



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

**Dinámica dispersiva de Glóbulos rojos en microcanales
con bifurcaciones y confluencias**

Tesis que presenta:

Jorge Luis Fernández López

Para obtener el grado de:

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

Director de la Tesis:
Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Apodaca, Nuevo León México.

Diciembre, 2024

© Derechos reservados por
Jorge Luis Fernández López
2024

La tesis presentada por Jorge Luis Fernández López fue aprobada por:

Dra. Blanca Estela Galindo Barraza, Sinodal

Dr. José Rafael Guzmán Sepúlveda, Sinodal

Dr. Jesús Manuel Santana Solano, Director

Apodaca, Nuevo León México., 12 de Diciembre de 2024

A mi papá, Ignacio Fernández Morales, que siempre me ha apoyado en todos mis proyectos de vida y demostrado su cariño, siendo él un gran ejemplo de trabajo y perseverancia. A mi mamá, Guadalupe López Apodaca, que siempre ha sido mi mejor amiga y que confió en mí desde siempre apoyándome en todas las terapias necesarias para llegar hasta este punto en mi vida, el cual hace años era impesable para todos los que me rodeaban excepto para ella.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. José Rafael Guzmán Sepúlveda por sus valiosas aportaciones y observaciones a este proyecto.

Agradezco a la Dra. Blanca Estela Galindo Barraza por su paciencia y disposición en resolver mis dudas en relación a este proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco al Cinvestav-Unidad Monterrey por facilitarme las instalaciones para realizar los experimentos necesarios para la culminación de este proyecto.

Agradezco a la Lic. Karen Garza y al Mtro. Pablo Alvarado por su valiosa ayuda en la extracción de sangre a los donantes voluntarios.

Agradezco a los donantes voluntarios. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

Agradezco a todos los profesores del Cinvestav-Unidad Monterrey, de los cuáles me llevo aprendizajes y habilidades valiosas.

Agradezco a mi familia; en especial a mis padres por su apoyo incondicional para terminar mi maestría.

Agradezco todos mis amigos que conocí durante la maestría de los cuáles recibí mucho cariño y ayuda de diferente índole para poder terminar mi grado académico.

Agradezco al Dr. Oscar Alejandro Águila Torres y al Mtro. Jorge Antonio Armenta Valenzuela por su valioso apoyo en la realización de este proyecto.

Por último, agradezco al Dr. Jesús Manuel Santana Solano por haberme aceptado trabajar en su laboratorio y por su gran ayuda en la culminación de este proyecto.

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Resumen	VI
Abstract	VIII
1. Introducción	1
1.1. Sistema Circulatorio	1
1.2. Reología de la sangre	2
1.2.1. Glóbulos Rojos	5
1.3. Hidrodinámica de una suspensión de glóbulos rojos	8
1.4. Interacción glóbulo rojo-pared	9
1.5. Interacciones hidrodinámicas entre glóbulos rojos y la dispersión inducida por el estrés de corte	13
1.6. Dispositivos microfluídicos	15
2. Antecedentes	17
2.1. Dinámica de glóbulos rojos en microcanales	17
2.1.1. Microcanales rectos	17
2.1.2. Microcanales con bifurcaciones y confluencias	18
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis y Objetivos	22
4.0.1. Hipótesis	22
4.0.2. Objetivo General	22
4.0.3. Objetivos Particulares	22
5. Metodología	23
5.1. Diseño y fabricación del dispositivo	23
5.1.1. Fotolitografía	23
5.1.2. Litografía Suave	25
5.2. Obtención y lavado de glóbulo rojos	27
5.3. Tinción de glóbulos rojos	28
5.4. Montaje Experimental	30
5.5. Videomicroscopía digital y procesamiento de imágenes	31

6. Resultados	38
6.1. Perfiles de velocidad de partículas y glóbulos rojos	38
6.2. Dinámica dispersiva de glóbulos rojos	45
6.3. Coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos vs <i>shear rate</i>	52
6.4. Coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos vs hematocrito	55
7. Discusión	59
8. Conclusiones y Perspectivas	63
8.0.1. Conclusiones	63
8.0.2. Perspectivas	63

Índice de Figuras

1.1.	Representación del conjunto de vasos sanguíneos existentes en el organismo. De derecha a izquierda se puede observar la arteria aorta, las arteriolas, los capilares, las vénulas y la vena cava. Imagen tomada y modificada de [1].	2
1.2.	A) Viscosidad de la sangre completa respecto al <i>shear rate</i> . Imagen tomada de [2]. B) Viscosidad con respecto al hematocrito. Imagen tomada de [3].	5
1.3.	Componentes principales que conforman la membrana de los glóbulos rojos. A) Imagen tomada por [4]. B) Imagen tomada por [5].	7
1.4.	Glóbulo rojo deformable que se aleja de la pared bajo la acción de un flujo cortante. Las flechas azules indican la dirección principal del flujo, la dirección del fluido extracelular cerca de la parte externa de la célula, y sobre la membrana. La flecha vertical indica la posición de la membrana que se encuentra más cercana a la pared. La parte inferior esquematiza el gradiente de presión ejercido sobre la membrana que se encuentra más cerca de la pared (línea gruesa negra). Figura modificada de la referencia [6].	11
1.5.	Representación del movimiento Tank-treading de los eritrocitos. Imagen tomada de [7].	12
1.6.	Colisión de glóbulos rojos dentro de un canal. Imagen tomada y modificada de [8].	15
2.1.	Modelo 3-D de Lattice-Boltzman para confluencias de glóbulos rojos y micropartículas. Imagen tomada y modificada de [9].	19
2.2.	A) Proyección plana de la capa libre de células, B) Proyección transversal de la capa libre de células en $x = 55 \mu\text{m}$ y C) $x = 158 \mu\text{m}$. Imágenes tomadas y modificadas de [9].	20
5.1.	Pasos de la litografía suave y en la fabricación de microdispositivos. Imagen izquierda de elaboración propia. Imagen de la derecha tomada y modificada de [10].	24
5.2.	A) Esquema del dispositivo a utilizar y las zonas de interés marcadas con rectángulos de diferentes colores. También se indica la longitud de las diferentes secciones. B) Réplica con el diseño después de realizar un experimento. Elaboración propia.	26
5.3.	A) Sección transversal del canal de entrada. B) Valores de los diferentes anchos en distintas zonas del dispositivo: 1) canal principal, 2) primera bifurcación, 3) segunda bifurcación, 4) primera confluencia y 5) segunda confluencia. Elaboración propia.	26

5.4.	Esquema del lavado de glóbulos rojos. 1) Muestra de 5 ml de sangre después de la extracción. 2) Muestra de sangre donde se separa el suero y los glóbulos rojos por centrifugación. 3) Glóbulos rojos después de haber extraído el suero. 4) Glóbulos rojos mezclados con PBS. 5) Glóbulos rojos separados del PBS con restos de suero. 6) Glóbulos rojos después de la extracción de PBS en una segunda lavada. Elaboración propia.	28
5.5.	Lavado de glóbulos rojos. A) Muestra que se obtiene directo del donante. B) Suero separado de los glóbulos rojos. C) Glóbulos rojos después de dos lavados. Elaboración propia.	28
5.6.	Tinción de glóbulos rojos. 1) Glóbulos rojos y PBS mezclados, 2) mezcla anterior con Vybrant-Dil [11], 3) los tres componentes dentro del horno a 37 °C durante 30 minutos y 4) resultado final de eritrocitos teñidos. Elaboración propia.	30
5.7.	Montaje Experimental. De izquierda a derecha se puede observar la bomba de jeringa y el dispositivo montado en la platina del microscopio con la luz de fluorescencia encendida. Elaboración propia.	31
5.8.	A) Flujo de glóbulos rojos a un hematocrito de 20 %. B) Flujo de glóbulos rojos a un hematocrito de 35 %. Elaboración propia.	32
5.9.	Rotación de los microcanales en una zona de interés utilizando el método de la transformada de Hough. A) Microcanal en una zona de interés y B) Microcanal rotado para colocarlo de forma horizontal. Elaboración propia.	34
5.10.	Perfil de niveles de gris a fluorescencia correspondiente a tres glóbulos rojos. Elaboración propia.	35
5.11.	Posiciones y trayectorias de los glóbulos rojos teñidos. A) Localización de la posición de eritrocitos marcados con círculos rojos. B) Trayectorias de glóbulos rojos teñidos representadas con líneas de diferentes colores. Elaboración propia.	35
5.12.	Localización de partículas esféricas fluorescentes. Elaboración propia.	37
6.1.	Desviación Estándar y mediana de los niveles de gris a lo ancho del canal principal. Elaboración propia.	42
6.2.	Perfiles de velocidad comparado con partículas de $2\mu\text{m}$ de diámetro. El hematocrito utilizado fue de 35 %. A) Velocidades en el canal principal junto con el perfil de Poiseuille. B) Velocidades en la primera bifurcación. C) Velocidades en la segunda bifurcación. D) Velocidades en la primera confluencia. E) Velocidades en la segunda confluencia. Las líneas continuas verdes y azules se obtuvieron de las ecuaciones 6.1 y 6.2 al promediar la componente z del perfil de Poiseuille. Elaboración propia.	43
6.3.	Perfil de velocidad de Poiseuille de un canal rectangular de $160\mu\text{m}$ de ancho (eje y) por $24\mu\text{m}$ de alto (eje z) correspondiente al canal principal, el cual se obtuvo usando las ecuaciones 6.1 y 6.2. Elaboración propia.	44
6.4.	Desplazamiento cuadrático medio de los glóbulos rojos en el canal principal (en rojo) y las partículas trazadoras (en verde). También se incluye una línea recta obtenida al calcular el valor del coeficiente de dispersión de los eritrocitos $W_y(t) = 2D_y t$. Elaboración propia.	49

6.5.	Distribuciones de densidad de probabilidad en la dirección y para tres tiempos diferentes (0.08, 0.16, y 0.24 s) obtenidos directamente con los desplazamientos en la dirección y (símbolos) y las obtenidas con la distribución de densidad de probabilidad gaussiana para el canal principal. Elaboración propia.	50
6.6.	Desplazamiento cuadrático medio de los glóbulos rojos en las diferentes regiones de interés. La línea negra fue calculada usando el coeficiente de dispersión en el intervalo de tiempo donde el DCM es difusivo. A) Primera bifurcación, B) segunda bifurcación, C) primera confluencia y D) segunda confluencia. Elaboración propia.	51
6.7.	Variación del shear rate en diferentes zonas del canal.1) Canal principal, 2) primera bifurcación, 3) segunda bifurcación, 4) primera confluencia y 5) segunda confluencia. Elaboración propia.	54
6.8.	<i>Wall shear rate</i> para distintas zonas del canal. De izquierda a derecha. Punto rojo (segunda bifurcación), punto negro (primera convergencia), punto rojo (primera bifurcación), punto rojo (canal principal) y el punto negro(segunda convergencia). La pendiente de la línea verde es de 0.0388. Elaboración propia.	55
6.9.	Coefficiente de dispersión vs el hematocrito para el canal principal y la segunda confluencia. La pendiente promedio de los 6 puntos es de 0.37. Elaboración propia.	57
6.10.	Coefficiente de dispersión en el canal principal con respecto a la posición tanto de los glóbulos rojos como de las partículas [12]. Elaboración propia.	58

