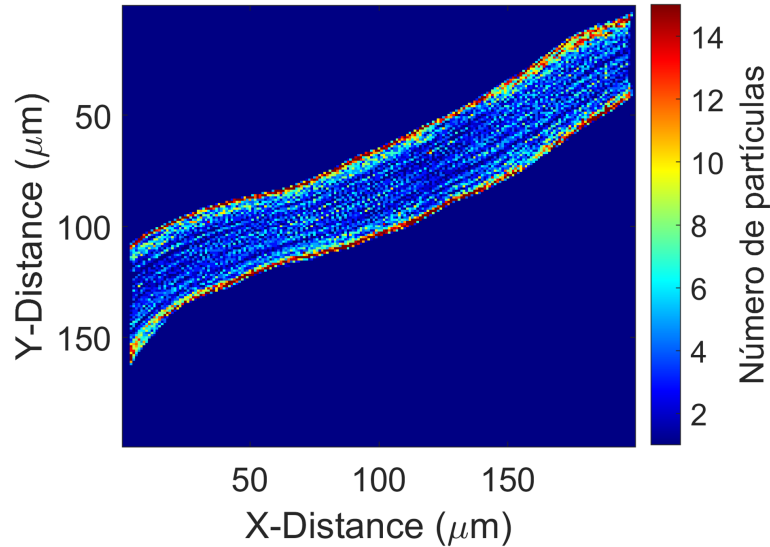


Figura 2.3: Mapa de colores de la distribución de partículas en una arteriola de $30 \mu\text{m}$.

2.2 Antimarginación de micropartículas en convergencias

En el 2017 Bacher y colaboradores estudiaron la distribución de partículas esféricas de $3 \mu\text{m}$ de diámetro en confluencias a través de simulaciones computacionales [9]. Sus estudios tomaron como referencia trabajos previos, los cuales reportaban una diferencia significativa en la concentración de plaquetas en arteriolas con respecto a las vénulas (mayor concentración del lado arteriolar) [79]. Para elucidar lo anterior, su configuración experimental modelaba una convergencia, la cual se puede observar en la figura 2.4. Asimismo, los números en conjunto con las letras indican las zonas de análisis. Las condiciones iniciales de la simulación (método lattice Boltzmann) presentaban una distribución de partículas ya marginada con base en simulaciones realizadas por separado en canales rectos. En la figura 2.5 se pueden observar uno de sus resultados para el análisis en la confluencia, en donde se muestra con bastante claridad la distribución de glóbulos rojos de acuerdo a la escala de colores. Los eritrocitos se distribuyen uniformemente en el canal, a excepción de las paredes (capa libre de células) y en el centro del canal (representado con '0' en el eje Y). Esta capa libre de células central ya había sido reportada previamente por [77]. Asimismo, esta zona contiene una gran cantidad de partículas (ver fig. 2.5B) por lo que el flujo de partículas a través de convergencias lleva a una redistribución, es decir, pasan de estar marginadas (antes de entrar a la confluencia) a viajar en el centro

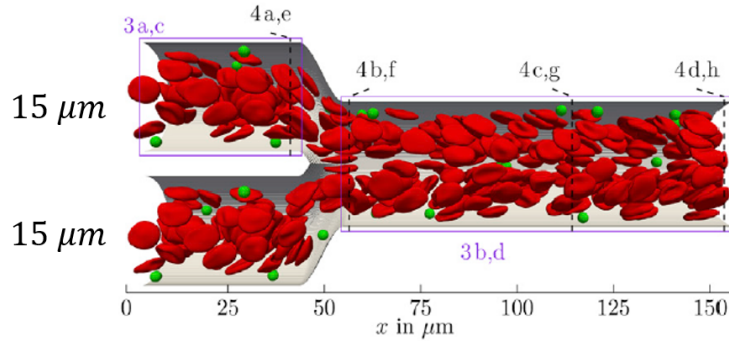


Figura 2.4: Sistema modelado para realizar las simulaciones, la convergencia tiene un diámetro de $18 \mu\text{m}$.

del canal (fenómeno conocido como antimarginación). Adicionalmente, analizaron la estabilidad de la capa libre de células central, encontrando que persistía hasta $100 \mu\text{m}$ posterior al vértice de la confluencia. De igual manera, calcularon el coeficiente de dispersión tanto de los glóbulos rojos, como para las partículas en esta zona, obteniendo un valor de $D_{RBCs} = 28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ y $D_{\mu p} = 25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Con base en estos valores, calcularon que la distancia requerida para que las partículas vuelvan a marginarse es de $\approx 5 \text{ mm}$ por lo que al comparar este valor con la distancia típica entre convergencias sucesivas ($\approx 1 \text{ mm}$) concluyen que la marginación no se vuelve a recuperar, lo que explicaría las observaciones realizadas *in vivo*, las cuales reportan que la marginación en la zona venular es menor en comparación con la arteriolar. Además de las simulaciones, también realizaron algunos experimentos *in vivo*, con la intención de mostrar evidencia que lo encontrado en sus simulaciones prevalecía. Sin embargo, debido a la complejidad del modelo experimental, solamente reportaron la evidencia de la antimarginación en las convergencias, dejando de lado la evidencia de la formación de la capa libre de células central.

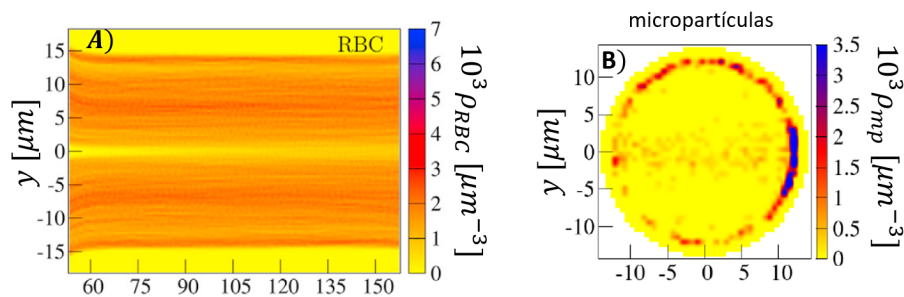


Figura 2.5: Distribución de glóbulos rojos en la confluencia (A) y de micropartículas (B) a una distancia de $60 \mu\text{m}$ después del vértice de la confluencia. Imagen tomada de [9].

2.3 Justificación e hipótesis

Con base en lo mostrado en los antecedentes, se conoce que la marginación de partículas esféricas (1-3 μm de diámetro) se lleva a cabo en modelos de bifurcaciones así como en canales rectos individuales. Se ha encontrado que las bifurcaciones, debido a efectos geométricos parecen contribuir de forma positiva a la marginación. Por otro lado, los estudios realizados en modelos de convergencias sugieren que estas juegan un papel adverso, disminuyendo (antimarginando) la concentración de partículas cerca de las paredes, redistribuyéndolas hacia el centro del canal. Sin embargo, pese a que existe evidencia usando diferentes modelos [9][52][54][70][77][78], el estudio de la marginación en redes vasculares completas (sin considerar de forma aislada el efecto de bifurcaciones y/o convergencias) no ha sido reportado. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo plantea la siguiente hipótesis: *Las partículas en el flujo sanguíneo son segregadas hacia la periferia de los vasos, sin embargo, la presencia de bifurcaciones favorece esta distribución promoviendo un incremento en la concentración de partículas cerca de las paredes, mientras que las confluencias generan una redistribución de las partículas hacia el centro de los canales lo cual disminuye la cantidad de partículas marginadas.* Con base en lo anterior, se identificará los efectos de una red vascular (modelada como una red de microcanales) sobre la marginación de partículas.

2.3.1 Objetivo general

Identificar los efectos de una red de microcanales sobre la marginación de micropartículas.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la capa libre de células para determinar la zona de marginación de las partículas.
2. Caracterizar la dinámica de las partículas en una suspensión de glóbulos rojos.
3. Cuantificar la distribución lateral de partículas en la red de microcanales.

3

Materiales y métodos

3.1 Red de microcanales para el estudio de la interacción de micropartículas con glóbulos rojos

El diseño del microdispositivo tiene como objetivo modelar geoméricamente una red vascular, para lo cual se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: una distancia característica entre las ramificaciones de los canales así como la tendencia en la variación del ancho de los canales tal y como ocurre *in vivo*. Adicionalmente, el diseño se basó en el trabajo realizado por Bento y colaboradores [8].

3.1.1 Fabricación del dispositivo

El diseño del dispositivo se realizó en el software AutoCad 2020 (licencia de estudiante), el cual se envió para la impresión de la fotomáscara en una compañía especializada en Estados Unidos (Cad Art Services). A partir de la fotomáscara (ver fig. 3.1A) se prosiguió (ver fig. 3.1B) a la fabricación del diseño para lo cual se utilizaron las técnicas de fotolitografía y litografía suave. La primera técnica se utilizó para elaborar el molde maestro y la segunda para fabricar el dispositivo de PDMS. Ambas técnicas fueron realizadas en cuarto limpio, ya que dadas las dimensiones de las estructuras del dispositivo cualquier partícula de polvo puede ocasionar obstrucciones de los canales.

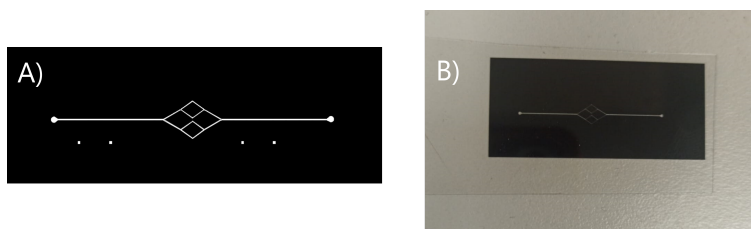


Figura 3.1: Diseño (A) e impresión de la fotomáscara (B). Las zonas de color blanco indican la estructura del dispositivo, es decir, aquellas que se van a polimerizar en el molde maestro acorde a la fotoresina utilizada (SU-8 negativa).

3.1.1.1. Fotolitografía

La técnica de fotolitografía es usada para la fabricación del molde maestro. Este proceso se muestra esquematizado en la figura 3.2. A partir de lo anterior, como sustrato se utilizaron obleas de silicio de aproximadamente 12 cm de diámetro (University Wafers) y en conjunto con la fotomáscara (ver fig. 3.1B). A partir del siguiente protocolo se obtiene el molde maestro, dejando en claro que, posterior a un calentamiento de la oblea (independientemente de la temperatura) es necesario esperar un tiempo suficiente para que se enfríe y poder manejarla sin problema:

1. Limpieza de las obleas de silicio

- a) En un vaso de precipitado se colocan las obleas necesarias y posteriormente se le agrega agua desionizada con jabón (para limpieza de vidrios), el cual se coloca en un sonicador (10 minutos) para remover las impurezas de la oblea.
- b) Una vez transcurridos los 10 minutos se retira el jabón, reemplazando por agua desionizada limpia, posteriormente, se vuelve a colocar el vaso de precipitado en el sonicador para garantizar que el jabón se retiró por completo (10 minutos). Por último, para el secado de las obleas es necesario colocarlas en una plancha de calentamiento a 120 °C durante 20 minutos.

2. Colocación de la resina en la oblea

- a) Para la fabricación del molde se utilizó una fotoresina negativa (SU-8). Posterior al secado de la oblea, esta se coloca en un spinner de la forma más centrada posible. Después, se le agrega aproximadamente de 2-3 ml de resina en el centro de la oblea. El spinner realizará una prueba para la verificación visual del centrado. En caso de que la oblea esté mal colocada se vuelve a ubicar en el centro del spinner.

- b)* El factor que determina la altura del dispositivo es la velocidad de giro del spinner. Para fines de este proyecto, se utilizó una velocidad de 2000 RPM, la cual según la hoja de datos de la resina nos garantiza obtener una altura uniforme de 24 μm .

3. Pre-Cocido

- a)* Este procedimiento asegura evaporar los solventes de la resina, para lo cual es necesario colocar la oblea en la plancha de calentamiento a 95 °C durante 15 minutos.

4. Exposición a UV

- a)* Antes de realizar la exposición a UV se necesita colocar la fotomáscara (con la cara impresa del diseño) sobre la oblea (para que estén en contacto ambas superficies).
- b)* Exponer la oblea en la cabina de luz UV durante un minuto.
- c)* Dada la polaridad de la resina (resina negativa), la luz UV solo incide en las partes que se encuentran los canales (debido a su color transparente) realizando de esa manera la respectiva polimerización de la resina para formar el molde.

5. Post-Cocido

- a)* Previo a realizar el revelado, es necesario volver a colocar la oblea en la plancha a 95 °C durante 15 minutos, lo que garantiza una mayor adhesión del área polimerizada en la oblea.

6. Revelado del dispositivo

- a)* Este paso es uno de los más críticos en la fabricación del molde maestro, por lo que hay que tener un mayor cuidado al revelar el diseño. Se sujeta la oblea con unas pinzas especiales para posteriormente sumergirla cuidadosamente en el revelador (SU-8 Developer) por periodos de tiempo cortos (alrededor de 5 segundos). Después del primer periodo es necesario secar con nitrógeno para observar como se va retirando el exceso de resina no polimerizada.
- b)* Repetir este proceso hasta que no se observen restos de resina sobre la oblea. Se recomienda observar la oblea en un estereoscopio para corroborar que la oblea ya no contenga resina no polimerizada. Se debe tener cuidado de no realizar un sobre-revelado, ya que esto ocasionaría que el revelador se lleve el diseño de la oblea teniendo que volver a repetir los procesos anteriores.

7. Cocido final

- a) Para garantizar una firme adhesión del diseño a la oblea, es necesario realizar nuevamente un calentamiento de la oblea, el cual tiene que realizarse a una temperatura mayor a la cual se realizará la fabricación del PDMS. Para fines de este trabajo, el cocido final se realizó a 140 °C durante 30 minutos.

8. Tratado de la oblea con silano

- a) Para garantizar que nuestro molde maestro perdure en función del número de réplicas, es necesario tratarlo con silano (Clorotrimetilsilano SIGMA-ALDRICH). Este procedimiento se tiene que realizar en la campana de flujo laminar. Como primer paso, es necesario recubrir el perímetro de la oblea con aluminio, para garantizar que el silano actúe únicamente sobre nuestro diseño.
- b) Posteriormente, se colocan 2 gotas de silano sobre un recipiente acorde al volumen utilizado, para después colocar por encima del recipiente nuestro molde maestro.
- c) Dada la alta volatilidad del silano, simplemente hay que dejar incubando durante 30 minutos (con la campana encendida). Con este tiempo se garantiza la uniformidad del silano sobre el molde.

La realización a detalle del protocolo previamente descrito nos garantiza que nuestro molde maestro puede ser utilizado para realizar un gran número de réplicas, siempre y cuando se conserve evitando que se contamine con partículas de polvo (para evitar el riesgo de la obstrucción de canales).

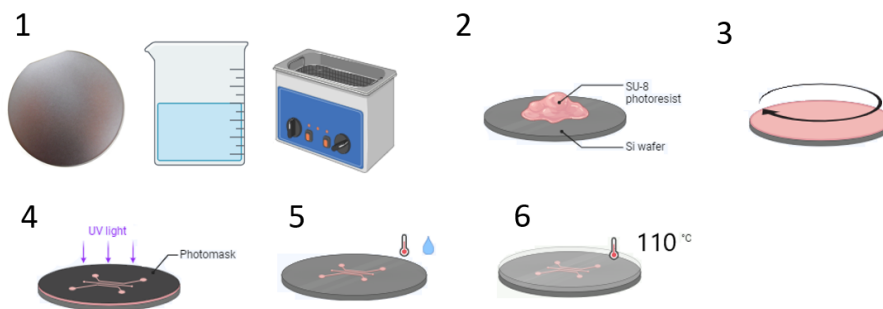


Figura 3.2: Esquema de las etapas descritas previamente para la realización del molde maestro. Se esquematizaron solo algunos pasos. El diseño que se muestra en la imagen es representativo de la técnica (no corresponde al diseño usado para este trabajo, sin embargo, este se muestra en la figura 3.1A). Imagen tomada y modificada de la siguiente página web www.biorender.com.