Resumen

Los glóbulos rojos tienen un papel primordial en la vida de un organismo. Primero, contribuyen al transporte de oxígeno y dióxido de carbono a través del torrente sanguíneo y favorecen la migración de plaquetas y glóbulos blancos hacia las paredes de los vasos sanguíneos. Para que puedan realizar esta labor, los glóbulos rojos están sujetos a dos efectos hidrodinámicos: fuerza de sustentación y dispersión inducida por estrés de corte. A pesar de que se conocen algunos datos sobre la dinámica de los glóbulos rojos que fluyen en canales rectos, el entendimiento de la dinámica de estas células en geometrías más cercanas a una red vascular fisiológica (con bifurcaciones y confluencias y en microcanales de diferentes dimensiones) es muy limitado. Por lo tanto, en este proyecto de investigación se utilizó un modelo *in vitro* de una red vascular, para lo cual se implementó una red de canales con bifurcaciones y confluencias donde las dimensiones del microcanal de entrada del fluido va decreciendo con cada bifurcación hasta llegar a un valor mínimo y posteriormente tiene un crecimiento con cada confluencia hasta alcanzar las dimensiones del canal de entrada. Como fluido se utilizaron eritrocitos suspendidos en un medio isotónico de donantes masculinos sanos. Para poder calcular las trayectorias de las células por medio de un algoritmo computacional, se teñió una fracción de los glóbulos rojos y se mezcló con eritrocitos no teñidos con el fin de inducir colisiones entre células teñidas y no teñidas. La dinámica fue caracterizada por medio de los perfiles de velocidades, del desplazamiento cuadrático medio, y del coeficiente de dispersión de las células en la dirección transversal al flujo. La medición se llevó a cabo en 5 zonas de interés incluyendo bifurcaciones y confluencias. Todo esto se realizó con un hematocrito de 20-35 %, el cual representa el rango de hematocrito en la microvasculatura. Los resultados indican que la dinámica que muestran los glóbulos rojos es difusiva. Adicionalmente, se muestra que se puede extender la ecuación que predice un comportamiento lineal del coeficiente de dispersión, como función del gradiente de velocidad y del hematocrito, para una red de microcanales. Finalmente, se obtuvo el perfil del coeficiente de dispersión para mostrar la dependencia espacial del coeficiente de dispersión. Los resultados obtenidos también revelan un papel relevante de la fuerza de sustentación que impulsa a los glóbulos rojos hacia el centro del canal. En conjunto, estos resultados muestran

una metodología para evaluar la dependencia de las variables más importantes que determinan la difusión inducida por el estrés de corte sobre los glóbulos rojos en una red vascular modelo.

Abstract

Red blood cells play a vital role in the life of an organism. First, they contribute to transporting oxygen and carbon dioxide through the bloodstream and promote the migration of platelets and white blood cells to the walls of blood vessels. Red blood cells are subject to two hydrodynamic effects: lift force and shear stress-induced dispersion, which are necessary to perform this task. Although some data are known about the dynamics of red blood cells flowing in straight channels, understanding these cells' dynamics in geometries closer to a physiological vascular network (with bifurcations and confluences and in microchannels of different dimensions) is very limited. Therefore, in this research project, an *in vitro* model of a vascular network was used, for which a network of channels with bifurcations and confluences was implemented where the dimensions of the fluid inlet microchannel decreased with each bifurcation until reaching a minimum value and subsequently grow with each confluence until reaching the dimensions of the inlet channel. Erythrocytes suspended in an isotonic medium from healthy male donors were used as fluid. To calculate cell trajectories using a computational algorithm, a fraction of the red blood cells was stained and mixed with unstained red blood cells to induce collisions between stained and unstained cells. Velocity profiles, root mean square displacement, and dispersion coefficient of the cells in the direction transverse to the flow characterized the dynamics. Measurements were carried out in 5 areas of interest, including bifurcations and confluences. All of this was done with a 20-35 % hematocrit, representing the microvasculature's hematocrit range. The results indicate that the dynamics displayed by red blood cells are diffusive. Additionally, it is shown that the equation predicting a linear behavior of the dispersion coefficient, as a function of the velocity gradient and the hematocrit, can be extended for a microchannel network. Finally, the dispersion coefficient profile was obtained to show the spatial dependence of the dispersion coefficient. The results also reveal a relevant role of the lift force that propels the red blood cells towards the center of the channel. These results show a methodology to evaluate the dependence of the most important variables determining the shear stress-induced diffusion on red blood cells in a model vascular network.

1

Introducción

1.1 Sistema Circulatorio

El sistema circulatorio lo forman los pulmones, el corazón, y los vasos sanguíneos. Su función es transportar oxígeno y nutrientes hacia todo el organismo. Adicionalmente, gracias a este sistema, se extraen los desechos generados por las células. Uno de los órganos fundamentales de este sistema es el corazón. Este básicamente se encuentra seccionado en dos aurículas y en dos ventrículos, donde se encuentran los vasos sanguíneos [13], [14]. Los vasos sanguíneos se clasifican acorde a las funciones que cumplen en el organismo y a sus características. Las arterias son vasos sanguíneos con una gran elasticidad que tienen la función de abastecer de oxígeno a los tejidos, órganos y células del cuerpo. Las arterias se subdividen en elásticas (conductivas), musculares (distributivas) y arteriolas. Dentro de las arterias elásticas se encuentra la arteria aorta. Esta es la arteria con el mayor diámetro de todas. Las arterias musculares tienen un diámetro de aproximadamente $100 \mu m$. Su función principal es distribuir a una presión alta la sangre a todos los órganos. Por último, las arteriolas, gracias a su diámetro aproximado de 7 a $100 \mu m$, regulan la presión de las arterias. Otro tipo de vasos sanguíneos son los capilares, que están en mayor abundancia porque se encargan de conectar los vasos que llevan sangre al corazón y los que la regresan. Su diámetro es de aproximadamente de 5 a $10 \mu m$. Por último, las venas, las cuales presentan una menor elasticidad que las arterias, tienen la función de regresar al corazón los desechos generados por los diferentes tejidos, órganos y células del cuerpo. Las venas se subdividen en Vena Cava, venas (de tamaño mediano) y vénulas. La Vena Cava es la vena de mayor diámetro y está directamente conectada con el corazón al regresar la sangre con desechos. Después, las venas de tamaño mediano tienen un diámetro aproximado de 1 a 1.5

mm y estas son la conexión entre la Vena Cava y las Vénulas. Por último, las vénulas, de un diámetro de 8 a 100 μm , se encuentran directamente conectadas con los capilares para obtener la sangre con desechos [15], [16].

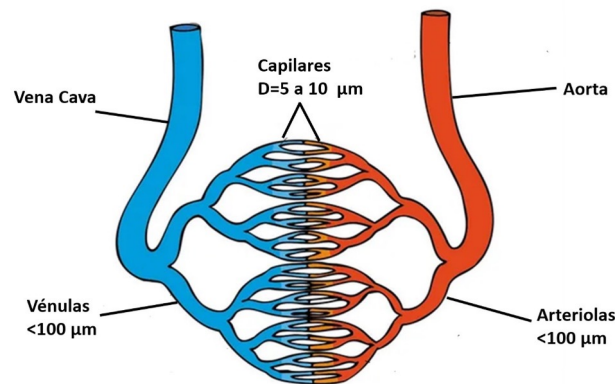


Figura 1.1: Representación del conjunto de vasos sanguíneos existentes en el organismo. De derecha a izquierda se puede observar la arteria aorta, las arteriolas, los capilares, las vénulas y la vena cava. Imagen tomada y modificada de [1].

1.2 Reología de la sangre

La sangre es un fluido que está compuesto por células o elementos formes conformados por glóbulos rojos, plaquetas, y glóbulos blancos dispersos en un medio acuoso que contiene diversos componentes como proteínas, lípidos, carbohidratos y electrolitos, y es conocido como plasma sanguíneo. En condiciones normales y en porcentaje de volumen, los eritrocitos ocupan el 44 %, las plaquetas el 0.3 %, los glóbulos blancos el 0.7 %, mientras que el plasma ocupa un 55 %. Esta composición compleja de la sangre es un indicativo de las múltiples funciones que debe de realizar en el organismo para lo cual realiza un recorrido por vasos sanguíneos de muy diversos calibres que van desde los 3 cm hasta capilares de 5 μm de diámetro, los cuales son más pequeños que el tamaño de los glóbulos rojos. Esta adaptabilidad para fluir a través de una compleja red de conductos sanguíneos de diferentes tamaños, interconectados de una forma compleja es posible debido a que la sangre es un fluido no newtoniano del tipo adelgazante, es decir, un fluido en el que su viscosidad disminuye conforme se aumenta el gradiente de

velocidad (*shear rate*). El gradiente de velocidad tiene su origen en la condición de frontera de no deslizamiento en las paredes de los vasos sanguíneos. Esto último implica que cuando la sangre fluye se generan láminas de fluido concéntricas que se desplazan a diferentes velocidades dentro del vaso sanguíneo, siendo las capas de fluido más cercanas a la pared las que fluyen a una menor velocidad, mientras que las otras capas van aumentando su velocidad conforme se acercan al eje del canal. Esto permite definir un gradiente de velocidad entre 2 láminas separadas por una distancia radial r como:

$$\gamma = \frac{\Delta v}{r}, \quad (1.1)$$

donde γ es el gradiente de velocidad, y Δv es la diferencia de velocidades entre las dos láminas. Comúnmente, la distancia r se mide partiendo de la pared del vaso con lo cual el gradiente de velocidad se denomina gradiente de velocidad de la pared (*wall shear rate*). Debido a este gradiente de velocidad, las células sanguíneas están sujetas a una fuerza externa (por unidad de área) que actúa en la dirección paralela a la dirección de flujo y es conocida como Esfuerzo cortante o estrés de corte (*shear stress*), la cual genera una deformación en los glóbulos rojos e induce una mayor interacción entre las diferentes componentes celulares. De acuerdo a la ley de Newton de la viscosidad, el esfuerzo cortante está definido como:

$$\tau = \frac{F}{A} = \frac{\mu dV}{y}, \quad (1.2)$$

donde μ es la viscosidad de corte y representa una medida de la resistencia entre láminas adyacentes. En un fluido newtoniano, la viscosidad μ no depende del gradiente de velocidad. Sin embargo, la viscosidad de este tipo de fluidos si depende de la temperatura, de la presión y de la composición molecular del fluido. En cambio, para un fluido no newtoniano, la viscosidad también depende del gradiente de velocidad (o del esfuerzo cortante), aumentando o disminuyendo su valor. En el caso particular de la sangre, la viscosidad está determinada por la viscosidad plasmática, por la concentración celular de la sangre (principalmente el hematocrito), por la deformación de los glóbulos rojos, así como por el gradiente de velocidad. Las propiedades reológicas de la sangre han sido caracterizadas para diferentes condiciones que incluyen sangre completa, glóbulos rojos rigidizados, y glóbulos rojos en buffer fosfato salino (PBS). La presencia de componentes celulares perturba a las líneas de flujo respecto a las líneas de flujo que se

presentan en el plasma sanguíneo con lo cual se genera un aumento en la viscosidad respecto a la viscosidad del plasma. En la Fig. 1.2 A) se muestra la dependencia típica de la viscosidad medida con un reómetro como función del gradiente de velocidad para sangre completa. Así mismo, en esta figura se muestra el comportamiento cualitativo que se espera para la viscosidad para los vasos sanguíneos más representativos presentes en el sistema circulatorio. En la parte venular, la viscosidad es mayor debido a que el gradiente de velocidad tiene valores más pequeños en comparación con la parte arterial. Esto último se debe a la tendencia reversible que tienen los glóbulos rojos a formar agregados conocidos como rouleaux (apilamiento de monedas) debido a la presencia de las proteínas incluyendo a la albumina, las globulinas, y el fibrinógeno. Conforme aumenta el gradiente de velocidad dichos agregados tienden a dispersarse debido a una mayor interacción entre glóbulos rojos teniendo como consecuencia que la viscosidad disminuye de valor, lo cual es representativo de la dinámica de glóbulos rojos en la parte arterial. Los valores más pequeños de la viscosidad corresponden a los capilares debido a que en este caso, los glóbulos rojos ocupan toda la luz del capilar. Adicionalmente, en la Fig. 1.2 B) se puede observar la dependencia de la viscosidad de la sangre como función del hematocrito. Esto ocurre debido a la perturbación de las líneas de flujo por la presencia de las componentes celulares, cuyo efecto aumenta con el incremento en la fracción de volumen que ocupan los eritrocitos (hematocrito).

El plasma sanguíneo presenta un comportamiento newtoniano con una viscosidad de 1.22 cP (a 37 °C), ligeramente mayor que la viscosidad del agua (0.7 cP). Esta diferencia respecto al agua pura es debido a que está constituido aproximadamente por un 90 % de agua, mientras que el 10 % restante lo constituyen más de 100 solutos entre los que se encuentran diferentes proteínas, electrolitos, nutrientes, gases respiratorios, hormonas y sustancias nitrogenadas. Las proteínas como la albúmina, las globulinas, y el fibrinógeno, contribuyen en gran medida al aumento de la viscosidad, siendo esta última la que contribuye en mayor medida a la viscosidad plasmática debido a que es una proteína alargada [17], [18], [19].

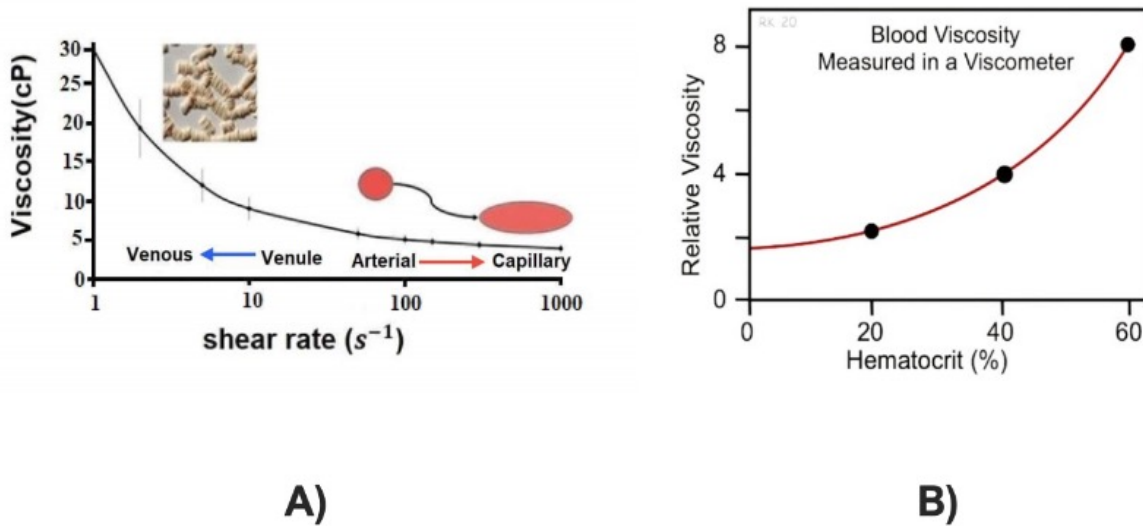


Figura 1.2: A) Viscosidad de la sangre completa respecto al *shear rate*. Imagen tomada de [2]. B) Viscosidad con respecto al hematocrito. Imagen tomada de [3].

1.2.1 Glóbulos Rojos

Los eritrocitos representan a las células más abundantes en el cuerpo humano y tienen un papel primordial en el transporte de oxígeno molecular desde los pulmones hacia todos los órganos del cuerpo, y para el traslado del gas de desecho que es el dióxido de carbono. El origen de los glóbulos rojos se encuentra en la médula ósea en un proceso de formación y desarrollo de células sanguíneas conocido como hematopoyesis [20]. Este proceso implica diferentes etapas de diferenciación celular y síntesis de hemoglobina comenzando con los hemocitoblastos (células madre de la médula ósea) e incluyendo las últimas etapas de diferenciación que incluyen la formación de normoblastos, reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros) y glóbulos rojos maduros. En los normoblastos se acumula la mayor parte de la hemoglobina y se expulsa la mayoría de los organelos, incluyendo el núcleo lo que da lugar al reticulocito que toma la forma de disco bicóncavo. En este proceso de maduración, los reticulocitos salen de la médula ósea y entran a la circulación sanguínea donde les toma un día para convertirse en glóbulos rojos maduros. En esta última etapa de maduración, los reticulocitos aún cuentan con ribosomas y mitocondrias para la síntesis del 35% de la hemoglobina restante. En un adulto sano, el número de reticulocitos o glóbulos rojos inmaduros representa 1-2% del total de eritrocitos en circulación. En reposo y suspendidos en un medio isotónico, los glóbulos rojos son células que tienen forma de disco bicóncavo con un diámetro de 6.2-8.2 μm (vista superior) y un

ancho de 2.0-2.5 μm (vista Lateral) con un grosor de aproximadamente 1.0-1.8 μm en la parte más delgada [8]. La membrana celular de los glóbulos rojos está compuesta por 2 capas, una capa externa formada por una bicapa lipídica embebida con proteínas transmembranales y unida a una segunda capa formada por una red de proteínas, principalmente tetrámeros de espectrina que conforman el citoesqueleto cortical de los eritrocitos. Otras proteínas que conforman el citoesqueleto son la anquirina, actina, y la proteína 4.1 R. La espectrina forma una red triangular bidimensional que está unida a la bicapa de lípidos mediante nodos de anclaje formados por dos complejos proteicos, el complejo proteico de anquirina y el complejo proteico 4.1 R, donde la separación entre los complejos proteicos es de aproximadamente 80 nm (ver Fig. 1.3). Adicionalmente, la red de espectrina tiene la propiedad de ser deformable, lo que resulta en una membrana celular altamente deformable ante un esfuerzo cortante al interactuar con otras células sanguíneas y a su vez le da la capacidad de regresar a su configuración de disco bicóncavo una vez que se encuentra en reposo. La función de la bicapa lipídica es el transporte selectivo de iones y nutrientes, mientras que la función de la red de espectrina es mantener la integridad de la célula ante los esfuerzos de corte que experimenta durante su recorrido por vasos sanguíneos de muy variado calibre, incluyendo los capilares. La tercera parte fundamental de la estructura de los glóbulos rojos es su estructura citoplasmática que está formado por otra proteína, la hemoglobina. La hemoglobina es una proteína que transporta oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) de los pulmones a los tejidos y viceversa. A su vez, esta proteína es la que provoca que estas células tengan un color rojo [21].

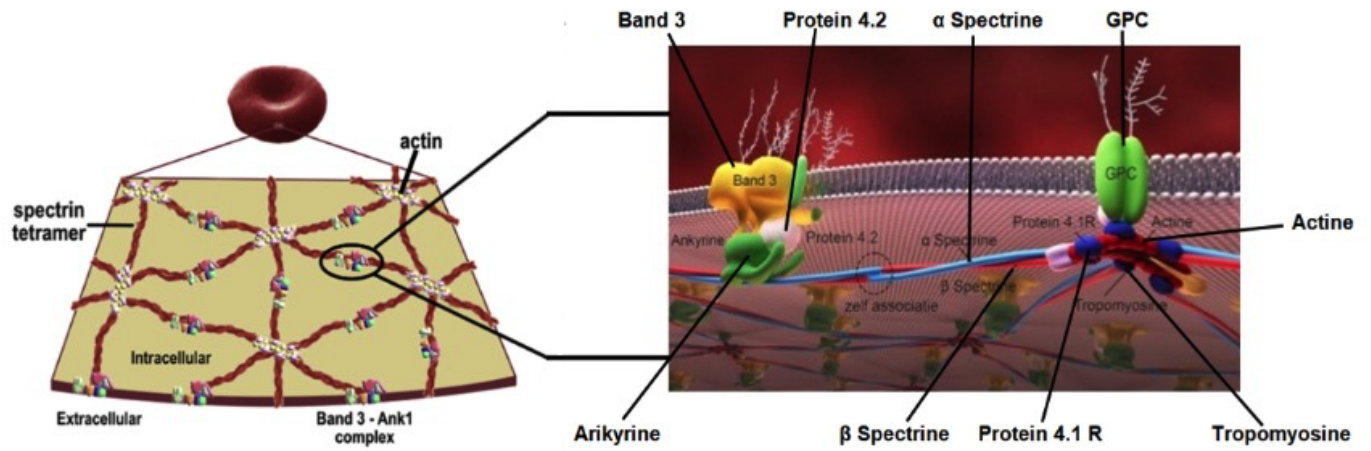


Figura 1.3: Componentes principales que conforman la membrana de los glóbulos rojos. A) Imagen tomada por [4]. B) Imagen tomada por [5].

1.3 Hidrodinámica de una suspensión de glóbulos rojos

Los glóbulos rojos al estar sujetos a un flujo cortante son deformados por las líneas de flujo del fluido, y a su vez dichas células perturban las líneas de flujo a su alrededor. Dada una célula de referencia, esta va a afectar a la dinámica de las células vecinas, y al mismo tiempo las perturbaciones generadas por las células vecinas afectan la dinámica de dicha célula de referencia. Así, reaccionando a la velocidad local del fluido circundante, los eritrocitos experimentan interacciones hidrodinámicas (IH) entre las células y entre dichas células y las paredes de los vasos sanguíneos, es decir, es un tipo de interacción mediado por el plasma sanguíneo o en general por el fluido en el que están suspendidas las células. Para describir la hidrodinámica de un fluido alrededor de los glóbulos rojos se parte de las ecuaciones de Navier-Stokes, las cuales están basadas en la mecánica de medios continuos y son obtenidas aplicando el principio de conservación del momento y de la masa. Para el caso de un fluido incompresible con velocidad $\vec{v}(r, t)$, presión p , densidad ρ y una viscosidad de corte η , dichas ecuaciones están dadas por:

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla P + \eta \nabla^2 \vec{v}, \quad (1.3)$$

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0. \quad (1.4)$$

La primera ecuación es la segunda ley de Newton para un fluido viscoso, y la segunda corresponde a la condición de incompresibilidad del fluido. Más explícitamente, el término de la izquierda en la ecuación 1.3 corresponde al producto de la masa por la aceleración de un elemento infinitesimal de volumen del fluido, mientras que el término de la derecha corresponde a la sumatoria de todas las fuerzas que actúan sobre el elemento infinitesimal de volumen, que en este caso incluye el gradiente de presión y las fuerzas viscosas (último término de la ecuación). La ecuación 1.4 se obtiene al realizar un balance de la masa que entra y que sale de un elemento infinitesimal de volumen. Al considerar que la densidad del fluido no cambia con el tiempo, la ecuación de la conservación de la masa se reduce a la ecuación 1.3 en donde no aparece explícitamente la densidad. Para simplificar estas ecuaciones para el caso de la microvasculatura, es necesario normalizar la velocidad ($\vec{v}(x, y, z)$), la posición ($\vec{r}(x, y, z)$) y el tiempo (t), por parámetros que caracterizan al sistema, es decir, una velocidad media U_0 , una longitud del sistema L_0 y un tiempo característico $\frac{L_0}{U_0}$, que resulta en:

$$R_e \left(\frac{\partial \vec{v}'}{\partial t'} + (\vec{v}' \cdot \nabla') \vec{v}' \right) = -\nabla' P' + \eta \nabla'^2 \vec{v}', \quad (1.5)$$

donde la presión fue normalizada con $\frac{L_0}{\eta U_0}$ y se denotó como P' . Así mismo, las variables primadas significan variables adimensionales. En esta ecuación emerge el número de Reynolds (R_e), que está dado como la razón entre fuerzas inerciales y viscosas (ecuación 1.6). Adicionalmente, el primer término entre paréntesis representa a los cambios en la velocidad del fluido a lo largo del tiempo, mientras que el segundo término representa una aceleración convectiva causada por el cambio de la velocidad del fluido debido a una transición en la geometría del ducto en el que se transporte el fluido.