3.1.1.2. Fabricación de réplicas de PDMS

Para fabricar las réplicas a utilizar en los experimentos, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Preparación de la solución PDMS - catalizador

a) Para garantizar que el tiempo de polimerización entre el PDMS y el catalizador no sea muy prolongado, se utilizó una relación PDMS-Catalizador 10-1. Colocar en un recipiente 3 gramos de PDMS y 0.3 gramos de catalizador. Después, se mezclan vigorosamente dichos componentes para garantizar una uniformidad entre los dos ingredientes.

2. Eliminar el exceso de burbujas como resultado de la mezcla PDMS - catalizador

- a)* Colocar el recipiente de la mezcla en una bomba de vacío durante aproximadamente 20 minutos (el tiempo puede variar en función del volumen de la mezcla).
- b)* Una vez eliminadas las burbujas vaciar la mezcla en el molde, garantizando que cubra perfectamente el área cubierta por el aluminio.

3. Polimerización del PDMS: Fabricación de la réplica

- a)* Colocar el molde en el horno a 120 °C durante 20 minutos, lo cual garantiza la polimerización del PDMS. Posteriormente, dejar enfriar el molde aproximadamente 10 minutos.
- b)* Una vez enfriado el molde, retirar cuidadosamente la réplica de la oblea con la ayuda de un bisturí.

4. Preparación de la réplica para la realización del experimento

- a)* Con la ayuda de un sacabocado de 1 mm de diámetro se perfora la réplica en las marcas de las entradas y salidas respectivamente.
- b)* Para garantizar que nuestra réplica no se contamine, se recomienda realizar lavados con alcohol isopropílico y posteriormente recubrirla con cinta scotch para protegerla del polvo.

5. Sellado de la réplica y colocación de mangueras

- a) Para garantizar que la suspensión fluya de forma adecuada a través del dispositivo, es necesario sellar la réplica de PDMS a un sustrato, en este caso un portaobjetos. El sellado se realiza mediante una técnica conocida como "tratamiento corona", la cual, con la ayuda de un sellador de plasma de oxígeno que modifica la superficie del PDMS (de hidrofóbica pasa a hidrofílica) dejando expuestos grupos silanol (Si-OH). Estos grupos al reaccionar con la superficie del vidrio generan enlaces Si-O-Si, dando lugar a un sellado irreversible entre ambas superficies.
- b) Para garantizar una mayor adhesión entre ambas superficies, colocar el dispositivo sellado en la plancha de calentamiento a 80 °C durante 5 minutos.

6. Colocación de las mangueras al dispositivo

- a) Dado que solamente contamos con una entrada y una salida, únicamente se necesitará cortar 2 pedazos de manguera de 22 cm cada uno.
- b) Con la ayuda del estereoscopio proceder a colocar las mangueras en la entrada y salida respectivamente.

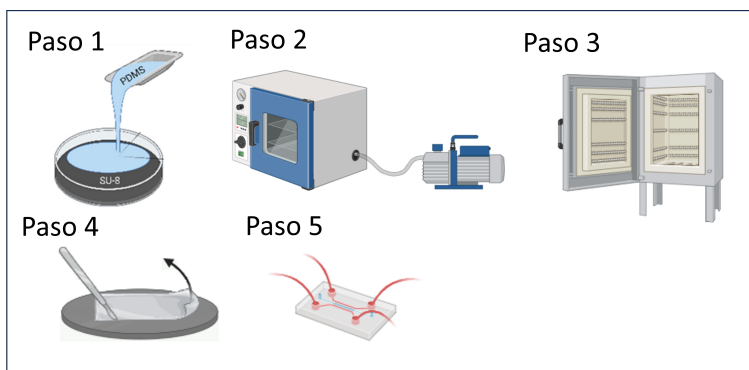


Figura 3.3: Fabricación de las réplicas de PDMS a partir del molde maestro.

3.2 Protocolo experimental

El presente trabajo se realizó utilizando muestras de sangre de donadores voluntarios, para lo cual se siguieron los lineamientos de la declaración de Helsinki. Además, a cada uno de los donadores se les entregó una carta de consentimiento en donde se explicaban los siguientes puntos: el uso que se le iba a dar a la muestra donada, frecuencia de la donación, volumen de

sangre requerida, así como los posibles riesgos. Además de lo explicado anteriormente, y con el objetivo de disminuir la variabilidad entre los donantes, se utilizaron los siguientes criterios de exclusión: El rango de edades de los donadores era de 24 - 30 años, sexo masculino, no tener presente ninguna patología, sin sobrepeso.

3.2.1 Preparación de la muestra

La toma de muestra de los donadores se realizó gracias a la ayuda de una técnico especializada en el área (Lic. Karen Garza), para lo cual se extrajo un volumen de sangre de 5 ml para posteriormente introducirlo a un tubo vacutainer con EDTA (BD Vacutainer K2 EDTA) y evitar la coagulación de la sangre (ver fig. 3.4A). Después se realizó una agitación de la muestra durante 2 minutos con el objetivo de homogenizar el anticoagulante en el volumen de sangre. Se prosiguió a centrifugar la muestra para separarla en sus diferentes componentes (ver fig. 3.4B). Después, con una pipeta se retiró el sobrenadante (volumen de plasma, células blancas y plaquetas). Para garantizar que se haya extraído correctamente el sobrenadante, se realizaron 3 lavados con PBS. Por último, para evitar que las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos se vean afectadas, la muestra se utilizó dentro de un margen de 4 horas posterior a la extracción de la sangre [49].

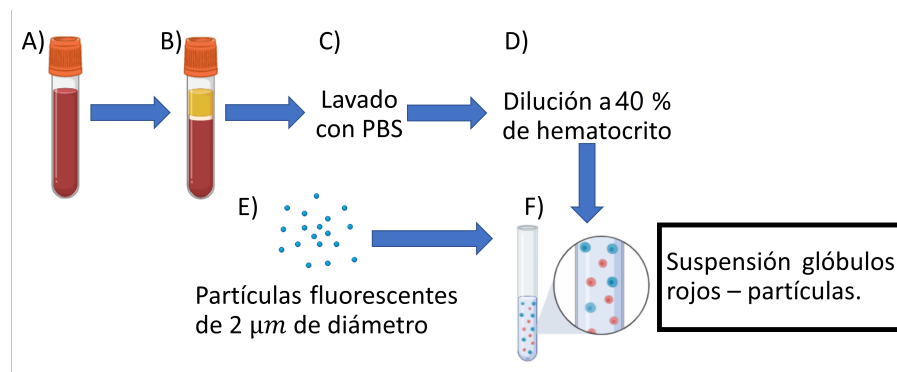


Figura 3.4: Protocolo para la toma de la muestra usada en los experimentos. A) Almacenamiento de la sangre en el tubo vacutainer, B) separación entre los distintos componentes de la muestra (debido al centrifugado), C) se repiten los pasos A y B por duplicado realizando lavados con PBS, D) previo a la realización del experimento se realiza una dilución (con PBS) de la sangre, E) se toma un volumen de partículas y F) se le agrega el volumen de partículas a la suspensión de glóbulos rojos.

3.2.2 Condiciones experimentales

Una vez realizadas y selladas las réplicas de PDMS se colocó el dispositivo en la platina del microscopio (Olympus BX51) para la realización del experimento (ver fig. 3.5). Los experimentos se realizaron con las siguientes consideraciones:

1. Velocidad de flujo $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$.
2. Temperatura $23 \text{ }^\circ\text{C}$.
3. Resolución espacial: $0.587 \mu\text{m}/\text{pixel}$ (Objetivo 10X).
4. Tamaño de imagen: $870 \times 870 \mu\text{m}$ (512×512 pixeles).
5. Adquisición de videos (5445 frames) - resolución temporal:
 - a) Videos en campo claro para determinar la capa libre de células: 2000 FPS.
 - b) Videos en fluorescencia para analizar la dinámica de partículas: 250 FPS.



Figura 3.5: Montaje experimental. En la parte izquierda de la figura se observa una bomba de jeringa, el microscopio y la fluorescencia encendida.

3.2.3 Análisis de imágenes

El análisis de los videos se realizó OFFLINE en el software MATLAB. Cada video requiere de un espacio de memoria de 1.3 GB, por lo que el optimizar las rutinas de análisis es sumamente indispensable.

3.2.3.1. Análisis de los videos en campo claro

Los videos en campo claro fueron grabados con el objetivo de determinar el ancho de la capa libre de células (zona de marginación de las partículas). Debido a la alta concentración de células utilizada en los experimentos (ver fig. 3.6(1)), es necesario utilizar una alta resolución temporal para cuantificar las variaciones del nivel de gris de las imágenes. El algoritmo desarrollado en matlab sigue la metodología detallada en la figura 3.6. A continuación se explican los pasos utilizados.

1. Apilamiento de imágenes. Posterior a la grabación del video a campo claro, la cuantificación de la capa libre de células se realizó midiendo las variaciones del nivel de gris de la pila de imágenes (2000 imágenes), donde cada imagen está desfasada temporalmente 1/2000 segundos.
2. Desviación estándar y mediana de los niveles de gris. La capa libre de células nos da una aproximación de la distribución de los glóbulos rojos en función del ancho del canal. Sin embargo, dada la alta cantidad de glóbulos rojos (ver fig. 3.6(1)) es necesario cuantificar la variación temporal de los niveles de gris de cada uno de los pixeles que conforman la imagen, razón por la cual se eligió utilizar la desviación estándar (medida de dispersión). Aplicando esta métrica a la pila de imágenes nos dará como resultado una imagen (ver fig. 3.6(4)) donde aquellas zonas de la imagen con mayor variación temporal del nivel de gris serán resaltadas con color blanco, mientras que aquellas zonas con poca (o nula) variación serán representados en color negro (imagen de 8 bits, valores de 0 - 255). Por otro lado, para medir con precisión el ancho de la capa libre de células es necesario ubicar las paredes laterales del canal, debido a que la ubicación de estas no varía en función del tiempo, se aplicó la mediana de los niveles de gris de la pila de imágenes, dando como resultado la imagen desplegada en la figura 3.6(5).

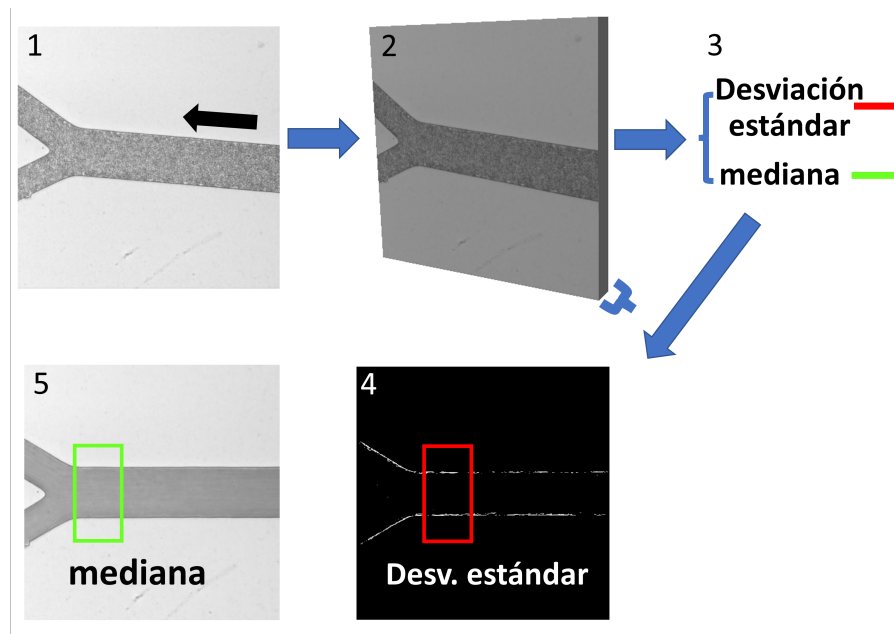


Figura 3.6: Diagrama de flujo de los pasos utilizados para el análisis de la capa libre de células. 1) Imagen cruda correspondiente a un video en campo claro tomado a 2000 FPS. 2) Apilamiento de imágenes (2000 imágenes), donde cada imagen está desfasada $1/2000$ seg. 3) Métricas utilizadas para la proyección Z del apilamiento de imágenes. 4) y 5) corresponden a la imagen resultante para la desviación estándar y la mediana respectivamente.

3. Determinación del ancho de la capa libre de células. Con base en la ubicación de las paredes del canal (otorgado por la imagen de la mediana) y las zonas de mayor variación de los niveles de gris (desviación estándar) se determina una zona de interés para realizar la medición (indicada por los cuadros verde y rojo). Posteriormente se analiza la variación del nivel de gris de cada una de las métricas en función del ancho del canal (de la zona de interés), lo cual nos arroja una gráfica como la de la imagen 3.7 donde a partir de estas curvas se determina el ancho de la capa libre de células (CFL, por sus siglas en inglés) aplicando la siguiente expresión: $CFL = |P_{min} - P_{max}|$, donde los términos representan a la mediana y la desviación estándar respectivamente.

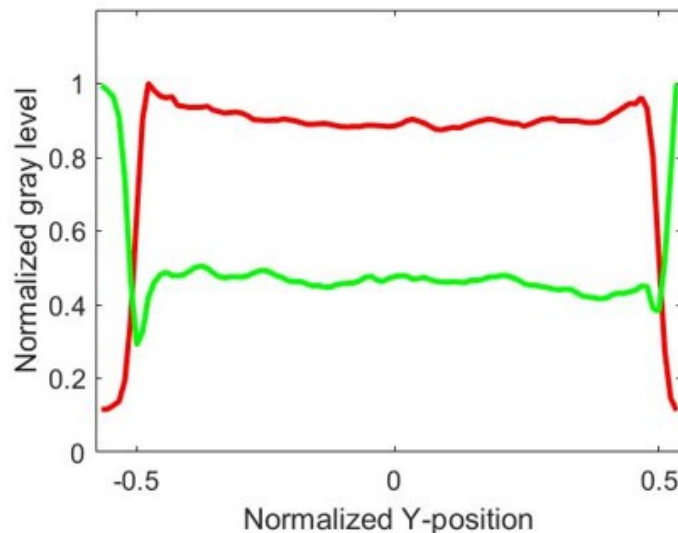


Figura 3.7: Curvas representativas de la medición de la CFL. La curva de color rojo representa la desviación estándar, mientras que la verde indica la mediana.

3.2.3.2. Análisis de los videos en fluorescencia

Los videos tomados en fluorescencia presentan con claridad a las partículas gracias al contraste que tienen con el fondo. A partir de estas imágenes se trabajó para obtener las trayectorias individuales de las partículas. El código desarrollado en MATLAB se basó en el algoritmo de Crocker y Grier [17] y en un algoritmo modificado por [69], el cual se resume a continuación. Para concatenar las posiciones de las partículas entre la imagen tomada en un instante de tiempo t_i y otra imagen en un tiempo posterior t_{i+1} es necesario establecer una relación entre las posiciones de las partículas con base en el desplazamiento promedio de las mismas entre dicho intervalo de tiempo. Cuando no se puede calcular la trayectoria de una partícula, lo que se hace es determinarlo por proximidad entre las dos imágenes. El algoritmo para ligar trayectorias no considera la interacción entre partículas, lo cual es válido para bajas concentraciones como las que se utilizaron en este trabajo. Primero se establece la probabilidad de desplazamiento de la partícula a una distancia σ en el plano en un tiempo τ como se muestra en la ec. 3.1

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

en donde D es un coeficiente de difusión que se puede asociar con los desplazamientos de la partícula en el plano x - y . Para un ensamble similar de N partículas idénticas, la probabilidad

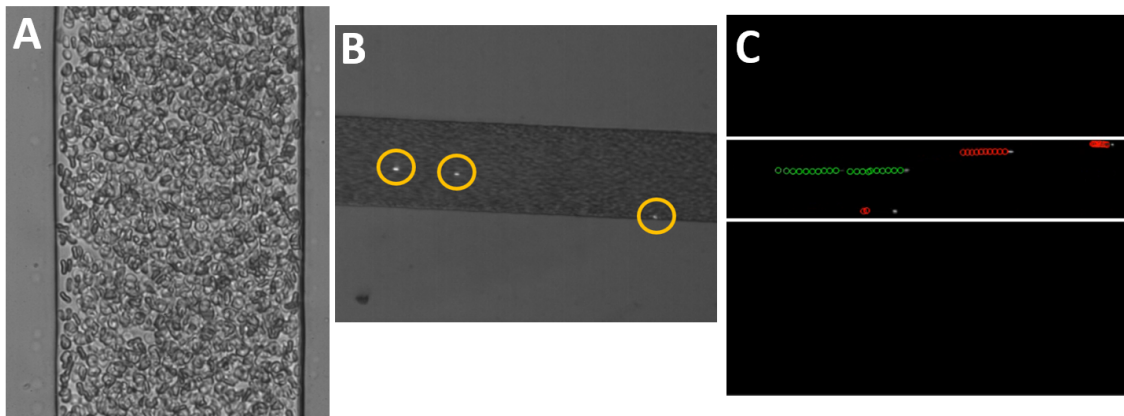


Figura 3.8: Etapas del algoritmo del procesamiento de los videos en fluorescencia. A) Imagen en campo claro a una magnificación de $50\times$, B) Imagen en campo claro a una magnificación de $10\times$ donde se resaltan 3 partículas en un cuadro del video y C) Etapa final del algoritmo, donde se correlacionan temporalmente los centroides de las partículas para el seguimiento de las trayectorias.