$$R_e = \frac{\rho U_0 L_0}{\eta} \quad (1.6)$$

Para el caso de la microvasculatura, con un vaso sanguíneo de $30 \mu m$, con una velocidad media de $1500 \frac{\mu m}{s}$ y con una viscosidad dinámica del agua a $37^\circ C$, $R_e = 0.06$. Por lo tanto, R_e puede aproximarse a cero, es decir, el término de la izquierda se puede igualar a cero debido a que los efectos inerciales son despreciables. Tomando en cuenta lo anterior y regresando a las variables originales, las ecuaciones de Navier-Stokes se reducen a las ecuaciones de Stokes (ecuaciones 1.4 y 1.7):

$$\eta \nabla^2 \vec{v} - \nabla p = 0. \quad (1.7)$$

1.4 Interacción glóbulo rojo-pared

La interacción hidrodinámica de glóbulos rojos con la pared de los vasos sanguíneos da lugar a la generación de la capa libre de células, que debe su origen a que existe una baja o nula concentración de glóbulos rojos en la periferia de los vasos sanguíneos. Esta capa determina en cierta medida las propiedades dinámicas de todas las células sanguíneas [20]. Este efecto surge como consecuencia de una fuerza de sustentación que experimentan los glóbulos rojos que fluyen bajo la acción de un esfuerzo cortante y que tiende a transportar a las células gradualmente en la dirección transversal a la dirección del flujo, hacia el centro de los vasos. Cabe señalar que para que exista una fuerza de sustentación se debe de considerar que las ecuaciones de Stokes no dependen del tiempo [22]. Por ejemplo, el caso de una microesfera sólida con flotabilidad neutra que fluye cerca de la pared de un microcanal no va a experimentar ningún movimiento

en la dirección transversal a la dirección del flujo debido a su simetría longitudinal. Es decir, si suponemos que una partícula realiza un desplazamiento que la aleje de la pared por un efecto hidrodinámico, al invertir la dirección del flujo dicha partícula emigraría hacia la pared lo cual resulta contradictorio y por lo tanto el desplazamiento de la partícula ocurre únicamente en la dirección del flujo. En contraste, la alta deformabilidad de los eritrocitos provee el mecanismo para la pérdida de la simetría longitudinal de la célula, lo que da lugar a que esta pueda transportarse transversalmente. Existen varios efectos que contribuyen a la formación de la capa libre de células. En primer lugar, el tamaño de los eritrocitos impide que el centro de masa de dicha célula se encuentre a una distancia menor de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ respecto a la superficie del microcanal. En segundo lugar, las células experimentan una deformación debido a la acción del esfuerzo cortante y a la interacción hidrodinámica con la superficie del microcanal, lo cual tiende a alejarlas de las paredes. En tercer lugar, el gradiente de velocidad genera una fuerza de sustentación que tiende a llevar a las células hacia el centro del canal independientemente de la interacción de las células con las paredes [22], [23]. Para describir la dinámica de células que se encuentran cerca de las paredes resulta más importante el primer y segundo efecto. Por lo tanto, en la descripción que sigue no se va a considerar el tercer efecto.

Uno de los primeros estudios que se realizaron para entender la migración celular en la dirección transversal al flujo fue el realizado por Isabelle Cantat y colaboradores en el año 1999 [24]. Estos autores estudiaron teóricamente y por medio de simulaciones computacionales algunos aspectos de la dinámica de los glóbulos rojos (o células altamente deformables en general) cuando estos fluyen cerca de una pared (Fig. 1.4).

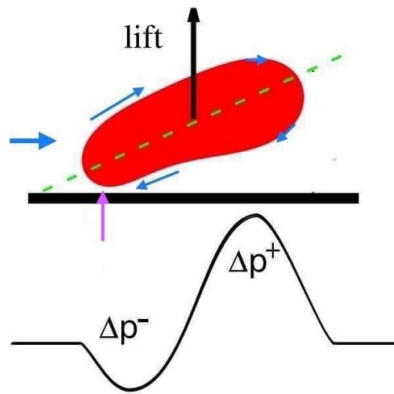


Figura 1.4: Glóbulo rojo deformable que se aleja de la pared bajo la acción de un flujo cortante. Las flechas azules indican la dirección principal del flujo, la dirección del fluido extracelular cerca de la parte externa de la célula, y sobre la membrana. La flecha vertical indica la posición de la membrana que se encuentra más cercana a la pared. La parte inferior esquematiza el gradiente de presión ejercido sobre la membrana que se encuentra más cerca de la pared (línea gruesa negra). Figura modificada de la referencia [6].

En su estudio consideran el caso de un eritrocito bidimensional que se encuentra fluyendo muy cerca de una pared de tal forma que la distancia entre la parte de la membrana más cercana a la pared y la pared es del orden de los 50 nm. Es decir, se considera la formación de una película delgada de fluido de tal forma que se puede utilizar la aproximación de lubricación. Bajo estas condiciones, las líneas de flujo del fluido extracelular son modificadas por la presencia de dicha célula. A su vez, estas líneas de flujo inducen cambios en la curvatura de la membrana celular. Al resolver las ecuaciones de Stokes tomando en cuenta únicamente el fluido que se encuentra alrededor del punto de mínima distancia entre la membrana y la pared (marcado con una flecha de color magenta), se encuentra que, si la curvatura de membrana en la parte derecha es menor que la curvatura en la parte izquierda, se puede inducir un perfil de presión sobre la membrana (en la dirección y) que induce una fuerza que puede alejar a la célula de la pared (fuerza de sustentación). Esta asimetría longitudinal en la curvatura de la membrana causada por la alta deformación de la célula y por la acción del fluido tiene como consecuencia que los glóbulos rojos tiendan a migrar hacia el centro del vaso, es decir, al punto donde el gradiente de velocidades es igual a cero.

Para demostrar experimentalmente la dinámica de migración de los glóbulos rojos hacia el centro de un microcanal, M. Oishi y colaboradores [7] realizaron un experimento donde hacen fluir eritrocitos con un flujo laminar en un microcanal con dimensiones de $30 \mu\text{m}$ de alto por $40 \mu\text{m}$ de ancho. Así mismo, los experimentos se realizaron con un microscopio confocal y una

platina móvil de tal forma que la célula siempre se mantiene en el centro del campo de visión a pesar de que las células van fluyendo por el microcanal (ver Fig. 1.5). Para poder seguir la dinámica de la membrana de los glóbulos rojos se anclaron micropartículas fluorescentes de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro a la membrana con el fin de poder seguir la dinámica de la membrana celular. Adicionalmente, al medio extracelular también se le agregaron micropartículas trazadoras con el fin de poder determinar la deformación de las líneas de flujo en la vecindad de las células. Estos autores encontraron que la velocidad de la membrana de la célula coincide con la dirección y magnitud del fluido circundante. Esto último implica que se cumplen las condiciones de frontera de no deslizamiento sobre la membrana celular. Adicionalmente, se encontró que la velocidad de la membrana es mayor para la zona que se encuentra cerca del centro del canal (línea vertical a trazos) respecto a la velocidad de la membrana cercana a la pared del microcanal, lo cual sugiere algún tipo de estiramiento en la membrana de los glóbulos rojos. Esta observación ha sido corroborada con simulaciones computacionales que muestran la correlación entre la velocidad del fluido y la presión alrededor de un eritrocito, lo cual da lugar a la migración celular [25], [17]. A esta dinámica que presentan los glóbulos rojos donde la membrana se encuentra rotando en el plano en donde se aplica el gradiente de velocidad se le conoce como dinámica de Tank-treading.

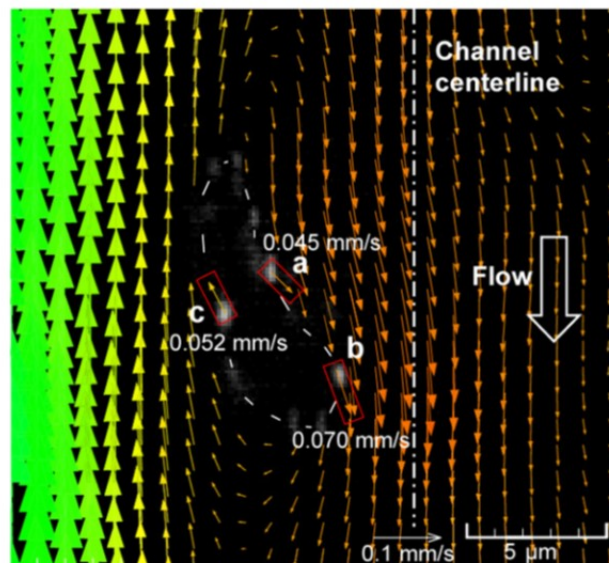


Figura 1.5: Representación del movimiento Tank-treading de los eritrocitos. Imagen tomada de [7].

1.5 Interacciones hidrodinámicas entre glóbulos rojos y la dispersión inducida por el estrés de corte

Cuando hay una concentración finita de eritrocitos fluyendo en un vaso sanguíneo se inducen colisiones entre glóbulos rojos de modo que se generan desplazamientos de dichas células en la dirección transversal a la dirección del flujo (ver Fig. 1.6). En estas condiciones de flujo cortante, las células en diferente posición lateral se desplazan a diferente velocidad y pueden colisionar dando como resultado un desplazamiento transversal de las células respecto a su posición antes de la colisión. Es decir, después de cada colisión las células ya no regresan a la posición lateral que tenían antes de la colisión como consecuencia de la deformación de su membrana y de las interacciones hidrodinámicas entre los glóbulos rojos. Esta interacción o colisión entre células es puramente hidrodinámica, es decir, inducida por la perturbación que causa cada célula en el fluido, lo cual modifica la dinámica de las células vecinas y a su vez su dinámica se ve afectada por las células vecinas [23]. Algunos estudios indican que el rango de interacción hidrodinámica entre 2 eritrocitos es del orden de 4 veces el radio de las células [26], [27]. A partir de un hematocrito de aproximadamente 10 % [28], los eritrocitos comienzan a colisionar con las células vecinas, lo que da lugar a una serie de desplazamientos aleatorios en la dirección transversal al flujo para dichas células. Tomando en cuenta un número grande de colisiones entre células, esta dinámica celular se puede modelar como una dinámica difusiva [29]. Es decir, una dinámica que considera que las células continuamente están realizando desplazamientos aleatorios en la dirección transversal a la dirección del flujo debido a las colisiones entre células de modo que el desplazamiento cuadrático medio tiene una dependencia lineal con el tiempo y un coeficiente de dispersión asociado con la siguiente ecuación:

$$\langle \Delta y^2 \rangle = 2D_y t, \quad (1.8)$$

donde y es la dirección transversal a la dirección del flujo, D es el coeficiente de dispersión y t es el tiempo. En este caso se le denomina coeficiente de dispersión para diferenciarlo del coeficiente de difusión de partículas brownianas. Es importante también notar la diferencia del coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos (ecuación 1.9) respecto al coeficiente de difusión browniano traslacional para una partícula esférica,

$$D_y = k_y a^2 \dot{\gamma} Hct \quad (1.9)$$

el cual depende del cociente entre la energía térmica y el coeficiente de fricción dado por la ley de Stokes ($\frac{k_B T}{6\pi\eta a}$), donde K_B es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad dinámica, T es la temperatura absoluta, y a es el radio de la partícula. En el caso de la difusión inducida por estrés de corte, el coeficiente de dispersión es proporcional a la frecuencia de colisión entre células, es decir, depende de la sección transversal de colisión entre dos células (dada por el cuadrado del radio efectivo de las células- a^2), de la velocidad relativa entre células (dado por el gradiente de velocidad o tasa de corte- $\dot{\gamma}$), de la cercanía entre células (hematocrito- Hct) y de las interacciones hidrodinámicas entre los eritrocitos y la deformación de la membrana en la colisión- (k_y). A la constante k_y también se le conoce como coeficiente de dispersión adimensional. Esta ecuación se adaptó al caso de la dispersión de eritrocitos tomando en cuenta estudios previos que se llevaron a cabo sobre la dinámica dispersiva inducida por el estrés de corte de suspensiones de partículas esféricas [30], [31], por lo que aún queda por comprobar en que condiciones experimentales dicha ecuación puede describir correctamente la dinámica dispersiva de los eritrocitos.

En el caso de las partículas esféricas, el coeficiente de dispersión se calcula formalmente en base al desplazamiento cuadrático promedio tomando en cuenta que la tasa de colisión depende de la densidad de partículas multiplicada por la distancia relativa entre partículas (dependiente del gradiente de velocidad) e integrada por todas las posibles separaciones entre partículas (en la dirección transversal a la dirección del flujo) que dan lugar a una colisión. Esta última consideración implica que esta ecuación solo toma en cuenta la interacción entre pares de células, además de que no considera la influencia de la interacción de las células con las paredes del vaso. Por lo tanto, su validez para hematocritos grandes (mayores al 20 %) y para el flujo de glóbulos rojos en microcanales con diferentes secciones transversales o en general para diferentes geometrías aún está por ser evaluada [28], [32].

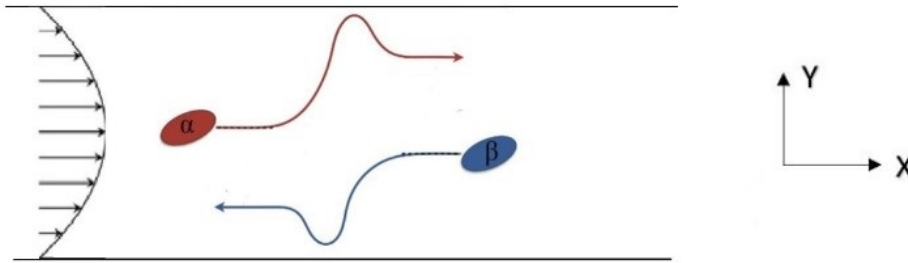


Figura 1.6: Colisión de glóbulos rojos dentro de un canal. Imagen tomada y modificada de [8].

1.6 Dispositivos microfluídicos

La microfluídica estudia el transporte de fluidos en compartimentos conectados por una red de microcanales con dimensiones típicas en un rango que varía desde varias micras hasta centenas de micras [10]. A este tipo de arreglos se le puede incluir diferentes componentes eléctricos, magnéticos, o mecánicos para automatizar el control de los fluidos lo cuales se pueden incorporar en un delgado sustrato de plástico con dimensiones de varios centímetros cuadrados. Las diferentes componentes de un dispositivo de este tipo se realizan para un número muy grande de tareas como lo es en estudios de transporte de fluidos, para realizar reacciones químicas, como separadores de componentes celulares, y para el análisis de pequeños volúmenes de fluidos de una manera muy controlada. Los primeros estudios de fluidos en este tipo de dispositivos se realizaron en los años 80 del siglo pasado como una herramienta emergente para el desarrollo de la biología molecular [33]. No obstante, su uso fue muy poco útil en las primeras 2 décadas debido a que inicialmente se fabricaban utilizando técnicas similares a las usadas en la microelectrónica que resultaron poco prácticas para el manejo de fluidos. Sin embargo, la popularidad de la microfluídica comenzó hasta hace un poco más de dos décadas [10] cuando se comenzó a utilizar una técnica de fabricación conocida como litografía suave, la cual está basada en el uso de un material de plástico flexible, transparente, y que tiene la propiedad de ser biocompatible. Con esta modificación es posible realizar dispositivos muy complejos que involucran compartimentos que pueden emular componentes biológicos como lo es una red vascular para caracterizar diferentes propiedades de transporte de las componentes sanguíneas. El material que más se utiliza para la fabricación de los dispositivos es el dimetilpolisiloxano o polidimetilsiloxano (PDMS), que es una especie de silicona que tiene muchas propiedades fisicoquímicas que lo

han hecho muy popular para el estudio de un número creciente de fenómenos que se presentan en la biología y la química.

Un chip de este tipo tiene varias analogías con los chips de la microelectrónica, pero a diferencia de estos (en los que se hacen fluir cargas eléctricas), aquí se transportan fluidos a través de una compleja red de microcanales y otros microcompartimentos. Una de las aplicaciones que ha tenido la microfluídica es que ha permitido la fabricación de modelos microvasculares *in vitro* con el fin de poder emular diferentes fenomenologías que ocurren en el sistema circulatorio. Para esto se han desarrollado técnicas que permiten fabricar microcanales rectangulares, circulares, y semicirculares para estudiar diferentes aspectos de la microcirculación. Adicionalmente, estos dispositivos permiten que se vaya incrementando la complejidad del dispositivo con el fin de acercarlo a un sistema *in vivo*. Esto último incluye experimentos donde se hacen crecer células endoteliales sobre las paredes de microcanales para imitar algunos aspectos patológicos donde la microvasculatura juega un papel importante [34], [35]. Este tipo de estudios también van encaminados a fabricar dispositivos para imitar algunos aspectos de órganos humanos [36]. Una parte fundamental para poder realizar una caracterización completa de estas componentes microfluídicas es la circulación sanguínea, particularmente la dinámica de los glóbulos rojos, por su influencia en el resto de las células que componen la sangre y en las células que conforman los diferentes órganos y tejidos [37], [38].

2

Antecedentes

2.1 Dinámica de glóbulos rojos en microcanales

2.1.1 Microcanales rectos

Desde el punto de vista experimental, los estudios para tratar de elucidar la dinámica de los glóbulos rojos tienen un poco menos de 2 décadas, en donde la amplia mayoría de los trabajos se ha orientado a estudiar el caso de flujo sanguíneo en microcanales rectos variando el hematocrito, el *shear rate*, y el diámetro de los vasos. Uno de estos estudios fue realizado por Rui Lima y colaboradores en el 2008 [28]. Estos autores midieron el coeficiente de dispersión de glóbulos rojos que fluyen en capilares cilíndricos de vidrio de 50 y 100 μm de diámetro. Además del diámetro, también realizaron un barrido del hematocrito desde 2 al 35% . Para realizar este estudio fue necesario teñir una parte de los glóbulos rojos con el fin de seguir sus trayectorias con la técnica de microscopía confocal. Entre sus resultados más destacados está el hecho de que observan un incremento en el coeficiente de dispersión al aumentar el hematocrito. Cabe señalar que para obtener el coeficiente de dispersión estos autores calculan el desplazamiento cuadrático medio dividido entre $2t$ (ecuación 1.8). Adicionalmente, mostraron que existe una dependencia radial del coeficiente de dispersión obteniendo un valor máximo para dicho coeficiente en la zona que se encuentra a una distancia (medida respecto al centro del capilar) entre $0.4 R$ y $0.8 R$, y un valor mínimo para dicho coeficiente entre $0 R$ y $0.2 R$, donde R es el radio del capilar [28]. Estos resultados son explicados al tomar en cuenta las interacciones hidrodinámicas entre células y a la dependencia radial del *shear rate* y del hematocrito. Sin embargo, también se especula que también contribuyen otros fenómenos, como lo son las fuerzas de lubricación que están presentes

en la región cercana a la pared del vaso. Algunos de los efectos que causa la interacción entre glóbulos rojos en su dinámica dispersiva no se han obtenido directamente con el estudio de dichas células. En cambio, se han obtenido al agregar micropartículas con el fin de emular a las plaquetas en el torrente sanguíneo e indirectamente obtener información sobre la dinámica de los eritrocitos al variar diferentes parámetros que están presentes en la microvasculatura. Entre estos estudios está el realizado por Maryam Saadatmand y colaboradores en el año 2010 [39]. Estos autores realizaron un experimento con ciertas similitudes al de Rui Lima y colaboradores, ya que utilizaron un capilar de vidrio con un diámetro de $50 \mu\text{m}$. Sin embargo, en este estudio emplearon partículas fluorescentes de $1 \mu\text{m}$ de diámetro. En este caso, obtuvieron que el coeficiente de dispersión (D_{yy}) tiene una dependencia lineal con respecto a la velocidad de flujo (Q) y al hematocrito (Htc), tal y como predicen las ecuaciones 1.8 y 1.9 [28]. Cabe señalar que dichas ecuaciones se han propuesto para describir tanto la dinámica de glóbulos rojos como de micropartículas que fluyen en presencia de glóbulos rojos. Para el caso de las partículas, la constante adimensional k_y depende de las propiedades elásticas de las células que van fluyendo junto con las partículas. Debido a la interacción entre los glóbulos rojos y las partículas, las partículas llevan a cabo desplazamientos aleatorios en el plano perpendicular a la dirección del flujo de tal forma que con el tiempo terminan migrando hacia la periferia de los vasos. Este último fenómeno es conocido como marginación. Con los resultados de este trabajo y el de otros autores que no se describen en este proyecto se espera que las ecuaciones 1.8 y 1.9 sean válidas para describir la dinámica dispersiva de los glóbulos rojos en un flujo cortante. Sin embargo, como se describió anteriormente, la microvasculatura está compuesta de una red de vasos en donde están presentes bifurcaciones y convergencias por lo que es necesario profundizar más en la dinámica difusiva de los glóbulos rojos en situaciones más realistas.

2.1.2 Microcanales con bifurcaciones y confluencias

Con el fin de acercarse a situaciones más realistas respecto al estudio del flujo sanguíneo, Christian Bacher y colaboradores en el 2018 [9] realizaron un estudio sobre la dinámica de glóbulos rojos y micropartículas (de $3 \mu\text{m}$ de diámetro) en una bifurcación y en una confluencia y sus efectos en la marginación de las partículas. Para este objetivo, realizaron una simulación de las bifurcaciones y las confluencias con un modelo de geometría en 3D de Lattice-Boltzman (ver Fig. 2.1). Para elaborar las plaquetas y los glóbulos rojos, se utilizó el método de frontera inmersivo. Entre sus resultados más relevantes destaca que debido a la formación de la capa libre de células en las ramas laterales y conforme los glóbulos rojos avanzan hacia la confluencia (Fig. 2.1), estos tienden a formar una capa libre de células central en la rama principal. Es

decir, además de la región libre de células que se encuentra cerca de las paredes, por cada confluencia se forma una capa libre de células adicional. Esta capa libre de células es del orden de $1.5 \mu\text{m}$ de ancho y de acuerdo con esta simulación, tiene una extensión del orden de $100 \mu\text{m}$. Esta nueva capa libre de células se espera que termine desapareciendo a distancias mayores de $100 \mu\text{m}$ debido a la dispersión de los glóbulos rojos. En la Fig. 2.2 se muestran imágenes del flujo sanguíneo en el plano xy y en el plano yz para ilustrar la evolución de la capa libre de células central desde su formación al inicio de la confluencia hasta desaparecer después de $100 \mu\text{m}$ de la confluencia. Adicionalmente, está simulación considera que las micropartículas se encuentran marginadas en las ramas que terminan en la confluencia. Esto último tiene como consecuencia que en la capa libre de células se van a encontrar fluyendo micropartículas, es decir, van a ir fluyendo en el centro del vaso hasta que emigren nuevamente hacia las paredes por las interacciones con los eritrocitos [9]. Estas simulaciones dejan varias interrogantes sobre el papel que tiene la geometría de los microcanales en la dinámica dispersiva de los glóbulos rojos y plaquetas en situaciones más realistas. Entre los efectos geométricos se encuentran el ángulo en las bifurcaciones y confluencias, la distancia entre bifurcaciones, los cambios en los diámetros en las diferentes ramas, entre otros.