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

está dada por la ec. 3.2. Lo más parecido a la asignación de etiquetas o indicadores a partículas es la maximización de $P(\sigma|\tau)$, o la minimización de $\sum_{i=1}^N \sigma_i^2$ que es equivalente. Para reducir la complejidad de asignación de indicadores de partículas se acota la distribución de probabilidad a $\sigma = L$, en donde L es el desplazamiento característico. Por último se hace una adecuación en el programa para cuando las trayectorias de las partículas pudiera confundirse con la trayectoria de otra partícula, en cuyos casos dicha trayectoria se indicará como "perdida" para evitar errores. Posterior a la localización de los centroides de las partículas, se procederá a cuantificar los siguientes parámetros: 1) Distribución de partículas en función del ancho del canal, 2) Perfil de rapidez y 3) desplazamiento cuadrático medio.

3.3 Número de partículas y distribución de rapidez como función del ancho del canal

El resultado computacional de aplicar el algoritmo explicado en la sección anterior es una matriz de 4 columnas, donde las primeras dos columnas corresponden a la posición en X e Y (ambas en μm) de las partículas, la tercera el cuadro en el que aparecen y la última es el ID el

cual es único para cada trayectoria. A partir de esta matriz se cuantifica tanto la distribución de partículas, como la rapidez. La metodología que se siguió para desarrollar el script se detalla a continuación:

1. Distribución de partículas como función del ancho del canal

- a)* Hasta este punto conocemos el número de partículas detectadas, su posición tanto en X como Y, así como el frame en el que aparecen. Con base en esta información, se crea una matriz del mismo tamaño que las imágenes del video (512×512 píxeles). Después se recorre de forma individual las trayectorias de las partículas, y con base en esto y la matriz creada, se usaron contadores en cada pixel de la nueva matriz, donde dichos contadores van incrementando conforme cada partícula vaya pasando por cada pixel.
- b)* Para considerar viable la trayectoria de una partícula, la distancia longitudinal recorrida de la partícula tiene que ser $\geq 100 \mu\text{m}$. Trayectorias que no cumplen este criterio no se considerarán para la distribución de partículas.
- c)* Posteriormente se define la zona de análisis para cuantificar la distribución de partículas, donde esta región tiene que ser la misma utilizada para la medición de la capa libre de células.
- d)* Una vez definida la zona de interés (ROI), esta se segmentará en capas de $2 \mu\text{m}$ de ancho, donde por cada división se contabilizará el número de partículas para así obtener el número de partículas como función del ancho del canal (ver fig. 3.9). En todos los casos se normaliza el ancho de los canales, donde el valor de -0.5 corresponde a la pared izquierda y el valor de 0.5 corresponde a la pared derecha tomando en cuenta una vista en la dirección del flujo.

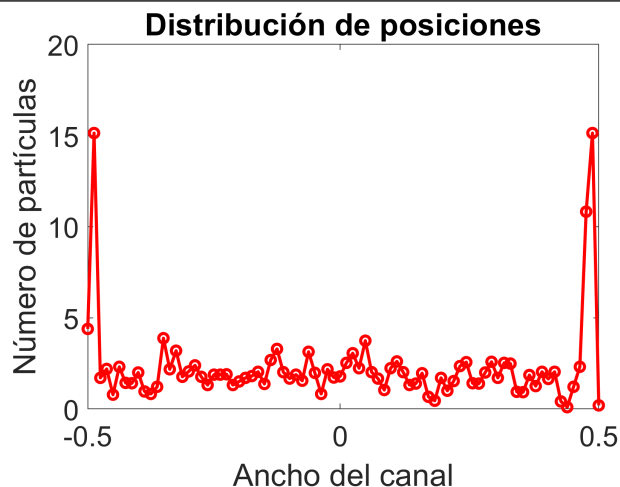


Figura 3.9: Número de partículas como función del ancho normalizado del canal. -0.5 y 0.5 representan las paredes laterales mientras que 0 indica el centro del canal.

2. Distribución de velocidad

a) Teniendo en cuenta la ubicación de los centroides de cada partícula, se tomará el diferencial para las primeras 3 columnas de la matriz de posiciones. Con esto obtenemos los desplazamientos como función del tiempo, es decir, Δx , Δy , $\Delta \tau$ a partir de estos parámetros, y considerando la ecuación para determinar la velocidad $V = distancia \div tiempo$ podemos cuantificar la velocidad de cada partícula como función del tiempo. A partir de esto, para obtener la distribución, se obtiene la

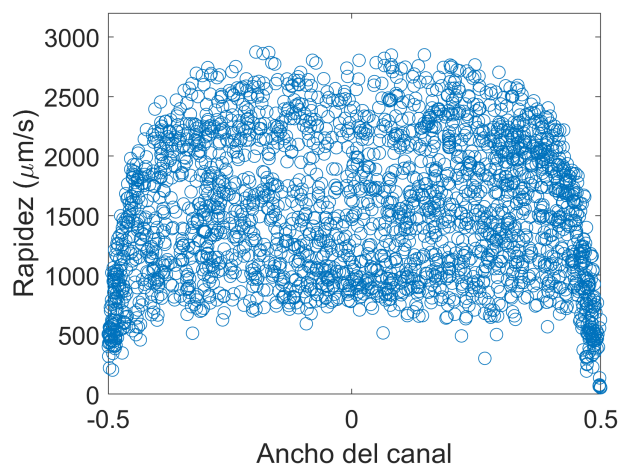


Figura 3.10: Rapidez media de cada partícula como función del ancho del canal. Cada punto de color azul representa una partícula. -0.5 y 0.5 representan las paredes laterales mientras que 0 indica el centro del canal.

velocidad media para cada partícula como función del ancho del canal (ver fig. 3.10).

3.4 Desplazamiento cuadrático medio y coeficiente de dispersión

Para caracterizar la dinámica de las partículas se calcula el desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo. Este parámetro se obtuvo de los valores $\Delta Y(t)$ computados en la sección anterior y utilizando la siguiente expresión: $\Delta Y^2(t) = \langle [y_i(t) - y_i(0)]^2 \rangle$. Evaluar este parámetro proporciona información muy importante sobre las interacciones glóbulos rojos/partículas a distintas escalas temporales, tal y como se muestra en la figura 3.11, donde se observan claramente dos etapas, un régimen subdifusivo ($\tau < 0.1$ segundos) y un comportamiento difusivo ($\tau > 0.1$ segundos). Considerando el tiempo para el cual la dinámica de las partículas es difusivo y retomando la ecuación del desplazamiento cuadrático medio se puede caracterizar el coeficiente de dispersión obteniendo la pendiente de la curva para cada instante de tiempo, cuando la pendiente es igual a 1 se cuantifica el coeficiente utilizando la siguiente expresión $(\Delta Y)^2 = 2Dt^\alpha$, donde $\alpha = 1$ indica una dinámica difusiva.

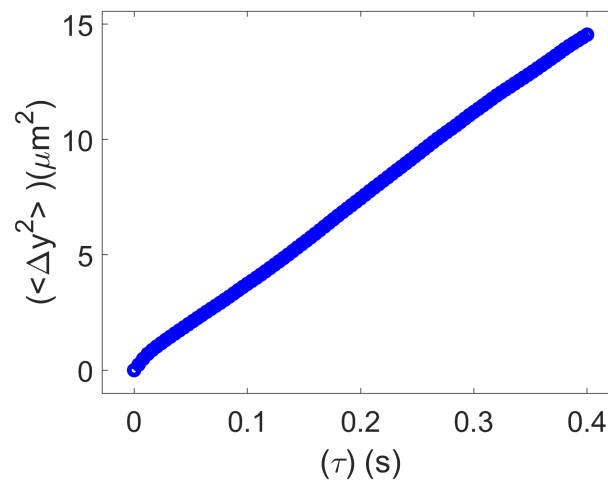


Figura 3.11: Evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio lateral de las partículas.

4

Resultados y discusión

En la presente sección se discutirán los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos realizados en las respectivas zonas de interés. Primero se detallará sobre la fabricación y caracterización de las dimensiones del dispositivo microfluídico. Posteriormente se discutirá acerca de la detección y cuantificación de la capa libre de células y por último, se discutirá tanto de los resultados de la dinámica de las partículas así como la cuantificación del número de partículas marginadas.

4.1 Fabricación y caracterización del dispositivo microfluídico: red de microcanales.

Tanto la fabricación del dispositivo así como la elaboración de las réplicas se detallan en la sección de metodología. En la figura 4.1 se puede observar el diagrama del dispositivo, el cual está caracterizado por tener una entrada y una salida, así como un canal principal cuya longitud es de 1 cm. Posteriormente, este canal se ramifica sucesivamente para formar tanto bifurcaciones (indicado por la llave de color azul) así como confluencias (indicado por la llave de color verde). Asimismo, los recuadros de colores indican las zonas de análisis, las cuales corresponden a las zonas de interés. Después de la fabricación se procedió a caracterizar la altura de los canales para corroborar que las dimensiones coincidieran con las del diseño. En la figura 4.2(A) se muestra un corte transversal correspondiente al canal principal del dispositivo, donde es evidente que existe una gran relación ancho/alto ($24 \mu\text{m}$ de altura uniforme) en todos los canales. Por otro lado, en la figura 4.2(B) se muestra de forma esquematizada cada

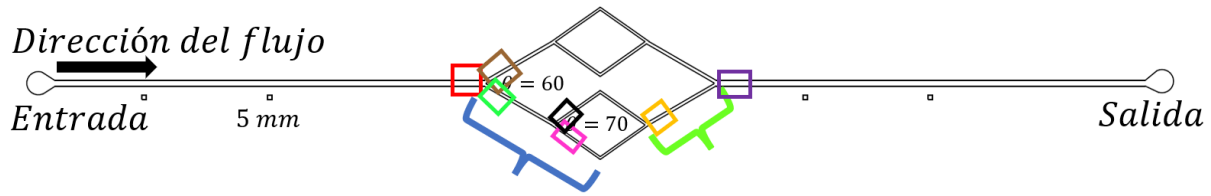


Figura 4.1: Diagrama de la red de microcanales, donde los cuadros indican las zonas analizadas. El color rojo corresponde al canal principal, los de color café y verde indican la primera bifurcación, el color negro y magenta corresponden a la segunda bifurcación. Finalmente, los de color amarillo y morado indican la primera y la segunda convergencia respectivamente.

una de las dimensiones de los canales, es decir, tanto el ancho (W) así como su respectiva longitud (L). Es necesario enfatizar que tanto las dimensiones de los canales así como la velocidad de flujo elegida corresponden a un número de Reynolds $Re \ll 1$ lo cual es representativo de lo que sucede en la microcirculación. Por último, los ángulos elegidos para la red de microcanales corresponden a ángulos típicos de la microvasculatura del cremáster de ratón [52][59]. Por otro lado, la altura elegida para los microcanales nos permite capturar con relativa sencillez la fluorescencia de las partículas que viajan en distintos planos lo que nos permite hacer una descripción más precisa del movimiento de las partículas tanto en el eje Y como a diferentes alturas (eje Z).

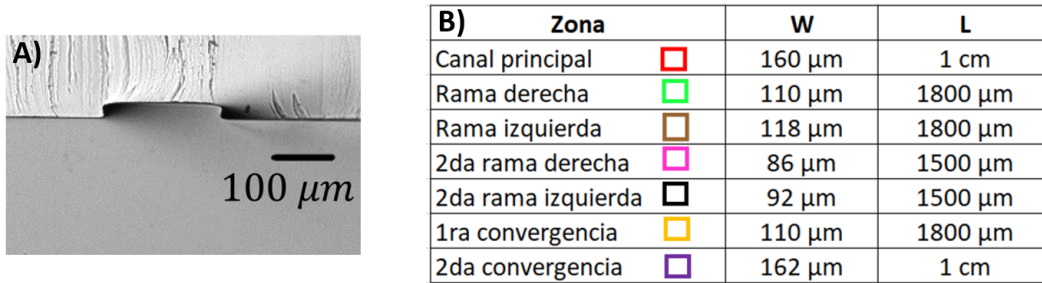


Figura 4.2: A) Sección transversal correspondiente al canal principal (recuadro color rojo en la figura 4.1), B) Ancho (W) y largo (L) de las diferentes zonas de interés.

4.2 Zona de marginación de micropartículas: capa libre de células

La capa libre de células (CFL) conceptualmente está definida como aquella zona(s) de los vasos sanguíneos (o microcanales) donde la concentración de glóbulos rojos es menor (o nula). Dicho esto, la formación de la CFL está relacionada con las propiedades mecánicas de los eritrocitos, es decir, debido a su deformabilidad y la interacción con las paredes estas células tienden a migrar hacia el centro de los vasos dejando en la periferia una zona libre de células rojas. Con base en esto, la formación de una zona libre de células rojas repercute directamente en la resistencia de la sangre, es decir, existe una disminución local de la viscosidad con respecto al centro de los vasos (o canales). Teniendo en cuenta lo anterior, caracterizar esta zona es de gran relevancia biológica. Además la CFL está directamente relacionada con la marginación de partículas, puesto que, una vez alcanzada esta zona las micropartículas no regresan hacia el centro del canal. En la figura 4.3 se muestra la medición de la capa libre de células correspondiente al canal principal, donde se puede observar con bastante claridad la formación de la capa libre de células (diferencia entre la posición del mínimo y máximo de cada curva) en la periferia del canal (-0.5 y 0.5 indican la ubicación de las paredes laterales).

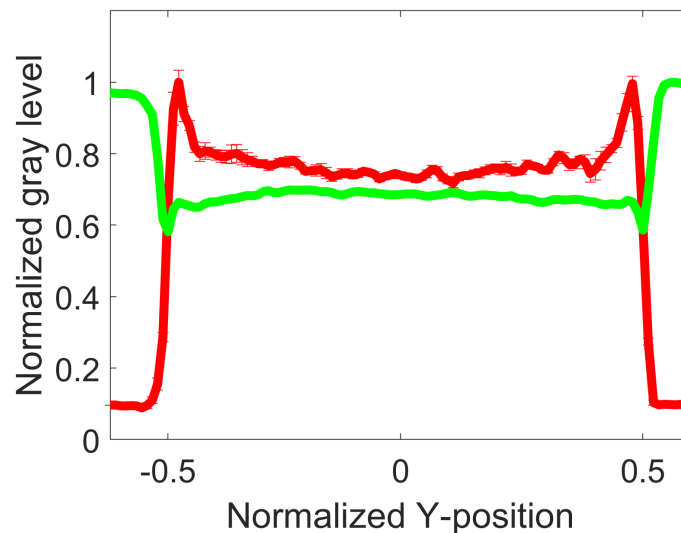


Figura 4.3: Medición de la capa libre de células en el canal principal. La curva de color rojo corresponde a la desviación estándar de los niveles de gris, mientras que la curva de color verde representa la mediana de los niveles de gris del video adquirido.

Al calcular la diferencia entre el punto mínimo de la curva de color verde con respecto al máximo de la curva de color rojo se obtiene un valor de $5 \mu\text{m}$ para cada una de las paredes, es decir, una simetría en la capa libre de células para el canal principal. El valor calculado difiere significativamente respecto a otros trabajos que se realizaron en otras condiciones experimentales [8][12][65]. Estos trabajos se realizaron a números de Reynolds altos, es decir, las fuerzas inerciales juegan un papel importante. Una vez caracterizada la CFL para esta primera zona, en los resultados posteriores se mostrará únicamente el ancho calculado para cada pared, es decir, no se mostrarán las curvas como la mostrada en la figura 4.3.

4.2.1 Variación de la CFL a través de bifurcaciones y confluencias de la red de microcanales

Una vez cuantificada la CFL para el canal principal se procedió a calcular la variación en el ancho tanto en la zona de bifurcaciones así como en las confluencias. En la figura 4.4, se muestran los resultados del ancho de la CFL para la zona de bifurcaciones. Es necesario enfatizar que, para estos resultados se diferencia entre las paredes laterales, es decir, al hacer referencia a la pared interna se refiere a aquella pared que coincide con el vértice de la ramificación, mientras que la pared externa es la opuesta a la interna. Debido a la diferencia en el estrés de corte en las bifurcaciones [5], es de esperarse que se tenga una asimetría en la formación de la CFL para cada una de las paredes, donde la pared externa mantiene el mismo ancho que la calculada para el canal principal mientras que en la interna existe una disminución abrupta de la CFL con respecto a la calculada para el canal que lo precede. Una de las razones de esta disminución es puramente geométrica, es decir, debido a que la CFL está previamente desarrollada (en el canal principal) al momento de entrar en la bifurcación la pared interna por efecto geométrico coincide con el centro del canal que lo precede, es decir, no hay ninguna CFL previamente formada en esta zona. Aunado a lo anterior, la longitud del área analizada (recuadros de colores) es de $\text{ROI} = 100 \mu\text{m} \times W$ (ancho del canal) por lo que la zona no es lo suficientemente grande para caracterizar el desarrollo del ancho de la CFL en la pared interna. Sin embargo, acorde a lo reportado existe evidencia sobre la recuperación de la simetría en ambas paredes como función de la distancia con respecto a la entrada de la bifurcación [59]. La razón de lo anterior es debido al acumulamiento de glóbulos rojos en el vértice de la bifurcación, lo cual conllevará a que tanto las interacciones hidrodinámicas entre estas células así como la fuerza de elevación generada por la interacción

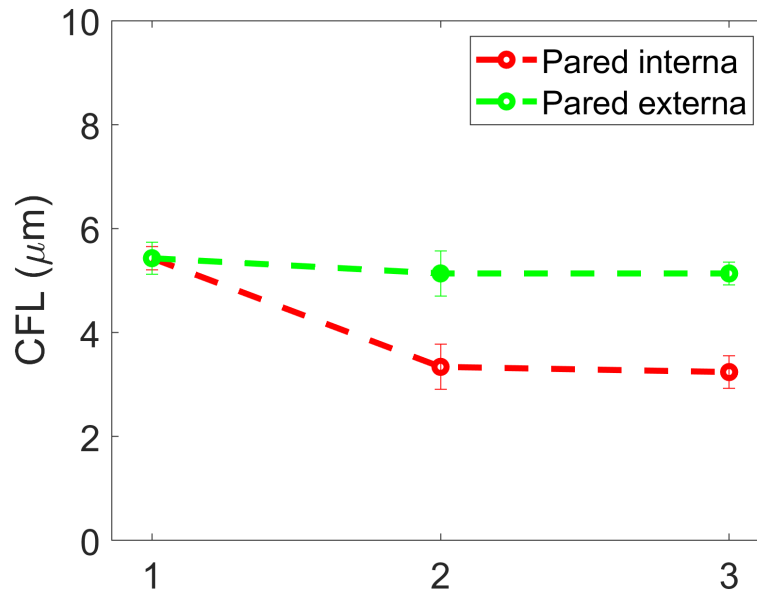


Figura 4.4: Variación del ancho de la capa libre de células en la zona de bifurcaciones del dispositivo.

glóbulo rojo - pared contribuyan a la evolución paulatina de la formación de la CFL en la pared interna de la bifurcación. Posteriormente, se puede observar como en la segunda bifurcación (zona 3) se mantiene la misma tendencia que en la bifurcación previa, es decir, aumenta la asimetría en el ancho de la CFL entre ambas paredes lo cual nuevamente es atribuido tanto a la geometría empleada como a la zona de análisis (correspondiente al inicio de la 2da bifurcación). Teniendo en cuenta estos resultados para la zona de bifurcaciones se puede conjeturar que, debido a efectos geométricos, la CFL en las bifurcaciones es asimétrica y con base en esto la distancia entre bifurcaciones es de gran relevancia para el desarrollo de la recuperación de esta simetría. Por otro lado, en la figura 4.5 se muestran los resultados para la CFL en la zona de convergencias (indicado por los números 4 y 5) los cuales corresponden a los puntos de color negro y azul en la gráfica. A diferencia de la zona de bifurcaciones se puede observar una recuperación paulatina en el ancho de la CFL de la pared interna, donde pese a que las distancias entre ramificaciones es similar a la de la zona anterior, el efecto geométrico juega a 'favor' en el contexto de la simetría entre ambas paredes, es decir, debido a que los canales que preceden a la zona de confluencias tienen ya desarrollada la CFL no existe una irrupción geométrica al momento de entrar a las confluencias. Además de la recuperación de la simetría en la CFL se puede observar otro efecto relevante, es decir, la aparición de una CFL localizada en el centro de las convergencias (ver fig. 4.5 indicada por los puntos de color azul) cuya formación es el resultado de la convergencia de los flujos hacia estas zonas debido a la geometría de la red

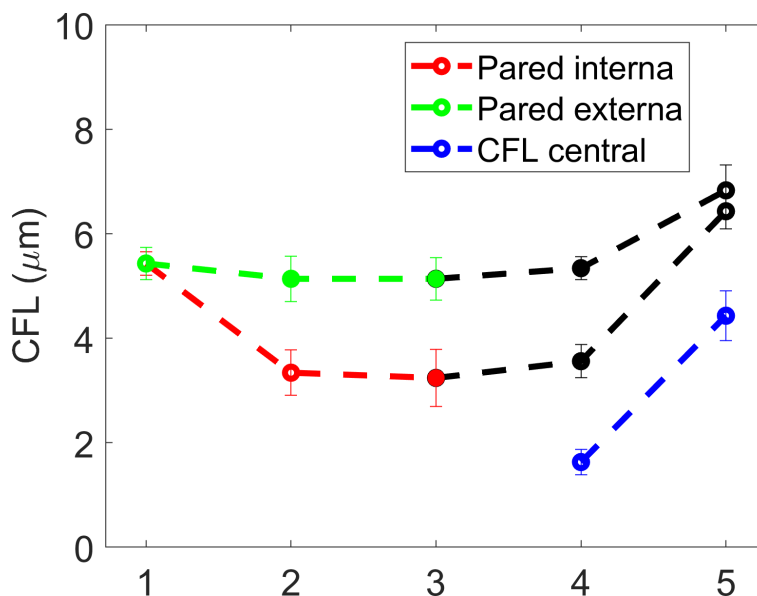


Figura 4.5: Variación del ancho de la capa libre de células en la zona de convergencias del dispositivo. Los símbolos en negro indican la continuación de la pared interna y externa.

de microcanales. De igual manera, existe un incremento gradual en el ancho de esta CFL, teniendo una medición de $1.8 \mu\text{m}$ para la primera convergencia hasta llegar a $4.3 \mu\text{m}$ en la segunda confluencia, siendo esta última medición comparable al ancho calculado para las paredes laterales. En la figura 4.6 se muestra el trazo tanto de la desviación estándar así como el de la mediana correspondiente a la medición de la CFL para la segunda convergencia. Es evidente la formación de la CFL central así como la de las paredes laterales. Por otro lado, a manera de comparación ya se ha reportado la presencia de esta CFL central en geometrías más sencillas, donde se ha demostrado que la formación de esta CFL depende de la geometría de los microcanales, el hematocrito y de las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos [72][77][78]. De igual manera, es importante dejar en claro que los estudios mencionados anteriormente corresponden a modelos tanto computacionales así como in vitro, siendo prácticamente nula la evidencia de esta CFL en modelos in vivo, por lo que es necesario realizar estudios en este sentido para corroborar su existencia. Por último, los resultados obtenidos para la formación de la CFL sugieren que el transporte de partículas debería de aumentar en la pared interna de las bifurcaciones y verse disminuido en la pared externa (debido al acumulación/reducción de glóbulos rojos respectivamente).

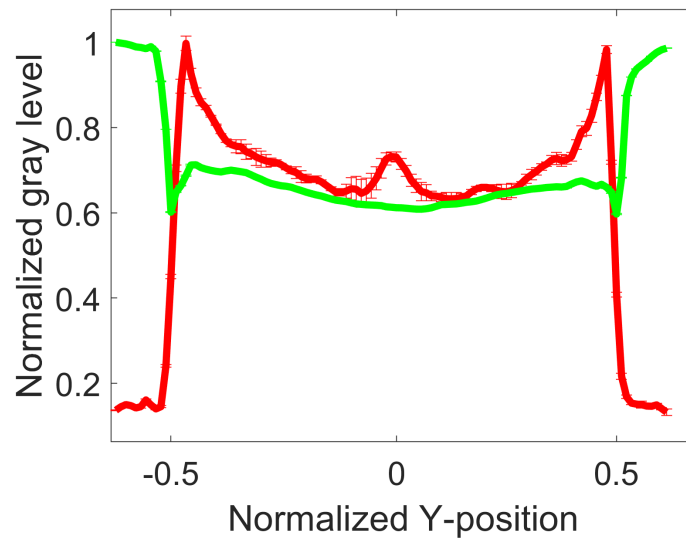


Figura 4.6: Medición de la CFL en la segunda convergencia. La curva de color rojo corresponde a la desviación estándar de los niveles de gris, mientras que la curva de color verde representa la mediana.

4.3 Caracterización de la dinámica de partículas en una suspensión glóbulos rojos/partículas

Como primer paso en el análisis de la dinámica de las partículas se realizó una comparación entre una suspensión glóbulos rojos/partículas con respecto a una suspensión sin glóbulos rojos. De esta manera, se resalta de forma explícita la influencia de los eritrocitos sobre la dinámica de las partículas.

4.3.1 Influencia de los glóbulos rojos sobre la dinámica de las partículas: shear-induced diffusion

En secciones previas se ha discutido acerca de la complejidad tanto del movimiento como de la dinámica de los eritrocitos, así como de los efectos que llevan a cabo en el flujo y la influencia que tienen sobre otros componentes de la suspensión. Dado lo anterior, a manera de experimento control, en la figura 4.7 se muestra una comparativa entre la componente de velocidad perpendicular de las partículas (V_y) en una suspensión sin eritrocitos (ver fig. 4.7A) y en una suspensión a un hematocrito del 40 % (ver fig. 4.7B). Es necesario dejar en claro que los valores mostrados en las gráficas son promediados para cada partícula. Asimismo,

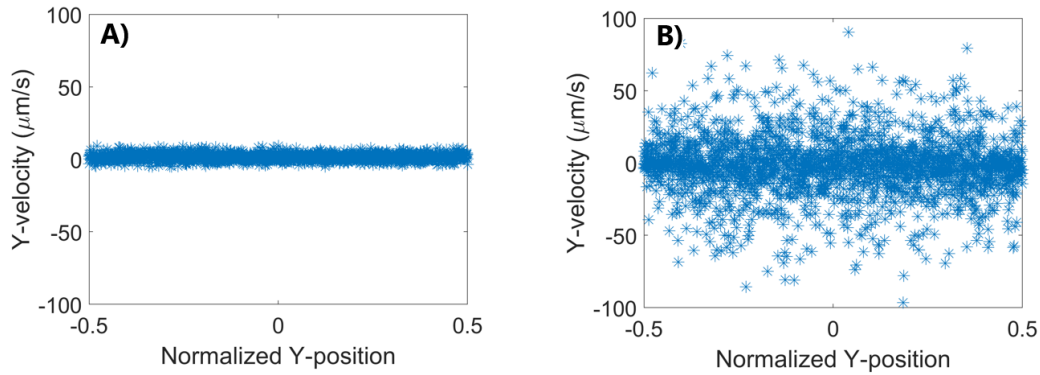


Figura 4.7: Comparativa de la velocidad lateral de las partículas en una suspensión sin glóbulos rojos (A) y a un hematocrito del 40 %(B) como función del ancho del canal.

un valor V_y positivo indica una tendencia de la partícula a moverse hacia la pared externa, mientras que uno negativo hacia la interna. Con base en lo anterior, es bastante claro como las partículas incrementan su velocidad perpendicular en la presencia de glóbulos rojos, indicando de forma indirecta las interacciones partículas/eritrocitos las cuales tienden a desplazar a las partículas lateralmente. Teniendo en cuenta lo anterior, al considerar un número grande de interacciones (o un tiempo) paulatinamente las partículas tenderían a alcanzar las paredes de los canales. Estos resultados concuerdan con lo reportado por algunos estudios, los cuales indican que las partículas en presencia de glóbulos rojos aumentan su velocidad lateral [12][18]. Por otro lado, en la figura 4.8 se muestra el perfil de rapidez longitudinal como función del ancho del canal (representado en el eje horizontal de la gráfica) para ambas suspensiones, el cual fue calculado al final del canal principal (recuadro de color rojo fig. 4.1). Es necesario aclarar que los resultados mostrados corresponden a las partículas detectadas en todos los planos, es decir, a diferentes alturas del microcanal.

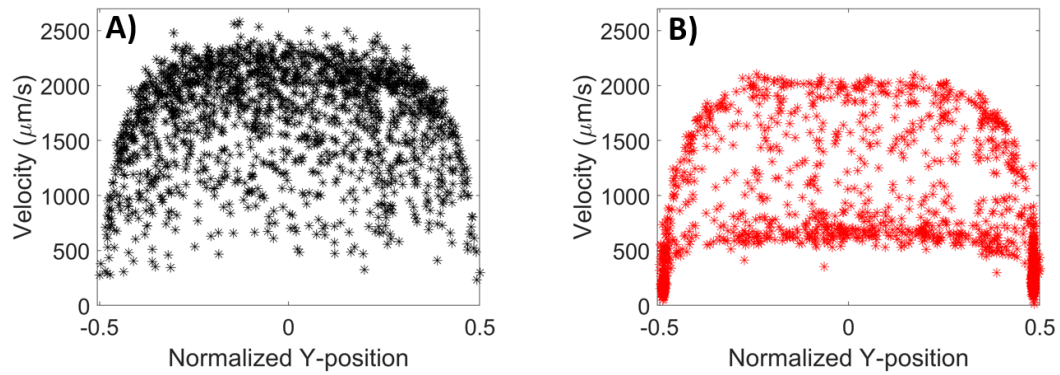


Figura 4.8: Perfiles de rapidez de partículas en una suspensión sin glóbulos rojos A) y B) a un hematocrito del 40 %.

Del mismo modo, se puede observar con bastante claridad como las partículas se acumulan en mayor medida en las paredes laterales (-0.5 y 0.5). Asimismo, se observa un gran número de partículas distribuidas en todo el ancho del canal cuya rapidez es aproximadamente menor a $1000 \mu\text{m s}^{-1}$. De igual manera, para demostrar explícitamente la interacción entre ambos componentes de la suspensión y para determinar la naturaleza de dicha interacción se calcularon los coeficientes de dispersión para ambos casos a partir de la evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio (DCM, ver fig. 4.9). Con base en los tiempos a los cuales $\alpha = 1$ se estima que, para la suspensión con glóbulos rojos $D_{yy22\%} = 15 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y $D_{yy0\%} = 0,8 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Estos valores demuestran las colisiones entre partículas y glóbulos rojos las cuales conllevan a un movimiento lateral difusivo de las partículas, el cual es conocido como shear-induced diffusion [48].