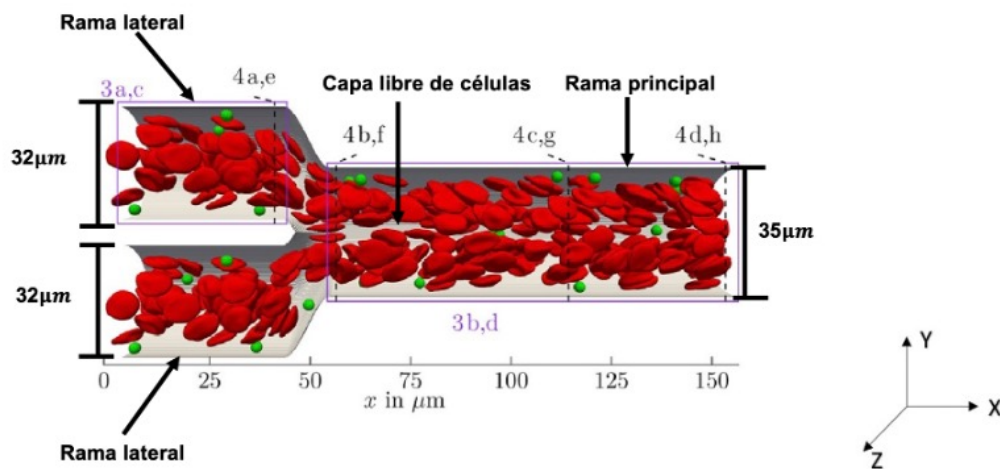


Figura 2.1: Modelo 3-D de Lattice-Boltzman para confluencias de glóbulos rojos y micropartículas. Imagen tomada y modificada de [9].

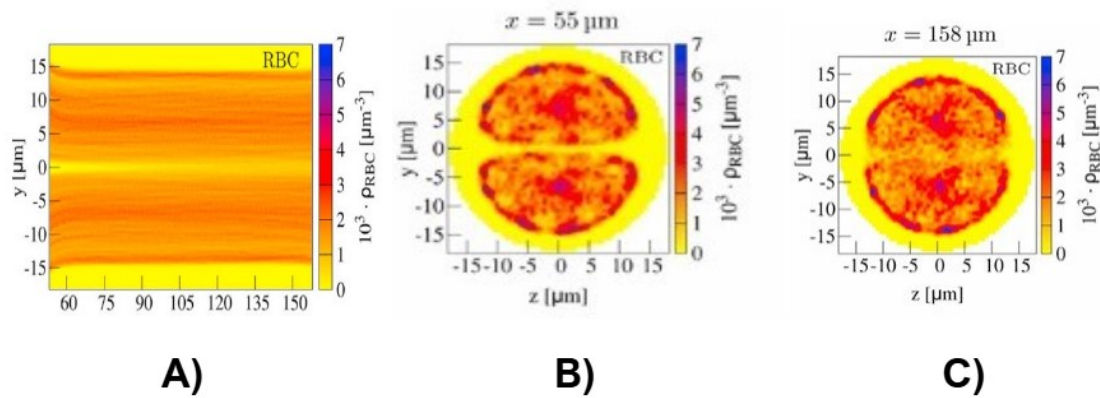


Figura 2.2: A) Proyección plana de la capa libre de células, B) Proyección transversal de la capa libre de células en $x = 55 \mu\text{m}$ y C) $x = 158 \mu\text{m}$. Imágenes tomadas y modificadas de [9].

3

Planteamiento del problema

La ecuación para el coeficiente de dispersión (ecuación 1.9) se construyó básicamente tomando en cuenta la consistencia en las unidades y suponiendo que la dinámica celular está dominada por interacciones entre pares de células y que dichas interacciones se llevan a cabo lejos de las paredes del microcanal. Estas consideraciones están lejos de cumplirse en una red vascular compleja. Por ejemplo, el último antecedente sobre la dinámica de glóbulos rojos descrito en la sección anterior deja claro que el incluir geometrías más realistas puede dar lugar a un comportamiento más complejo en la dinámica de los glóbulos rojos. Adicionalmente, en otro trabajo reciente [40] también se realizó un estudio computacional de la dinámica de glóbulos rojos en un sistema microvascular modelo con varias bifurcaciones y confluencias cuyo diámetro máximo de los vasos es del orden de los $24 \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos en estos trabajos resaltan la importancia de estudiar la dinámica de glóbulos rojos en geometrías más realistas y sobre todo la importancia de realizar estudios experimentales para compararlos con los resultados derivados de trabajos computacionales. Por lo tanto, para poder describir la dinámica en sistemas más realistas, donde puede cambiar la geometría, el hematocrito, el gradiente de velocidad es necesario revisar si la ecuación 1.9 describe correctamente la dinámica celular en situaciones donde las células interactúan con las paredes de una red de microcanales con bifurcaciones y confluencias.

4

Hipótesis y Objetivos

4.0.1 Hipótesis

La ecuación para el coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos en un canal recto se sigue manteniendo para una red de microcanales ajustando el valor local del *shear rate* para cada rama.

4.0.2 Objetivo General

Estudiar la dinámica de los glóbulos rojos mediante el coeficiente de dispersión para elucidar la dependencia con el *shear rate* y el hematocrito en una red de microcanales con bifurcaciones y confluencias.

4.0.3 Objetivos Particulares

1.- Demostrar que existen diferencias en la dinámica de los glóbulos rojos en las distintas zonas de interés de la red de microcanales.

2.- Determinar el efecto del *shear rate* y el hematocrito en el coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos en diferentes sitios del dispositivo.

5

Metodología

5.1 Diseño y fabricación del dispositivo

5.1.1 Fotolitografía

La técnica de fotolitografía consiste en transferir patrones geométricos impresos en una fotomáscara a la superficie de una oblea de silicio (University Wafers) para posteriormente usarla en la fabricación de un dispositivo microfluídico (Fig. 5.1).

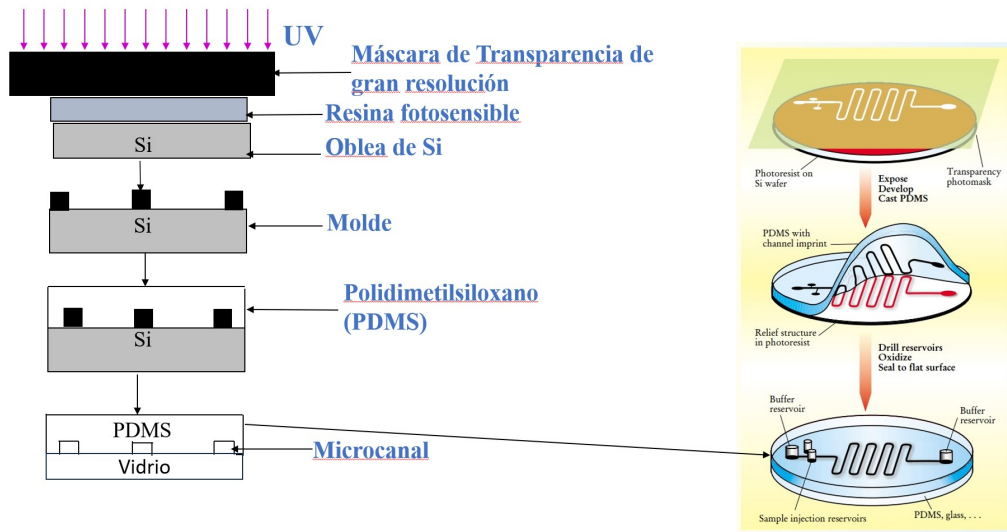


Figura 5.1: Pasos de la litografía suave y en la fabricación de microdispositivos. Imagen izquierda de elaboración propia. Imagen de la derecha tomada y modificada de [10].

La máscara consiste en una hoja de plástico transparente de un polímero conocido como mylar que tiene impreso (Cad Art Services) el dibujo del dispositivo que se quiere fabricar. Los pasos involucrados en esta técnica son: limpieza de la oblea, la formación de una película uniforme de una resina fotosensible (SU-8 2015) a luz UV sobre la oblea, cocido suave, alineación de la máscara en la oblea, exposición de la fotoresina a luz UV, poscoccido, revelado (SU-8 Developer), y cocido final. El paso de la formación de la película de resina sobre la oblea se logra depositando resina sobre la oblea y generando la película de resina de una determinada altura que depende de la viscosidad de la resina y de las rampas de velocidad de giro por medio de un Spin Coater (Brewer Science, Inc.). El cocido suave, realizado a 95 °C por 5 minutos, es el paso mediante el cual casi todos los solventes de la fotoresina son removidos, dándole consistencia a la película. Uno de los pasos que determinan la calidad del dispositivo es la alineación de la máscara con la oblea para que el dibujo pueda transferirse correctamente sobre la resina al exponerlo a luz UV por 1 minuto. La transferencia del dibujo se realiza debido a que las zonas transparentes de la máscara permiten el paso de luz UV polimerizando la resina en esas regiones, mientras que las regiones en negro bloquean el paso de la luz manteniendo líquida a la resina en esas zonas. Posteriormente se realiza un poscoccido a 95 °C por 5 minutos. Una vez que se enfría la oblea se realiza el proceso de revelado donde se remueve la resina que no fue polimerizada. Terminado este paso, se realiza un cocido final a 140 °C. Finalmente, el molde se trató con 2 gotas de clorotrimetilsilano (SIGMA-ALDRICH) y se mantuvo en una campana de extracción

durante 30 minutos con el objetivo de que se pueda remover el polidimetilsiloxano (PDMS) de la oblea. Con estos pasos lo que se obtiene es el molde maestro o grabado con el cual se pueden fabricar los dispositivos.

5.1.2 Litografía Suave

La litografía suave es la segunda parte del proceso de fabricación de los dispositivos microfluídicos y consiste en la fabricación de una réplica del molde maestro utilizando PDMS. El PDMS es un polímero derivado del carbono y del silicio, perteneciente a la familia de las siliconas. Su estructura química es la siguiente: $(C_2H_6OSi)_n$, donde n es el número de monómeros de silicio enlazados a grupos metilo. Siendo que el grupo metilo es un grupo funcional no polar, este es el que le proporciona la propiedad al PDMS de ser hidrofóbico. El PDMS es un material transparente, biocompatible, y tiene una baja permeabilidad a los líquidos como el agua y una alta permeabilidad a los gases. Estas propiedades lo convierten en un material ideal para la realización de experimentos *in vivo* e *in vitro* que involucren células o fluidos biológicos [41], [42]. La preparación del PDMS [42] se realiza combinando la base del polímero con su catalizador en una relación 10:1. La fabricación de la réplica de PDMS se lleva a cabo vertiendo PDMS sobre el molde maestro en un proceso de polimerización a 120 °C durante 20 minutos. Adicionalmente, se realizan los orificios para la entrada y salida de la suspensión de eritrocitos para posteriormente realizar un proceso de sellado con una capa de vidrio utilizando plasma de oxígeno (*Corona treatment*). Finalmente, se colocan las mangueras en los orificios dejando al dispositivo listo para la realización de los experimentos [43].

El dispositivo que se utilizó en este trabajo fue diseñado y utilizado previamente por el Dr. Oscar Águila Torres [12], el cual se basó en el diseño creado por D. Bento y colaboradores [44]. Este diseño mantiene la tendencia de los vasos sanguíneos en la microvasculatura en el sentido de que va disminuyendo el ancho de los canales (parte arterial) hasta alcanzar un valor mínimo, después de lo cual aumenta gradualmente (parte venular).

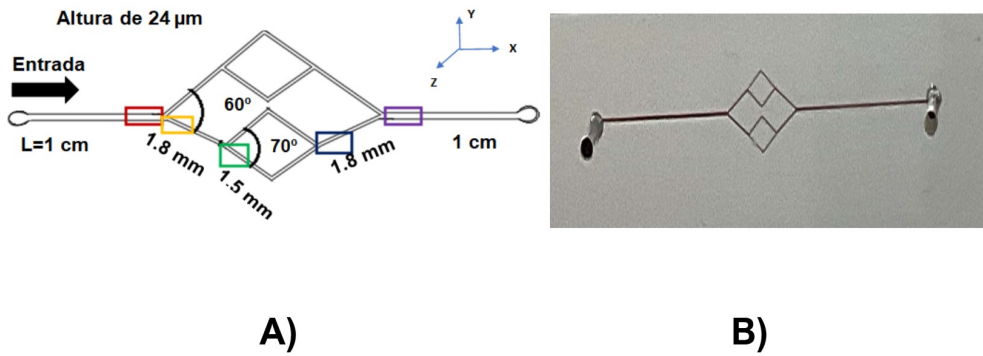


Figura 5.2: A) Esquema del dispositivo a utilizar y las zonas de interés marcadas con rectángulos de diferentes colores. También se indica la longitud de las diferentes secciones. B) Réplica con el diseño después de realizar un experimento. Elaboración propia.