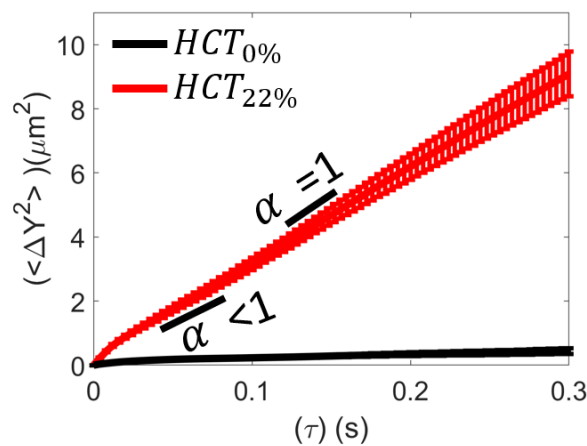


Figura 4.9: Desplazamiento cuadrático medio para ambas suspensiones.

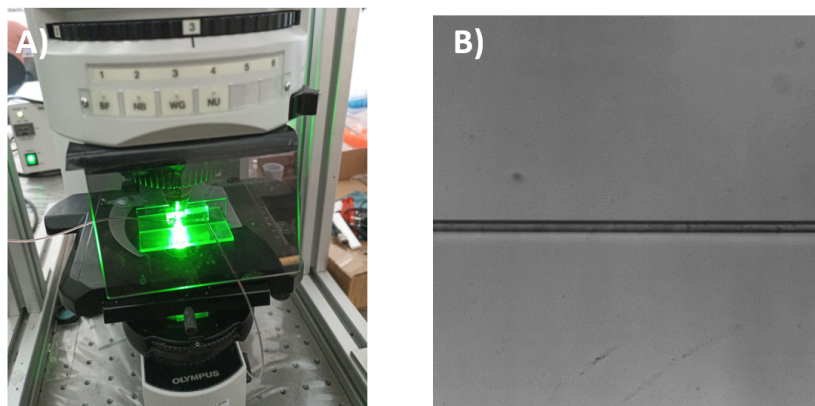


Figura 4.10: Modificación experimental para observar la dinámica en Z.

Por otro lado, debido a las diferencias entre las dimensiones de los canales (ancho y alto) se procedió a calcular el coeficiente de dispersión en la dirección Z (altura). Para lograr lo anterior, se realizó una modificación experimental que permitió visualizar la dinámica de las partículas en el eje Z, lo anterior se observa en la figura 4.10(A). Dicha variación consistía en voltear el dispositivo colocando la parte más delgada del PDMS en posición vertical (con respecto al objetivo del microscopio). Esta modificación nos permitió visualizar con bastante claridad la altura de los canales (ver fig. 4.10B). Posteriormente se hizo fluir la suspensión de glóbulos rojos/partículas para analizar la dinámica de las partículas y compararla con respecto a la vista vertical. Como se describió anteriormente, se ha reportado un fenómeno conocido como *efecto cascada* el cual hace referencia a una rápida migración de las partículas hacia la capa libre de células [38][76]. Este tipo de migración consiste en un proceso discontinuo que está formado por tres fases, I) un movimiento lateral lento de las partículas como resultado de la colisión con los glóbulos rojos, II) posteriormente ocurre un movimiento lateral abrupto el cual lleva a las partículas hacia la capa libre de células, donde, III) una vez dentro de esta zona se mueven de forma paralela respecto a las paredes de los canales con pequeñas fluctuaciones en su trayectoria como resultado de las interacciones con los eritrocitos que se mueven en el borde de la capa libre de células. Este tipo de fenómeno solo ha sido reportado por estudios computacionales los cuales indican que este proceso se lleva a cabo debido a la formación de microestructuras de glóbulos rojos (clusters), donde las partículas interactúan con estas estructuras que sirven como un 'atajo' para una rápida marginación [76][81]. Teniendo en cuenta lo anterior, en la figura 4.11 se muestran algunas trayectorias representativas de las partículas en el experimento visualizado de lado. En esta imagen se resaltan dos tipos de movimientos, donde las líneas de color fluorescente representan trayectorias de partículas que se aproximan hacia la capa libre de

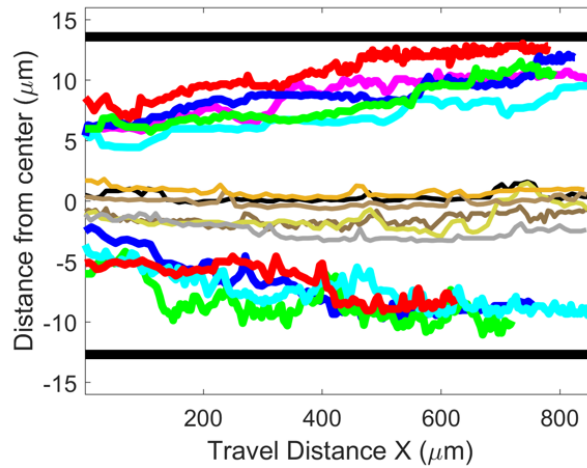


Figura 4.11: Trayectorias representativas de las partículas en la vista lateral.

células (tipo A), y en colores menos intensos se resaltan partículas que no alcanzan a salir del centro del canal (tipo B). Tomando como referencia las trayectorias tipo A, se puede visualizar claramente como las partículas migran hacia las paredes de formas distintas, es decir, no hay ningún patrón de movimiento definido. Esto es característico de un movimiento aleatorio, lo cual demuestra la naturaleza difusiva del movimiento lateral de las partículas como resultado de las interacciones con los glóbulos rojos. Por otro lado, algunas partículas (tomando como referencia la trayectoria de color verde de la parte inferior) migran de forma abrupta hacia la capa libre de células lo cual demuestra el efecto cascada, el cual fue descrito previamente. Posteriormente se cuantificó el coeficiente de dispersión (en la dirección Z) de las partículas a partir de la evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio, donde se obtuvo un valor de $D_{yySV} = 11 \mu m^2 s^{-1}$, el cual es un coeficiente menor respecto al caracterizado para las partículas en la vista superior. En la figura 4.12 se observa una comparación entre los DCM para ambas vistas, donde se puede notar de forma evidente que las partículas exploran una menor área en el mismo intervalo de tiempo en la vista lateral con respecto a la vista superior. Lo anterior es el resultado del mayor confinamiento de las partículas en la dirección Z con respecto a la dirección perpendicular. Como una cuantificación adicional al coeficiente de dispersión de las partículas para ambas vistas se calculó la función de densidad de la distribución de probabilidad (PDF) de los desplazamientos para ambos casos. En la figura 4.13 se muestra la PDF, donde $(\Delta Y, \tau)$ es la diferencia de desplazamientos en dos intervalos de tiempos diferentes. Por otro lado, D es el coeficiente de dispersión caracterizado para las dos direcciones perpendiculares a la dirección del flujo, los cuales determinan el ancho de las distribuciones.

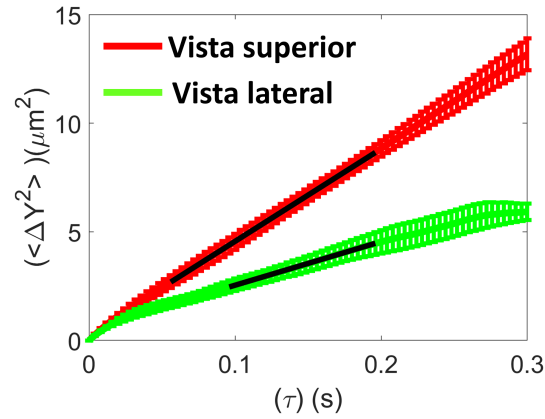


Figura 4.12: Evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio para ambas vistas.

Asimismo, es necesario aclarar que ambas distribuciones fueron obtenidas para el intervalo de tiempo $\tau = 0,1\text{seg}$, es decir, a partir del tiempo para el cual el movimiento de las partículas es difusivo. En la figura 4.13 se puede apreciar la concordancia entre la PDF medida directamente con los desplazamientos de las partículas y la obtenida con la ecuación 4.1 usando el coeficiente de dispersión obtenido como la pendiente del DCM. Estos resultados muestran el comportamiento difusivo de las partículas, ya que esta expresión es una solución a la segunda ley de Fick, cuya dinámica tiene como origen a las interacciones con los glóbulos rojos. Por otro lado, se demuestra que las partículas no tienen ninguna preferencia de migrar hacia una u otra pared, esto debido a la simetría de cada curva, es decir, se mueven con la misma probabilidad hacia ambas paredes. Por último, la curva correspondiente a la vista lateral (color verde) es menos ancha respecto a la de color rojo esto como resultado de las diferencias entre los coeficientes de dispersión para ambos casos.

$$P(\Delta y, \tau) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}} \exp\left(\frac{-\Delta y^2}{4D\tau}\right). \quad (4.1)$$

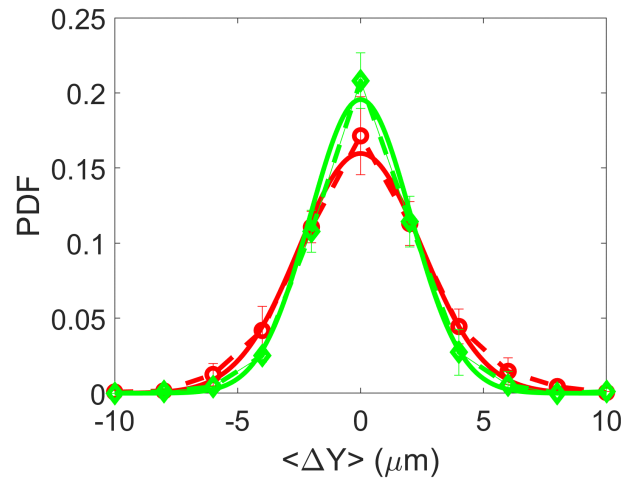


Figura 4.13: Distribución de desplazamientos en la dirección Y (símbolos de color verde) y en la dirección Z (símbolos de color rojo).

4.3.2 Distribución de rapidez de las micropartículas: diferenciación entre partículas que viajan cerca de la pared superior e inferior y aquellas que fluyen en el bulto

Una de las ventajas de utilizar una altura relativa tan pequeña en los microcanales ($24 \mu\text{m}$) es el poder detectar la fluorescencia de las partículas que fluyen a diferentes alturas en los microcanales a pesar de que viajan entre los glóbulos rojos. Teniendo en cuenta lo anterior así como el poder calcular su rapidez, esto nos permite discriminar entre partículas que fluyen a diferentes alturas. Es decir, teniendo en cuenta la condición de no deslizamiento, aquellas partículas que fluyen cerca de una pared su velocidad será menor con respecto a las que viajan a una mayor distancia de las paredes. Con base en lo anterior y tomando en cuenta el perfil de rapidez mostrado en la figura 4.8, se puede discriminar entre partículas que van cerca tanto de la pared superior e inferior como de aquellas que viajan en el centro del canal (respecto a la altura). En la figura 4.14(A) se muestra el perfil de velocidad longitudinal de las partículas que viajan a distintas alturas las cuales se diferencian entre pared (cerca de la pared superior e inferior) y bulk flow (se mueven en el centro del canal con respecto a la altura). De la gráfica se puede observar con facilidad la diferencia tan significativa en la rapidez de los dos tipos de zonas identificadas (cerca de la pared y en el bulto). No obstante, para poder corroborar que esta separación es correcta (con base en los criterios anteriores) es necesario comparar el área explorada por cada una de las partículas en las diferentes zonas, es decir, la evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio, el cual se muestra en la figura 4.14(B).

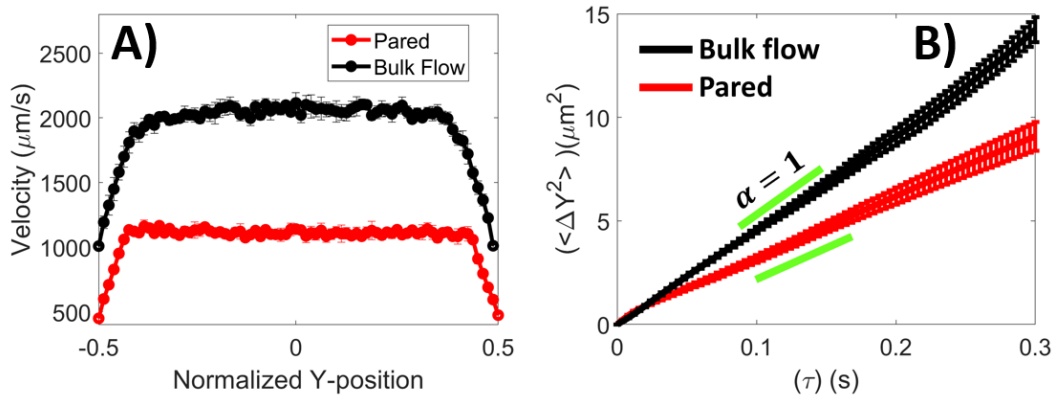


Figura 4.14: A) Perfiles de rapidez de las partículas que viajan a diferentes alturas en el microcanal y B) Evolución del desplazamiento cuadrático medio para las partículas que viajan a diferentes alturas. En ambas curvas los puntos de color negro corresponden a las partículas que fluyen en el bulto mientras que los de color rojo a las partículas cerca de la pared.

Aquellas partículas detectadas en el centro del canal a priori tienen un mayor espacio que explorar (debido a que se encuentran alejadas de las paredes) con respecto a aquellas en proximidad a las paredes (inferior y superior). Considerando lo anterior, se observa en la figura 4.14(B) como efectivamente esto se cumple, es decir, las partículas que fluyen en el centro del canal recorren (exploran) una mayor área lateral con respecto a las que viajan cerca de las paredes. Lo anterior se refleja de forma más explícita comparando los coeficientes de dispersión para cada caso, obteniendo un valor de $23 \mu m^2 s^{-1}$ para las partículas en el centro mientras que para las partículas cerca de la pared se obtuvo un valor de $14 \mu m^2 s^{-1}$. Los valores reportados previamente coinciden cualitativamente al reportado por Vahidkhan en el 2014 [76]. Por otro lado, una vez calculados los coeficientes de dispersión y haber corroborado la veracidad de la separación de partículas en función de la altura a la cual viajan, en la figura 4.15 se muestra la distribución lateral de partículas normalizada separando en las zonas mencionadas anteriormente. En la imagen se observa con bastante claridad como se cuantifica un mayor número de partículas cerca de la pared con respecto a las del bulto. Esto debido tanto a la distancia que previamente recorrieron ($\approx 1cm$) así como a la diferencia entre las dimensiones de los microcanales, es decir, las partículas alcanzarán en una menor distancia las paredes (tanto superior como inferior) con respecto a las paredes laterales. De igual manera, se observa como independientemente de la altura existe una marginación para ambos casos en las paredes laterales.

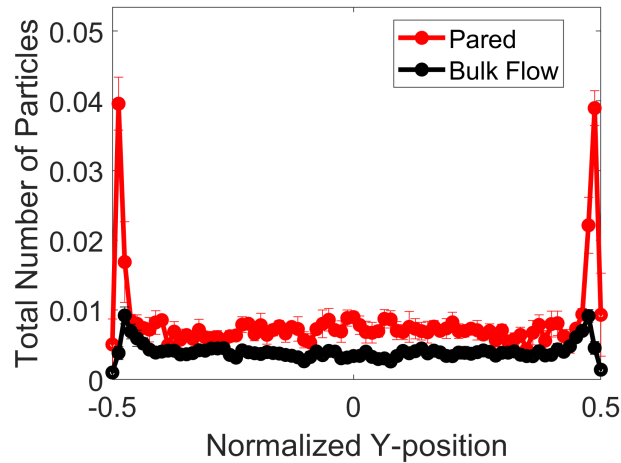


Figura 4.15: Distribución lateral de partículas normalizada que viajan a diferentes alturas. Curva de color negro corresponde a las que fluyen en el centro, mientras que la de color rojo representa a las partículas cerca de la pared superior.

Por último, a manera de comparación entre los distintos coeficientes de dispersión calculados para las partículas (vista lateral, pared superior e inferior y bulto) en la figura 4.16 se muestra la distribución de desplazamientos para cada uno de los casos mencionados anteriormente. Es necesario aclarar que para una visualización más sencilla solo se muestran los puntos experimentales y se omite la respectiva comparación con la distribución gaussiana. Es evidente que, a mayor coeficiente de dispersión el ancho de la curva será mayor, tal y como se muestra en la imagen lo cual demuestra la consistencia de los resultados.

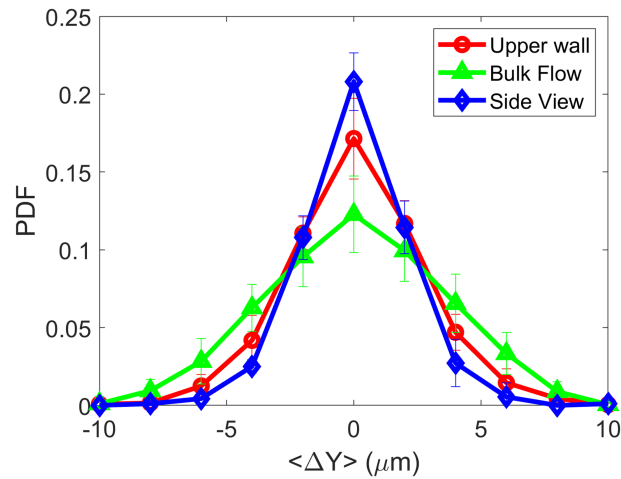


Figura 4.16: Distribución de desplazamientos de las partículas, donde la curva de color azul corresponde a la vista lateral (experimentos realizados a 2.5 mm respecto a la entrada), la de color rojo a las partículas que fluyen cerca de la pared superior mientras que la curva de color verde representa a las partículas que se mueven en el bulbo (estas dos últimas curvas se analizaron al final del canal principal).

4.3.3 Perfiles de rapidez y distribución lateral de las micropartículas a través de la red de microcanales

Para corroborar que la separación de las partículas que viajan en distintos planos es consistente, en la figura 4.17 se muestran los perfiles de rapidez para cada una de las zonas de análisis, tomando como referencia la diferencia en la rapidez que tiene que haber en la división. Es evidente que para cada zona analizada la separación es consistente, de igual manera se puede observar como esta diferencia en velocidades va disminuyendo conforme las partículas fluyen por las bifurcaciones (ver fig. 4.17 (B-C)), lo anterior es atribuido a un incremento en el número de partículas que viajan cerca de la pared, es decir, a mayor número de partículas en esta zona la diferencia va disminuyendo. De igual manera, se puede observar como la distribución de rapidez en las bifurcaciones se sesga hacia la pared externa. Lo anterior representa indirectamente la preferencia de las partículas a acumularse hacia una de las paredes debido a efectos geométricos. Por otro lado, pese a que existe una simetría en cuanto a las dimensiones de los microcanales se puede observar como en las confluencias la rapidez de las micropartículas es ligeramente mayor con respecto a las bifurcaciones (ver fig. 4.17 (D-E)), lo cual es atribuido a la formación de la CFL central, es decir, debido a que existe una menor distribución de glóbulos rojos en el centro

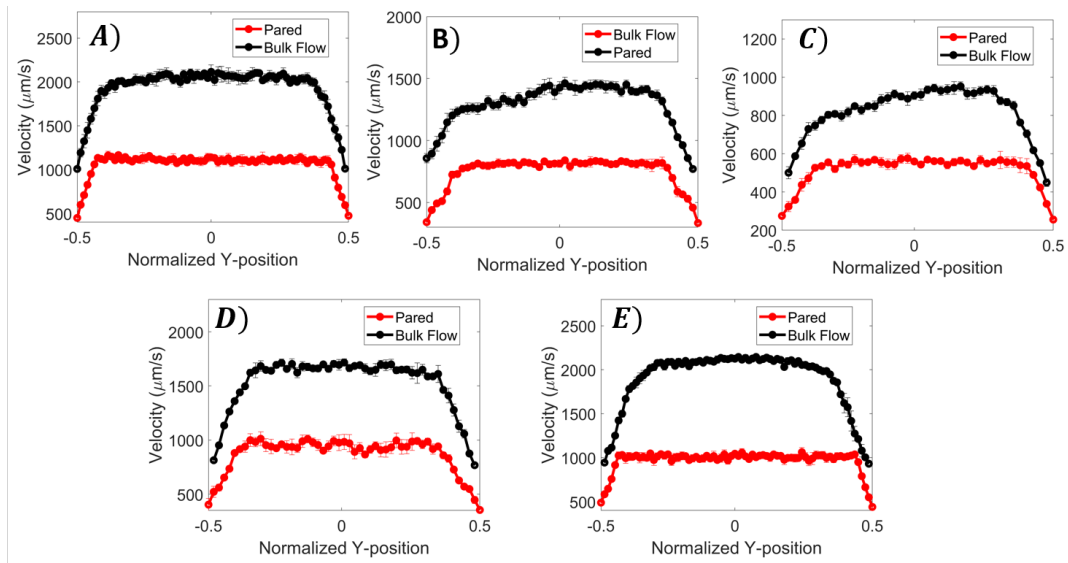


Figura 4.17: Comparativa de los perfiles de rapidez de las partículas en las diferentes zonas de interés, A) Canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia. En cada imagen la curva de color rojo corresponde a las partículas que viajan cerca de la pared, mientras que la de color negro a las partículas que fluyen en el centro del canal.

del canal. Esto contribuirá a una disminución de la viscosidad lo que naturalmente conllevará a que las partículas se muevan a una mayor velocidad con respecto a la calculada para las bifurcaciones. En la figura 4.18 se muestra la distribución lateral de las partículas a través de las diferentes regiones del dispositivo, y se puede observar como para ambas zonas (pared y bulk flow) el número de partículas es más grande cerca de las paredes con respecto al centro del canal lo que indica la marginación de las partículas. Posteriormente, se muestra claramente como el máximo de la curva de color rojo va incrementando gradualmente conforme las partículas fluyen por las bifurcaciones (ver fig. 4.18 (B-C)). Sin embargo, otro efecto importante es la tendencia a recorrerse hacia el centro del canal del máximo de la curva de color negro. Lo anterior refleja la evidente migración de las partículas hacia las paredes (tanto superior como inferior) lo cual es el resultado del incremento del valor máximo de la curva de color rojo. Por otro lado, en la zona de convergencias esta tendencia cambia con respecto a las bifurcaciones, es decir, el número de partículas contabilizadas en el centro del canal empieza a incrementar paulatinamente al mismo tiempo que los máximos empiezan a recorrerse hacia las paredes laterales. Esto refleja claramente una tendencia de las partículas a antimarginarse. Esto se refleja en la disminución de las partículas que se encuentran cerca de las paredes (curva de color rojo).

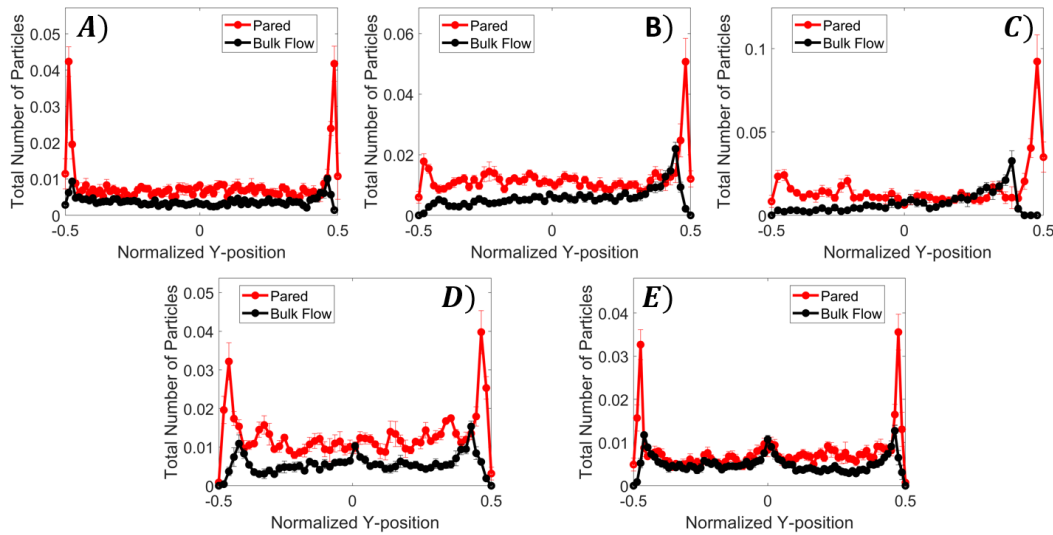


Figura 4.18: Comparativa de la distribución lateral de partículas en las diferentes zonas de interés. A) cuantifica al canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia. En cada imagen la curva de color rojo corresponde a las partículas que viajan cerca de la pared, mientras que la de color negro a las partículas que fluyen en el centro del canal.

4.3.4 Variación del coeficiente de dispersión como función del ancho de los microcanales

Tal y como ya se ha discutido en secciones anteriores, la dinámica de las partículas es influenciada por los eritrocitos. Teniendo en cuenta lo anterior, se ha reportado que la dinámica de los glóbulos rojos en un microcanal es heterógena [3][63][83]. Con base en esto y para obtener un mayor detalle acerca de la dinámica de las micropartículas se procedió a analizar el coeficiente de dispersión con respecto al ancho del canal en las diferentes regiones de interés. Para este análisis se dividió a los microcanales en carriles de $10 \mu\text{m}$ cada uno. En la figura 4.19 se muestran estos resultados para las distintas regiones. Para el canal principal se observa la aparición de dos valores máximos a una distancia de $30 - 40 \mu\text{m}$ respecto a las paredes laterales, mientras que para las partículas que fluyen cerca de las paredes ($\leq 10 \mu\text{m}$) se obtuvieron los valores mínimos, lo cual es el resultado de la baja concentración de glóbulos rojos (CFL) y la presencia de las paredes. Posteriormente, en las bifurcaciones (ver fig. 4.19 (B-C)) los valores máximos están sezdados hacia las paredes internas, lo cual concuerda con la distribución de glóbulos rojos en estas zonas, es decir, debido al acumulamiento de eritrocitos en los vértices de las bifurcaciones habrá un mayor número de colisiones entre ambos componentes de la suspensión,

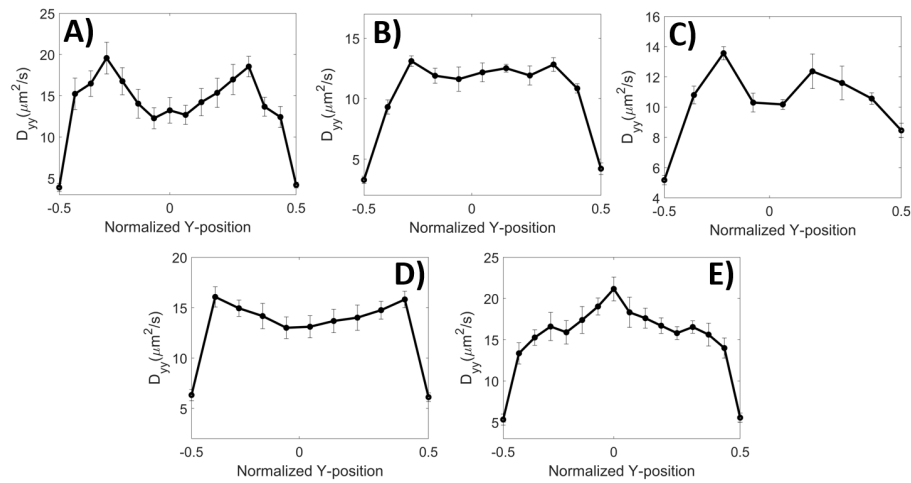


Figura 4.19: Distribución de los coeficientes de dispersión con respecto al ancho del canal en las diferentes regiones de interés. A) canal principal, B) primera bifurcación derecha, C) segunda bifurcación derecha, D) primera convergencia y E) segunda convergencia.

lo cual naturalmente incrementará el coeficiente de dispersión para las partículas que viajan en esta zona. Por último, en las convergencias se observa otro efecto interesante (ver fig. 4.19 (D-E)). Para la primera confluencia los valores máximos están más próximos hacia las paredes laterales mientras que para el resto del canal (a excepción de las partículas que están a una distancia $\leq 10 \mu\text{m}$) el coeficiente de dispersión es prácticamente uniforme. No obstante, para la segunda convergencia se observa como en el centro del canal aparece un máximo, mientras que para el resto del canal estos valores prácticamente son uniformes. Este valor es interesante, puesto que su ubicación coincide con la CFL central cuyo ancho es comparable con el calculado para las paredes laterales. Es importante resaltar que en la primera confluencia también existe una CFL central. Sin embargo, el valor obtenido ($1.8 \mu\text{m}$) es menor que el diámetro de las partículas ($2 \mu\text{m}$) por lo que prácticamente las partículas no pueden ocupar esta zona, lo cual ocasiona que no exista un incremento en el coeficiente de dispersión tal y como sucede para la segunda convergencia.

4.4 Cuantificación del número de partículas marginadas en la red de microcanales

Una vez caracterizada la distribución lateral de partículas se procedió a comparar el número de partículas marginadas en las diferentes regiones del dispositivo con el objetivo de resaltar el efecto tanto de las bifurcaciones como el de las convergencias. La marginación está definida como el número de partículas que se encuentran a una distancia característica de las paredes, a partir de esta definición y tomando en cuenta el ancho calculado para la capa libre de células se define a la marginación como el número de partículas contadas a una distancia de $10\ \mu\text{m}$ respecto a cada una de las paredes laterales. Para obtener una mejor comparativa en la migración de partículas se agregó una zona más de análisis en el canal principal a $2.5\ \text{mm}$ respecto a la entrada del dispositivo. A partir de lo anterior, en la figura 4.20 se puede observar una comparativa del número de partículas marginadas (puntos de color rojo) con respecto al número de partículas en el resto de canal (puntos de color azul) en las dos zonas analizadas correspondientes al canal principal, las cuales están representadas en el eje horizontal de la gráfica (1 corresponde a $2.5\ \text{mm}$, 2 corresponde a $1\ \text{cm}$ respecto a la entrada). De igual manera, se observa como las partículas a $2.5\ \text{mm}$ se encuentran mayormente distribuidas alrededor del centro del canal. Sin embargo, al recorrer una distancia longitudinal de $1\ \text{cm}$ el número de partículas marginadas incrementa significativamente con respecto a $2.5\ \text{mm}$. Este incremento es el resultado de la tendencia de las partículas a migrar lateralmente debido a las colisiones con los glóbulos rojos, es decir, a mayor distancia longitudinal recorrida, mayor

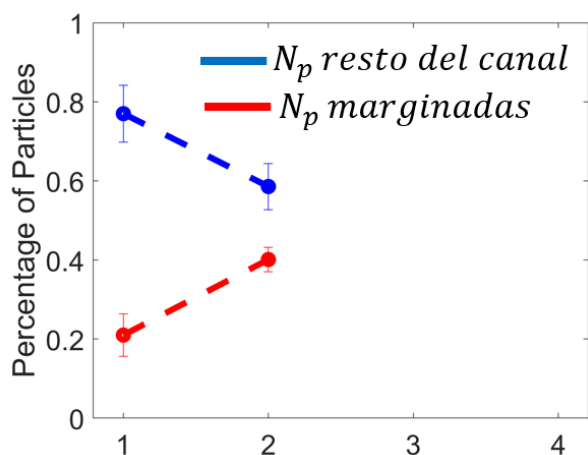


Figura 4.20: Porcentaje de partículas marginadas en el canal principal. La zona 1 corresponde a $2.5\ \text{mm}$ respecto a la entrada y zona 2 a $1\ \text{cm}$.

número de partículas contabilizadas cerca de las paredes. Para los resultados posteriores, solo se mostrará el número de partículas marginadas. Una vez cuantificada la evolución del número de partículas marginadas en el canal principal, se procedió a realizar el mismo procedimiento en las zonas posteriores, es decir, en la zona de bifurcaciones (ver fig. 4.1 llave de color azul). En la figura 4.21 se muestran estos resultados, donde la zona 3 y 4 corresponden a la primera y segunda bifurcación respectivamente. De manera consistente se puede observar un incremento gradual conforme las partículas fluyen por las bifurcaciones, es decir, en la zona número 3 el número de partículas incrementa ligeramente con respecto a la zona 2 ($\approx 2\%$). Esta tendencia es atribuida a la distancia tan pequeña que separa a ambas zonas de análisis ($\approx 100 \mu\text{m}$). Sin embargo, en la zona 4 ($\approx 1800 \mu\text{m}$ entre ambas zonas) existe un incremento significativo de aproximadamente 16% con respecto a la zona anterior y del 18% en comparación con el canal principal (Zona 2), es decir, en una menor distancia el número de partículas marginadas incrementó en el mismo porcentaje en comparación con el aumento entre la zona 1 y la número 2. Esta tendencia en el aumento del número de partículas marginadas refleja de forma directa el movimiento lateral de las partículas, es decir, su difusión. A manera de elucidar si esta tendencia es el reflejo de un aumento en el coeficiente de dispersión, se procedió a calcular y graficar este valor para cada uno de las zonas analizadas, cuyos resultados se muestran a continuación.