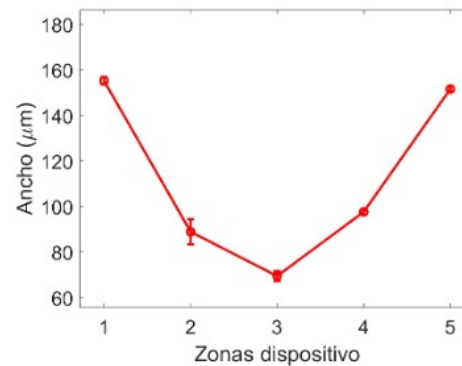
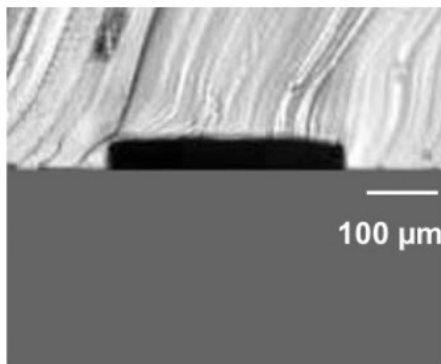


Figura 5.3: A) Sección transversal del canal de entrada. B) Valores de los diferentes anchos en distintas zonas del dispositivo: 1) canal principal, 2) primera bifurcación, 3) segunda bifurcación, 4) primera confluencia y 5) segunda confluencia. Elaboración propia.

5.2 Obtención y lavado de glóbulos rojos

La muestra de sangre se obtuvo de voluntarios sanos del sexo masculino, los cuales son miembros de la comunidad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN- Unidad Monterrey. Se verificó que no presentaran ningún tipo de enfermedad y/o patología que altere las características viscoelásticas de los glóbulos rojos a través de un examen de biometría hemática. Este estudio se realizó siguiendo la declaración de Helsinki [45]. Por lo tanto, se les informó del uso que se le iba a dar a la muestra de sangre.

El lavado de los glóbulos rojos inició con la extracción de la muestra de sangre, la cual llevaron a cabo especialistas que conocen los lineamientos de bioseguridad y la técnica adecuada para esta clase de procedimientos (Lic. Karen Garza y MC. Pablo Alvarado). Cabe señalar que se recomienda realizar el experimento [46] durante un periodo máximo de 4 horas posteriores a la extracción, para que no existan cambios en las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos que puedan alterar su dinámica al ser sometidos a un flujo cortante. La muestra de sangre de 5 ml se obtuvo en un tubo Vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Modelo BD Vacutainer K2 EDTA) como agente anticoagulante. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm en una centrifuga de mesa (ThermoFisher Scientific Sorvall ST8), lo que permite separar a los glóbulos rojos del suero. Recordando que el suero representa aproximadamente 56 % del volumen total sanguíneo, del cual el 55 % corresponde al plasma sanguíneo (que contiene todas las proteínas de la sangre) y el 1 % restante contiene las otras células de la sangre, las cuales son los glóbulos blancos y las plaquetas. Una vez completado el paso anterior, se extrajo el suero y se reemplazó con buffer fosfato sódico (PBS) agitando el tubo de forma suave durante 2 minutos para homogenizar la mezcla. Una vez homogeneizada, la muestra se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Ya separados los glóbulos rojos del PBS con restos de suero, se procedió a la extracción del sobrenadante. Este proceso de lavado de glóbulos rojos se repitió 2 veces para disminuir la probabilidad de que se encuentren restos de glóbulos blancos y plaquetas en la suspensión de glóbulos rojos. Este procedimiento se esquematiza en la Fig. 5.4 y se muestran las imágenes obtenidas al realizar el procedimiento en la Fig. 5.5.

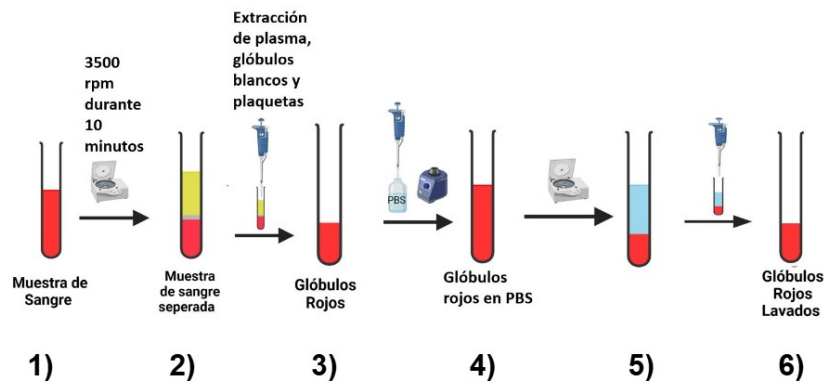


Figura 5.4: Esquema del lavado de glóbulos rojos. 1) Muestra de 5 ml de sangre después de la extracción. 2) Muestra de sangre donde se separa el suero y los glóbulos rojos por centrifugación. 3) Glóbulos rojos después de haber extraído el suero. 4) Glóbulos rojos mezclados con PBS. 5) Glóbulos rojos separados del PBS con restos de suero. 6) Glóbulos rojos después de la extracción de PBS en una segunda lavada. Elaboración propia.

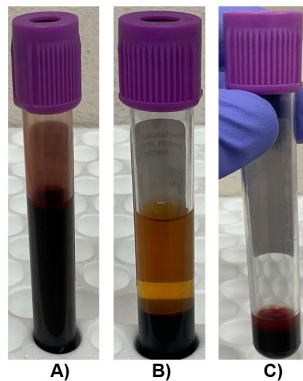


Figura 5.5: Lavado de glóbulos rojos. A) Muestra que se obtiene directo del donante. B) Suero separado de los glóbulos rojos. C) Glóbulos rojos después de dos lavados. Elaboración propia.

5.3 Tinción de glóbulos rojos

La manera más fácil de seguir la trayectoria de los eritrocitos sometidos a un esfuerzo cortante es tiñéndolos con un fluoróforo suficientemente efectivo para distinguir el movimiento individual de dichas células al utilizar la técnica de microscopía de fluorescencia. En la práctica, es imposible seguir las trayectorias de todos los eritrocitos debido a la dinámica compleja que siguen cuando interactúan entre ellos y al hecho de que las células se desplazan a lo ancho y alto del microcanal. En este trabajo se va a realizar el estudio de la dinámica de glóbulos rojos tiñendo

una fracción de dichas células. Esta fracción de células debe de ser suficientemente pequeña para que existan pocos eventos en los que los glóbulos rojos teñidos interactúen directamente. Esto último es una condición necesaria para no perder la identidad de las células después de una colisión. Típicamente, el porcentaje de eritrocitos teñidos para lograr este objetivo es del orden de 2%. Para este propósito, se usó un fluoróforo conocido como Vybrant Dil Cell-Labeling Solution (Termo Fisher Scientific) [11], el cual tiene la característica de ser lipofílico. Para poder internalizarlo en la bicapa lipídica, este fluoróforo está disuelto en etanol. Gracias al efecto disruptivo del etanol en las membranas de las células, la tinción llega a la capa media de los glóbulos rojos, en donde abundan los distintos tipos de lípidos [47], [48], [49], [50].

Para realizar esta tinción, primero se vierten 300 μl de los eritrocitos lavados sin PBS en un vial de plástico (Corning). A continuación, se adicionan 300 μl de PBS y se agita suavemente la suspensión durante 2 minutos para homogenizarla. Posteriormente, se agregan 8 μl de Vybrant Dil homogeneizando la suspensión de la misma manera que en el paso anterior. Teniendo los tres componentes, se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Una vez concluida la incubación, se obtienen los glóbulos rojos teñidos. Este proceso se esquematiza en la Fig. 5.6. Cabe señalar que se realizaron diversas pruebas que muestran que la morfología de estas células no se ve afectada en este proceso de tinción. Las pruebas incluyen la visualización en campo claro y fluorescencia tanto de células en reposo como en flujo en el dispositivo microfluídico con hematocritos de 3% con videos tomados a una resolución de 1500 cuadros por segundo (FPS). Los hematocritos que se utilizaron en los experimentos fueron de 20%, 30% y 35%, los cuales están en el rango de hematocritos fisiológicos en la microvasculatura. Como control se realizaron experimentos con el flujo de una suspensión de partículas de poliestireno fluorescentes de 2 μm de diámetro suspendidas en PBS a una concentración de 0.2% en volumen.

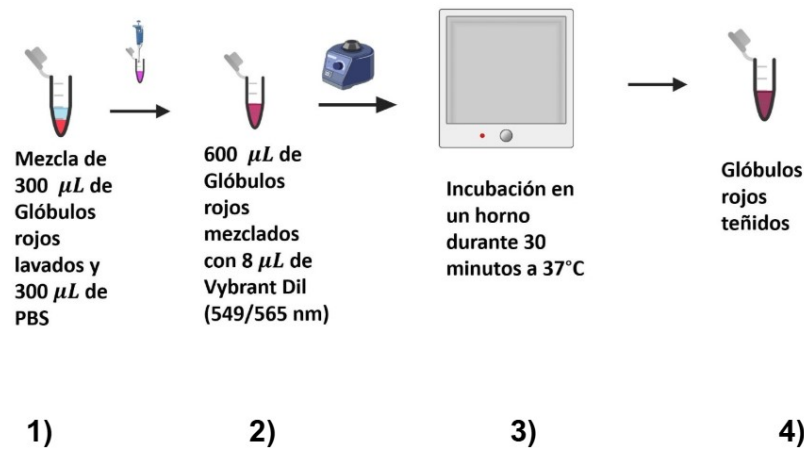


Figura 5.6: Tinción de glóbulos rojos. 1) Glóbulos rojos y PBS mezclados, 2) mezcla anterior con Vybrant-Dil [11], 3) los tres componentes dentro del horno a 37 °C durante 30 minutos y 4) resultado final de eritrocitos teñidos. Elaboración propia.

5.4 Montaje Experimental

El contenido del vial se recuperó con una jeringa de 3 ml y esta se colocó en una bomba de jeringa (KD Scientific KDS220) a un flujo de $0.23 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$. La temperatura a la que se realizaron los experimentos es de 23 °C. Un estudio donde se analiza la variación del coeficiente de dispersión con la temperatura se puede consultar en la ref [51], donde se muestra que al aumentar la temperatura de 25 °C a 37 °C el coeficiente de dispersión de los eritrocitos aumenta en un factor de 1.75. La resolución con la cual se trabajó fue de $0.587 \frac{\mu\text{m}}{\text{pixel}}$ (Objetivo 10X). El tamaño de las imágenes que formaron los videos fue de 870 X 870 μm (512 X 512 pixeles). Los videos grabados contienen 5445 cuadros a una resolución temporal de 125 FPS. La resolución temporal de la cámara se eligió de tal forma que los glóbulos rojos pudieran desplazarse aproximadamente una distancia equivalente a su diámetro entre 2 cuadros sucesivos. Los videos fueron grabados con una cámara rápida (FASTCAM SA3 modelo 60K-M1), ver Fig. 5.7.



Figura 5.7: Montaje Experimental. De izquierda a derecha se puede observar la bomba de jeringa y el dispositivo montado en la platina del microscopio con la luz de fluorescencia encendida. Elaboración propia.