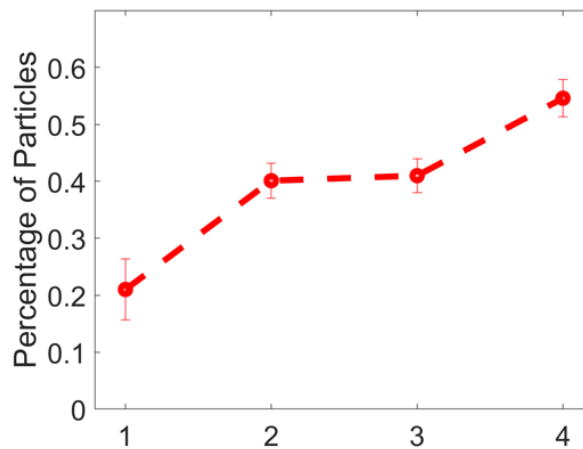


Figura 4.21: Evolución del número de partículas marginadas (indicadas por los puntos de color rojo) en las bifurcaciones del sistema (representadas por la zona 3 y 4).

4.4.1 Variación del coeficiente de dispersión como función del wall shear rate

En la figura 4.22 se muestran los coeficientes de dispersión para cada una de las zonas analizadas como función del wall shear rate, el cual fue calculado a partir de la ecuación 4.2. Esta expresión considera la relación entre el alto y el ancho de un canal rectangular y fue derivada a partir de la consideración de las fuerzas involucradas en un elemento del fluido [68]. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede observar con bastante claridad que el coeficiente de dispersión disminuye conforme las partículas van fluyendo a través de las bifurcaciones, es decir, el incremento en el número de partículas marginadas no es atribuido a un aumento en el coeficiente de dispersión. A pesar de lo anterior, obedecen a una relación lineal respecto al shear rate, en concordancia a la expresión para el cálculo del coeficiente de dispersión como función del volumen, shear rate y diámetro de partículas [20]. Estos resultados en conjunto con los obtenidos para la CFL nos indican que el incremento del número de partículas marginadas es debido a la distancia longitudinal recorrida por las partículas, los efectos geométricos, así como la presencia de glóbulos rojos.

$$\dot{\gamma} = \left(\frac{6Q}{WH^2} \right) \left(1 + \frac{H}{W} \right) f^* \left(\frac{H}{W} \right). \quad (4.2)$$

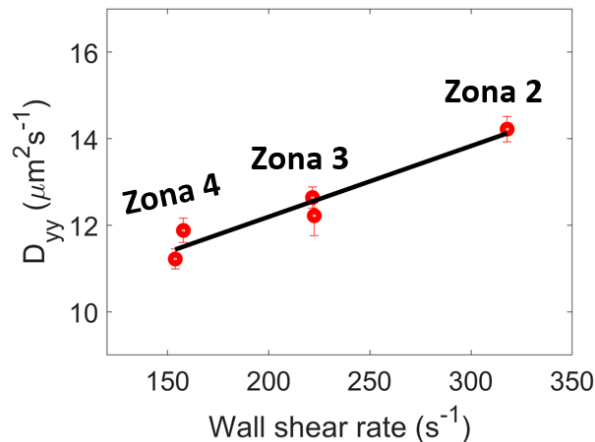


Figura 4.22: Coeficiente de dispersión en función del wall shear rate para cada una de las zonas analizadas.

4.4.2 Efecto de las convergencias en el número de partículas marginadas: antimarginación.

El dispositivo fabricado para el presente trabajo cuenta con una zona de convergencias, la cual está indicada por la llave de color verde en la figura 4.1. Tomando como referencia el número de partículas marginadas en la segunda bifurcación (ver fig. 4.21 zona 4), se puede observar como este porcentaje comienza a disminuir al entrar en la primera convergencia (ver fig. 4.23 zona 5), habiendo una reducción de aproximadamente 13 % respecto a la zona que lo precede, lo cual es el resultado de la distribución previa de las partículas (en la segunda bifurcación). Es decir, las partículas que se encuentran previamente marginadas en la pared interna del canal que precede a esta zona se redistribuyen hacia el centro de las convergencias, dicho de otra manera, de estar marginadas pasan a una posición de antimarginación, lo cual genera la disminución en el número de partículas marginadas. Posteriormente, esta tendencia continúa en la segunda convergencia habiendo otra reducción del 10 % en el número de partículas marginadas. Es decir, de haber un 60 % de partículas cerca de las paredes en las bifurcaciones este valor se reduce hasta un 38 % al fluir por las convergencias. Con base en lo anterior, se puede deducir que tienen un efecto no deseado en la marginación. Posteriormente, se evaluó el coeficiente de dispersión en la zona de confluencias. Estos resultados se pueden observar en la figura 4.24 (zona 5 y 6 respectivamente). Es evidente que pese a existir una simetría entre la zona de bifurcaciones y confluencias para un mismo shear rate el coeficiente de dispersión incrementa en las convergencias con respecto a las bifurcaciones, lo cual resulta ser no intuitivo debido a la reducción en el número de partículas

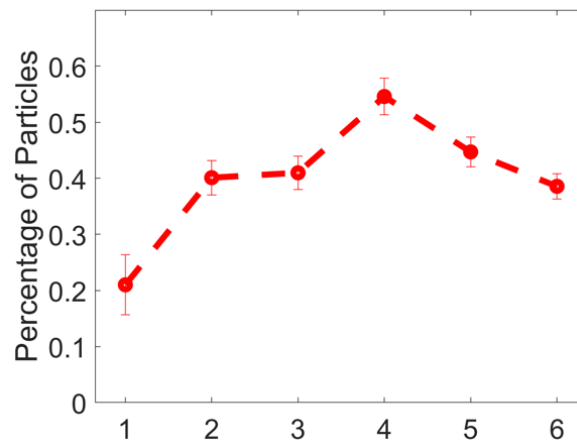


Figura 4.23: Número de partículas marginadas a través de las zonas analizadas.

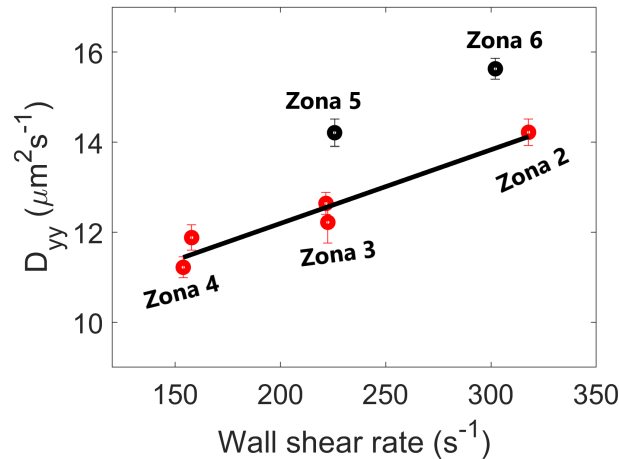


Figura 4.24: Coeficiente de dispersión en función del wall shear rate para cada una de las zonas analizadas. Los puntos de color negro representan a la primera y segunda convergencia respectivamente.

marginadas. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados para el coeficiente de dispersión como función del ancho de los microcanales en la segunda convergencia, es necesario evaluar la distancia que le tomará a las micropartículas volver a migrar hacia las paredes a partir de la siguiente expresión [81]:

$$X_{cf} = \frac{\langle u \rangle \left(\frac{Z}{2}\right)^2}{D_{yy}}, \quad (4.3)$$

donde $\langle u \rangle$ es la velocidad media y D_{yy} el coeficiente de dispersión de la CFL central de la segunda convergencia. Sustituyendo los valores correspondientes se estima que la distancia que le tomará a las partículas volver a marginarse es del orden de 2.12 mm. Con base en el valor anterior, se puede deducir que la CFL central tiene una influencia positiva sobre la dinámica de las partículas puesto que su coeficiente de dispersión incrementa significativamente alrededor del centro del canal con respecto al resto del canal, lo cual indica que las partículas alcanzarían en una menor distancia las paredes laterales de los canales, es decir, volver a marginarse. Tomando en cuenta este valor, si se considera una distancia entre ramificaciones de una vasculatura real ($\approx 0.2 - 1.2$ mm) se puede deducir que el número de partículas marginadas en las bifurcaciones (≈ 60 %) no volverá a recuperarse pese al incremento en el coeficiente de dispersión. Incluso, si se considera una cascada de 4 confluencias se estima que la distribución lateral de partículas será preferente en el centro del canal tomando en cuenta el efecto de antimarginación que estas tienen. Estos resultados podrían explicar algunas observaciones realizadas in vivo, donde se ha reportado que la marginación de partículas es menor en el lado venular (confluencias) con

respecto a la zona arteriolar (bifurcaciones) [73][79]. Sin embargo, para corroborar la consistencia del valor previamente calculado se realizó una cuantificación adicional del número de partículas marginadas a $600 \mu\text{m}$ respecto al inicio de la segunda convergencia, es decir, una distancia más realista con respecto a la separación inter-ramificaciones. Este resultado se puede observar en la figura 4.25 (zona 7), donde es evidente como empieza a ocurrir una recuperación gradual del número de partículas marginadas pese a la distancia relativa tan pequeña entre ambas zonas, lo cual es el resultado del incremento en el coeficiente de dispersión en la CFL central.

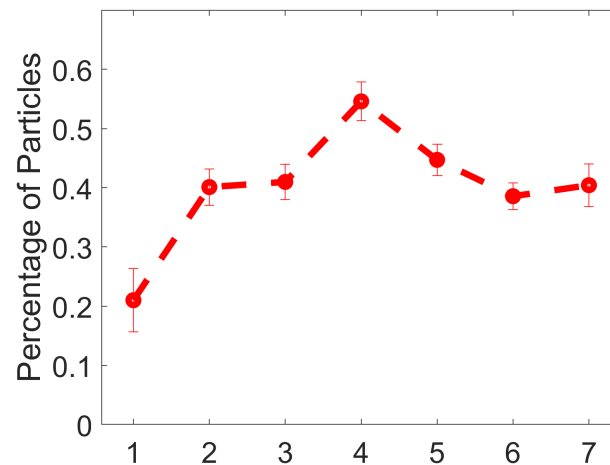


Figura 4.25: Porcentaje de partículas marginadas en las distintas zonas analizadas, el número 7 corresponde a una distancia de $700 \mu\text{m}$ respecto al vértice de la segunda convergencia.

5

Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Los estudios reportados están centrados en estudiar la marginación de partículas a nivel de vasos sanguíneos (o microcanales) individuales, lo cual como primer acercamiento es interesante, no obstante, es necesario analizar la dinámica de las micropartículas en redes vasculares fisiológicamente más realistas, las cuales están caracterizadas por estar compuestas tanto de bifurcaciones como de confluencias. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de encontrar los efectos de una red de microcanales sobre la marginación de micropartículas. Una de las aplicaciones de estudiar este efecto es el potencial que tienen las micropartículas para ser utilizadas como acarreadores de fármacos. El objetivo principal de este modelo es una liberación focalizada de las moléculas de un fármaco, lo cual reduciría significativamente los efectos no deseados. Por otro lado, durante este trayecto (previo a la liberación del fármaco) estos acarreadores necesitan migrar hacia las células endoteliales de los vasos sanguíneos, a lo que se le conoce como marginación. Posteriormente, existe un segundo efecto conocido como adhesión el cual involucra la interacción fármaco-receptor, no obstante, el objetivo principal del presente estudio se centra únicamente en evaluar el efecto de las redes vasculares sobre la marginación de micropartículas. Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un modelo in vitro, cuyo objetivo era considerar tanto las ramificaciones presentes en las redes vasculares así como la distancias típicas reportadas entre distintos vasos sanguíneos. Para elucidar lo anterior, se evaluó tanto la formación de la capa libre de células (CFL) así como el número de partículas marginadas en distintas zonas de la red propuesta. Los resultados fueron obtenidos a partir de la grabación de videos y técnicas de análisis de imágenes. Con base en lo

reportado se concluye lo siguiente:

- Existe una asimetría en la distribución de glóbulos rojos lo que se ve reflejado en la aparición de una CFL central en la zona de convergencias lo cual difiere respecto a las bifurcaciones.
- La marginación de micropartículas es geoméricamente-dependiente lo que favorece a un aumento en el porcentaje de partículas cerca de las paredes en las bifurcaciones. Por otro lado, ocurre un efecto de antimarginación en las convergencias.
- La CFL central de las convergencias juega un papel importante en la dinámica de las micropartículas incrementando el coeficiente de dispersión en esta zona. Por otro lado, debido a la distancia entre ramificaciones no es posible volver a recuperar el número de partículas marginadas.
- Se caracterizaron los coeficientes de dispersión para las micropartículas en las distintas zonas analizadas, lo que aporta información de suma importancia para la realización de una simulación que no tome en cuenta el modelamiento de los eritrocitos sino únicamente la dinámica de las partículas lo que reduciría significativamente el costo computacional.

5.2 Perspectivas

- Realizar una simulación computacional para explorar el efecto de la distancia entre ramificaciones, para así corroborar si los efectos geoméricos prevalecen a distintas distancias.
- Corroborar si los coeficientes de dispersión reportados en el presente trabajo son suficientes para simular la dinámica de las micropartículas sin considerar a los glóbulos rojos, es decir, si se puede reproducir lo ya reportado.
- Utilizar un modelo in vivo para corroborar que existe una CFL central en las vénulas de la microvasculatura.

Bibliografía

- [1] Blood Flow Behavior in Microchannels: Past, Current and Future Trends. In Ricardo Dias, Antonio A. Martins, Rui Lima, and Teresa M. Mata, editors, *Single and Two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*, pages 513–547. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, July 2012.
- [2] Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. *Nanoscale*, 2018.
- [3] Lateral vesicle migration in a bounded shear flow: Viscosity contrast leads to off-centered solutions. *Physical Review Fluids*, 2018.
- [4] M. Abkarian and A. Viallat. Dynamics of Vesicles in a Wall-Bounded Shear Flow. *Biophysical Journal*, 89(2):1055–1066, August 2005.
- [5] Vicente Perez Alberto Otero, M. Aymerich and Alberto Muñozuri. Determination of hemodynamic risk for vascular disease in planar artery bifurcations. *Scientific Reports*, 2018.
- [6] Tamas Alexy, Jon Detterich, Philippe Connes, Kalman Toth, Elie Nader, Peter Kenyeres, Jose Arriola-Montenegro, Pinar Ulker, and Michael J. Simmonds. Physical Properties of Blood and their Relationship to Clinical Conditions. *Frontiers in Physiology*, 13:906768, July 2022.
- [7] Batchelor. The effect of brownian motion on the bulk stress in a suspension of spherical particles. *J. Fluid Mech*, 1977.
- [8] D. Bento, C.S. Fernandes, J.M. Miranda, and R. Lima. In vitro blood flow visualizations and cell-free layer (CFL) measurements in a microchannel network. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 109:109847, December 2019.
- [9] Christian Bächer, Alexander Kihm, Lukas Schrack, Lars Kaestner, Matthias W. Laschke, Christian Wagner, and Stephan Gekle. Antimargination of Microparticles and Platelets in the Vicinity of Branching Vessels. *Biophysical Journal*, 115(2):411–425, July 2018.

-
- [10] Mizuno et Cabral, Matsumoto and Kazunori. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature nanotechnology*, 2011.
- [11] Isabelle Cantat and Chaouqi Misbah. Lift Force and Dynamical Unbinding of Adhering Vesicles under Shear Flow. *Physical Review Letters*, 83(4):880–883, July 1999.
- [12] Erik J. Carboni, Brice H. Bognet, Grant M. Bouchillon, Andrea L. Kadilak, Leslie M. Shor, Michael D. Ward, and Anson W.K. Ma. Direct Tracking of Particles and Quantification of Margination in Blood Flow. *Biophysical Journal*, 111(7):1487–1495, October 2016.
- [13] Violeta Carvalho, Inês M. Gonçalves, Andrews Souza, Maria S. Souza, David Bento, João E. Ribeiro, Rui Lima, and Diana Pinho. Manual and Automatic Image Analysis Segmentation Methods for Blood Flow Studies in Microchannels. *Micromachines*, 12(3):317, March 2021.
- [14] Chenghai and Lance. Influence of erythrocyte aggregation on leucocyte margination in postcapillary expansions: A lattice boltzmann analysis. *Physica A: Statistical Mechanics and its applications*, 2006.
- [15] Shu Chien. Shear Dependence of Effective Cell Volume as a Determinant of Blood Viscosity. *Science*, 168(3934):977–979, May 1970.
- [16] Gwennou Coupier, Badr Kaoui, Thomas Podgorski, and Chaouqi Misbah. Noninertial lateral migration of vesicles in bounded Poiseuille flow. *Physics of Fluids*, 20(11):111702, November 2008.
- [17] John C. Crocker and David G. Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1):298–310, April 1996.
- [18] Rosa D’Apolito, Giovanna Tomaiuolo, Francesca Taraballi, Silvia Minardi, Dickson Kirui, Xuewu Liu, Armando Cevenini, Roberto Palomba, Mauro Ferrari, Francesco Salvatore, Ennio Tasciotti, and Stefano Guido. Red blood cells affect the margination of microparticles in synthetic microcapillaries and intravital microcirculation as a function of their size and shape. *Journal of Controlled Release*, 217:263–272, November 2015.
- [19] D. E. Discher, N. Mohandas, and E. A. Evans. Molecular Maps of Red Cell Deformation: Hidden Elasticity and in Situ Connectivity. *Science*, 266(5187):1032–1035, November 1994.
- [20] Douglas Eckstein and Shapiro. Self-diffusion of particles in shear flow of a suspension. *Journal of Fluid Mechanics*, 1977.

-
- [21] E.C. Eckstein and F. Belgacem. Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms. *Biophysical Journal*, 60(1):53–69, July 1991.
- [22] Fitz Feng and Solomon. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model. *Journal of visualized experiments*, 2015.
- [23] Thomas M. Fischer. Shape Memory of Human Red Blood Cells. *Biophysical Journal*, 86(5):3304–3313, May 2004.
- [24] Thomas M. Fischer, Marianne Stöhr-Liesen, and Holger Schmid-Schönbein. The Red Cell as a Fluid Droplet: Tank Tread-Like Motion of the Human Erythrocyte Membrane in Shear Flow. *Science*, 202(4370):894–896, November 1978.
- [25] Robin Fåhræus and Torsten Lindqvist. THE VISCOSITY OF THE BLOOD IN NARROW CAPILLARY TUBES. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 96(3):562–568, March 1931.
- [26] P. Gaetgens and H. Schmid. Mechanisms of dynamic flow adaptation of mammalian erythrocytes. *Naturwissenschaften*, 69(6):294–296, June 1982.
- [27] Pierre-Yves Gires, Aparna Srivastav, Chaouqi Misbah, Thomas Podgorski, and Gwennou Couplier. Pairwise hydrodynamic interactions and diffusion in a vesicle suspension. *Physics of Fluids*, 26(1):013304, January 2014.
- [28] Goldsmith and Karino. Microscopic considerations: the motions of individual particles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1977.
- [29] H.L Goldsmith and Mason. Flow of suspensions through tubes single spheres, rods and discs. *J. Colloid Sci*, 1962.
- [30] Francisca Guzmán-Lastra and Rodrigo Soto. Subdiffusive behavior of a dilute non-Brownian suspension under shear. *Physical Review E*, 87(4):042311, April 2013.
- [31] Zhiqiang Shen Huilin Ye and Ying Li. Shear rate dependent margination of sphere-like, oblate-like and prolate-like micro-particles within blood flow. *Soft Matter*, 14, 2018.
- [32] Simon Johannes and Dimitry. Flow-induced transitions of red blood cell shapes under shear. *Physical Review Letters*, 2018.

- [33] B. Kaoui, G. H. Ristow, I. Cantat, C. Misbah, and W. Zimmermann. Lateral migration of a two-dimensional vesicle in unbounded Poiseuille flow. *Physical Review E*, 77(2):021903, February 2008.
- [34] Goldsmith Karnis and Mason. Axial migration of particles in poiseuille flow. *Nature*, 1963.
- [35] Stuart R. Keller and Richard Skalak. Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 120:27–47, July 1982.
- [36] Sangho Kim, Robert L. Kong, Aleksander S. Popel, Marcos Intaglietta, and Paul C. Johnson. Temporal and spatial variations of cell-free layer width in arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(3):H1526–H1535, September 2007.
- [37] Koohyiar and Bagchi. Microparticle shape effects on margination, near wall dynamics and adhesion in a three-dimensional simulation of red blood cell suspension. *Soft matter*, 2015.
- [38] Christos Kotsalos, Franck Raynaud, Jonas Lätt, Ritabrata Dutta, Frank Dubois, Karim Zouaoui Boudjeltia, and Bastien Chopard. Shear induced diffusion of platelets revisited. *Frontiers in Physiology*, 13:985905, October 2022.
- [39] Amit Kumar and Michael D. Graham. Segregation by membrane rigidity in flowing binary suspensions of elastic capsules. *Physical Review E*, 84(6):066316, December 2011.
- [40] Giuseppina Lamberti, Fariborz Soroush, Ashley Smith, Mohammad F. Kiani, Balabhaskar Prabhakarpanthian, and Kapil Pant. Adhesion patterns in the microvasculature are dependent on bifurcation angle. *Microvascular Research*, 99:19–25, May 2015.
- [41] Tae-Rin Lee, Myunghwan Choi, Adrian M. Kopacz, Seok-Hyun Yun, Wing Kam Liu, and Paolo Decuzzi. On the near-wall accumulation of injectable particles in the microcirculation: smaller is not better. *Scientific Reports*, 3(1):2079, June 2013.
- [42] David Leighton and Andreas Acrivos. Measurement of shear-induced self-diffusion in concentrated suspensions of spheres. *Journal of Fluid Mechanics*, 177:109–131, April 1987.
- [43] David Leighton and Andreas Acrivos. The shear-induced migration of particles in concentrated suspensions. *Journal of Fluid Mechanics*, 181(-1):415, September 1987.
- [44] Ishikawa Lima and Yamaguchi. Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: the role of hematocrit and geometry. *J. Biomech*, 2008.

- [45] Jessica Lin, Matthew G. Sorrells, Wilbur A. Lam, and Keith B. Neeves. Physical forces regulating hemostasis and thrombosis: Vessels, cells, and molecules in illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(5):e12548, July 2021.
- [46] Zixiang Liu, Jonathan R. Clausen, Rekha R. Rao, and Cyrus K. Aidun. Nanoparticle diffusion in sheared cellular blood flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 871:636–667, July 2019.
- [47] Kathleen Loomis and Bellamjonda. Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter*, 2010.
- [48] Mauricio and Graham. Shear-induced diffusion in dilute suspensions of spherical or nonspherical particles: Effects of irreversibility and symmetry breaking. *Physics of Fluids*, 2007.
- [49] Adlan Merlo, Sylvain Losserand, François Yaya, Philippe Connes, Magalie Faivre, Sylvie Lorthois, Christophe Minetti, Elie Nader, Thomas Podgorski, Céline Renoux, Gwennou Coupier, and Emilie Franceschini. Influence of storage and buffer composition on the mechanical behavior of flowing red blood cells. *Biophysical Journal*, 122(2):360–373, January 2023.
- [50] N Mohandas. Mechanical Properties of the Red Cell Membrane in Relation to Molecular Structure and Genetic Defects.
- [51] Narla Mohandas and Patrick G. Gallagher. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10):3939–3948, November 2008.
- [52] Bumseok Namgung, Yan Cheng Ng, Hwa Liang Leo, Joseph M. Rifkind, and Sangho Kim. Near-Wall Migration Dynamics of Erythrocytes in Vivo: Effects of Cell Deformability and Arteriolar Bifurcation. *Frontiers in Physiology*, 8:963, November 2017.
- [53] U. Nobis, A.R. Pries, G.R. Cokelet, and P. Gaehtgens. Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvascular Research*, 29(3):295–304, May 1985.
- [54] Akira Noguchi, Yuki Tange, Tomoaki Itano, and Masako Sugihara-Seki. Margination of platelet-sized particles in red blood cell suspensions flowing through a Y-shaped confluence microchannel. *Fluid Dynamics Research*, 55(3):035506, June 2023.

-
- [55] Ryota Noso, Tomoya Kimura, Keisuke Sakamoto, Masako Sugihara-Seki, and Junji Seki. Cross-Sectional Distributions of Platelet-Sized Particles in Blood Flow through Microchannels. *Nihon Reoroji Gakkaishi*, 43(3_4):99–104, 2015.
- [56] Dongig Oh, Satoshi Ii, and Shu Takagi. Numerical Study of Particle Margination in a Square Channel Flow with Red Blood Cells. *Fluids*, 7(3):96, March 2022.
- [57] M Oishi, K Utsubo, H Kinoshita, T Fujii, and M Oshima. Continuous and simultaneous measurement of the tank-treading motion of red blood cells and the surrounding flow using translational confocal micro-particle image velocimetry (micro-PIV) with sub-micron resolution. *Measurement Science and Technology*, 23(3):035301, March 2012.
- [58] T. Omori, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi. Shear-induced diffusion of red blood cells in a semi-dilute suspension. *Journal of Fluid Mechanics*, 724:154–174, June 2013.
- [59] Swati Peng and Sangho. Spatio-temporal variations in cell-free layer formation near bifurcations of small arterioles. *Microvascular Research*, 2012.
- [60] Poiseuille. Recherches sur les causes du mouvement du sang dans les vaisseaux capillaires. *C. R. Acad. Sci*, 1835.
- [61] Aarts Prins and den Broek. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis*, 1988.
- [62] Qin M. Qi and Eric S. G. Shaqfeh. Theory to predict particle migration and margination in the pressure-driven channel flow of blood. *Physical Review Fluids*, 2(9):093102, September 2017.
- [63] Lavinia Miguel O. Peter R. Monica S. Qi Zhou, Joana Fidalgo and Timm Kruger. Spatio-temporal dynamics of dilute red blood cell suspensions in low-inertia microchannel flow. *Biophysical Journal*, 2020.
- [64] Yongzhi Qiu, David R. Myers, and Wilbur A. Lam. The biophysics and mechanics of blood from a materials perspective. *Nature Reviews Materials*, 4(5):294–311, March 2019.
- [65] Yazdan Rashidi, Othmane Aouane, Alexis Darras, Thomas John, Jens Harting, Christian Wagner, and Steffen M. Recktenwald. Cell-free layer development and spatial organization of healthy and rigid red blood cells in a microfluidic bifurcation. *Soft Matter*, 19(33):6255–6266, 2023.

-
- [66] Charoenphol Ryan, Supriya and Omolola. Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery (review). *Molecular Membrane Biology*, 2010.
- [67] Maryam Saadatmand, Takuji Ishikawa, Noriaki Matsuki, Mohammad Jafar Abdekhodaie, Yohsuke Imai, Hironori Ueno, and Takami Yamaguchi. Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube. *Journal of Biomechanics*, 44(1):170–175, January 2011.
- [68] Younggon Son. Determination of shear viscosity and shear rate from pressure drop and flow rate relationship in a rectangular channel. *Polymer*, 48(2):632–637, January 2007.
- [69] Juan Eduardo Sosa and Jesús Santana. Motilidad de escherichia coli y tripanosoma cruzi en sistemas confinados: Experimentos y modelación matemática. tesis phd. 2016.
- [70] Masako Sugihara-Seki, Tenki Onozawa, Nozomi Takinouchi, Tomoaki Itano, and Junji Seki. Development of margination of platelet-sized particles in red blood cell suspensions flowing through Y-shaped bifurcating microchannels. *Biorheology*, 57(2-4):101–116, February 2021.
- [71] Masako Sugihara-Seki and Nozomi Takinouchi. Margination of Platelet-Sized Particles in the Red Blood Cell Suspension Flow through Square Microchannels. *Micromachines*, 12(10):1175, September 2021.
- [72] et al Takuji Ishikawa, Takami Yamaguchi. Asymmetry of blood flow and cancer cell adhesion in a microchannel with symmetric bifurcation and confluence. *Biomed Microdevices*, 2010.
- [73] Teirlinck Tangelder and Reneman. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *Am. J. Physiol.*, 1985.
- [74] Aguila Torres and Jesús Santana. Captura y marginación de partículas en la microvasculatura de un modelo in vivo. tesis msc. 2019.
- [75] R. Tran-Son-Tay, S.P. Sutera, and P.R. Rao. Determination of red blood cell membrane viscosity from rheoscopic observations of tank-treading motion. *Biophysical Journal*, 46(1):65–72, July 1984.
- [76] Koohyar Vahidkhah, Scott L. Diamond, and Prosenjit Bagchi. Platelet Dynamics in Three-Dimensional Simulation of Whole Blood. *Biophysical Journal*, 106(11):2529–2540, June 2014.

-
- [77] Lima Vladimir and Fernandes. Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with diverging and converging bifurcation. *Biomicrofluidics*, 2011.
- [78] Rongin Wang and Xing. A micro-scale simulation of red blood cell passag through symmetric and asymmetric bifurcated vessels. *Scientific Reports*, 2016.
- [79] Tangelder Woldhuis and Reneman. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules. *Am. J. Physiol*, 1992.
- [80] Yeh and Eckstein. Transient lateral transport of platelet-sized particles in flowing blood suspensions. *Biophysical Journal*, 1994.
- [81] Hong Zhao, Eric S. G. Shaqfeh, and Vivek Narsimhan. Shear-induced particle migration and margination in a cellular suspension. *Physics of Fluids*, 24(1):011902, January 2012.
- [82] Qi Zhou, Joana Fidalgo, Miguel O. Bernabeu, Mónica S. N. Oliveira, and Timm Krüger. Emergent cell-free layer asymmetry and biased haematocrit partition in a biomimetic vascular network of successive bifurcations. *Soft Matter*, 17(13):3619–3633, 2021.
- [83] Gábor Závodszky, Britt Van Rooij, Ben Czaja, Victor Azizi, David De Kanter, and Alfons G. Hoekstra. Red blood cell and platelet diffusivity and margination in the presence of cross-stream gradients in blood flows. *Physics of Fluids*, 31(3):031903, March 2019.