5.5 Videomicroscopía digital y procesamiento de imágenes

La videomicroscopía digital (VMD) es una técnica experimental efectiva y práctica para observar y analizar de forma directa la dinámica de un sistema de partículas/células. Esta técnica consiste en la observación de un experimento con un microscopio, grabar en un video la dinámica observada y analizar digitalmente mediante un lenguaje de programación el movimiento de las partículas/células. Usualmente, en este tipo de experimentos las variables de interés son las posiciones y trayectorias de las células con las cuales se pueden realizar mediciones de propiedades dinámicas, hidrodinámicas y de transporte. Los elementos que conforman el arreglo experimental son mostrados en la Fig. 5.7. En este arreglo experimental el video es grabado con una cámara rápida a través de un software instalado en una PC, lo cual permite grabar videos con diferente resolución espacial y temporal.

La cámara rápida que se utiliza en este trabajo tiene la opción de generar videos con una resolución temporal que va desde 60 FPS hasta 6000 FPS. Adicionalmente, tiene la opción de determinar el tiempo de exposición con un obturador electrónico desde $1/50000$ s hasta $1/\text{FPS}$. Como es de esperarse, el tiempo máximo del obturador está determinado por la velocidad de captura. Conforme la dinámica de un sistema es más rápida, se requiere una mayor velocidad de captura y por lo tanto se tiene un menor tiempo de exposición. Sin embargo, entre menor sea el tiempo de exposición, menor va a ser la luz capturada por los fotodetectores, lo cual aumenta el ruido degradando la calidad de un video. Estas características son de suma importancia en

este trabajo debido a que la calidad de los videos depende de la tinción de los glóbulos rojos, la velocidad de flujo, la resolución espacial y temporal del video. La resolución que resultó práctica en este trabajo es de 512 x 512 pixeles. Un pixel contiene la información promedio de la intensidad luminosa capturada en un elemento de área del arreglo CCD en un tiempo determinado. En la práctica, cada pixel contiene un nivel de brillantez discretizado en términos de la resolución en bits que permita el equipo. La cámara utilizada tiene una resolución de 8 bits, es decir, puede almacenar 2^8 niveles de gris, donde el valor de 0 corresponde al negro y el de 255 corresponde al blanco. Entre estos 2 límites están todos los posibles valores que generan un tono de gris en una imagen. Cabe señalar que se tomaron videos en campo claro para determinar la orientación de los microcanales y para tener una estimación de la distribución espacial de las células dentro de los microcanales, mientras que los videos con microscopia de fluorescencia se tomaron para seguir las trayectorias de los glóbulos rojos teñidos. Una vez que se tienen los videos, el siguiente paso es procesar los videos con un lenguaje de programación orientado al procesamiento de imágenes y videos conocido como MATLAB (MathWorks, Natick, MA).

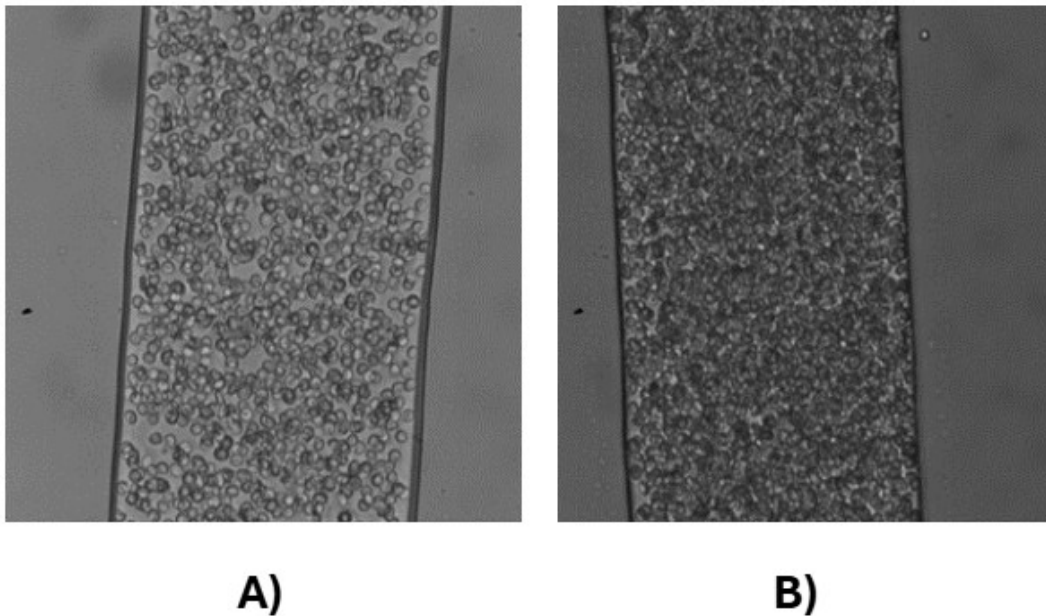


Figura 5.8: A) Flujo de glóbulos rojos a un hematocrito de 20 %. B) Flujo de glóbulos rojos a un hematocrito de 35 %. Elaboración propia.

Debido a que en la grabación de los videos no se tiene el control de la orientación de los microcanales, para hacer más práctico el análisis se procedió a calcular el ángulo de orientación de las secciones del dispositivo que se van a analizar. Esto último se lleva a cabo tomando una imagen en campo claro de la región de interés (ver la Fig. 5.9 A)) antes de tomar los videos en fluorescencia. Este ángulo se utiliza para rotar las imágenes de tal forma que los canales siempre tengan una orientación horizontal, lo cual facilita el análisis de la dinámica de los glóbulos rojos. El ángulo de orientación se calcula mediante la transformada de Hough, la cual consiste brevemente en los siguientes pasos. En primer lugar, se calcula el gradiente de la imagen usando las mascararas de Sobel. Con este procedimiento se resaltan los bordes laterales de los canales. Para eliminar el ruido generado al calcular el gradiente, se realiza un proceso de binarización con un umbral de nivel de gris de tal forma que únicamente se resalten 2 líneas finas de pixeles que corresponden a las dos paredes laterales de los canales. La última etapa de la transformada de Hough consiste en suponer que todos los pixeles son parte de una línea recta y con esto se construye una imagen (matriz acumuladora) en donde el nivel de gris es una media del número de pixeles que conforman una línea recta, donde uno de los ejes de la matriz acumuladora corresponde a la pendiente y el otro a la ordenada al origen de cada pixel. Al elegir los pixeles más brillantes de la matriz acumuladora se puede calcular el ángulo de orientación con una precisión de 0.1° . En la práctica, para asegurarnos de que el ángulo este correcto se visualizan imágenes rotadas con una diferencia de $\pm 0.1-0.5^\circ$ respecto al valor que proporciona la transformada de Hough. De esta forma, se elige el ángulo que resulte más cercano a la orientación de los canales. El resultado de realizar este procedimiento se muestra en la Fig. 5.9 B). Este procedimiento se realiza en todas las regiones de interés para todas las imágenes de cada video y para todos los experimentos. Una vez que se tiene el video de fluorescencia orientado en la dirección horizontal se procede a calcular los centroides y trayectorias de las partículas/células.

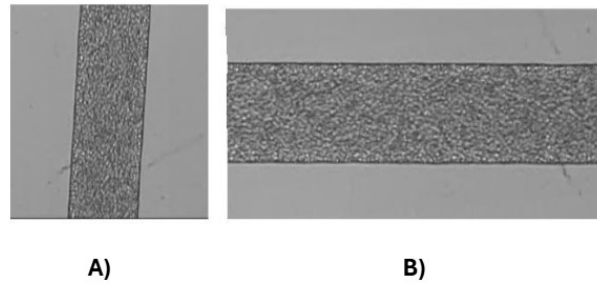


Figura 5.9: Rotación de los microcanales en una zona de interés utilizando el método de la transformada de Hough. A) Microcanal en una zona de interés y B) Microcanal rotado para colocarlo de forma horizontal. Elaboración propia.

Para calcular las posiciones de las células teñidas en cada imagen, es necesario resaltar las regiones que representan a las células respecto al fondo de la imagen. La diferencia de niveles de gris para tres células y el fondo de un cuadro de un video de fluorescencia típico se muestra en las Fig. 5.10. Como puede observarse, el fondo tiene un nivel de gris de cero y únicamente resaltan tres regiones brillantes que corresponden a tres glóbulos rojos. Debido a esto se utilizó la estrategia de segmentar las regiones brillantes para calcular el centroide de los eritrocitos. Esto último se realiza eligiendo un umbral de nivel de gris resultando en una imagen binaria donde el nivel de gris de 0 corresponde al fondo y el de 1 corresponde a los glóbulos rojos. Este umbral tiene un valor que sea suficientemente pequeño para que se detecten la gran mayoría de las células, pero lo suficientemente grande para que el programa no localice más de una posición para cada región brillante que corresponde a una célula. La imagen binarizada se utiliza para realizar un proceso de segmentación donde se unen los píxeles vecinos para conformar las regiones que representan a las células que se observan en cada imagen. Es necesario señalar que el proceso de segmentación implica el uso de los operadores morfológicos de apertura y clausura. Este proceso de segmentación permite calcular el centroide de cada célula simplemente como el valor medio de las coordenadas (x,y) de los píxeles que conforman cada una de las regiones brillantes. Para realizar este procedimiento de forma práctica se utilizó la función `REGIONPROPS` de MATLAB, la cual permite calcular las coordenadas (x,y) de objetos brillantes que resaltan respecto al fondo de la imagen. La localización de los centroides de los glóbulos rojos se ilustra en la Fig. 5.11 A) con marcas de círculos rojos. Una vez que se calculan las posiciones de los eritrocitos, se procede a calcular las trayectorias correspondientes de dichas células.

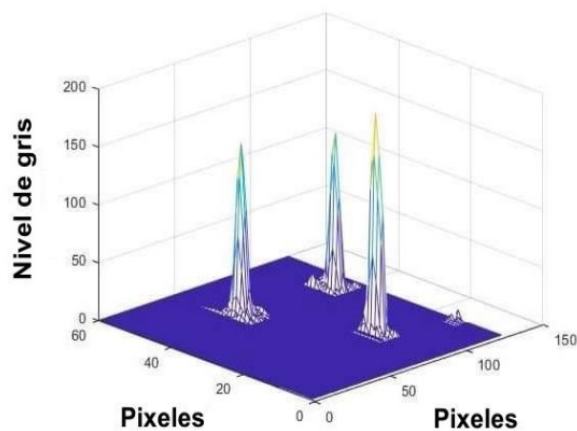


Figura 5.10: Perfil de niveles de gris a fluorescencia correspondiente a tres glóbulos rojos. Elaboración propia.

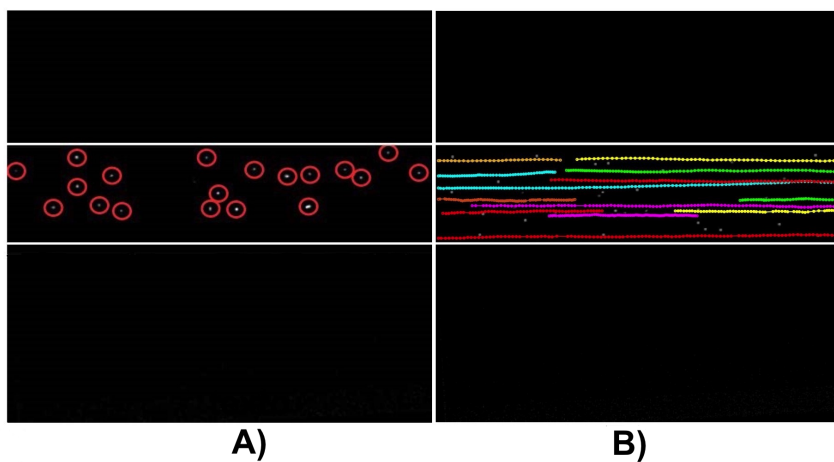


Figura 5.11: Posiciones y trayectorias de los glóbulos rojos teñidos. A) Localización de la posición de eritrocitos marcados con círculos rojos. B) Trayectorias de glóbulos rojos teñidos representadas con líneas de diferentes colores. Elaboración propia.

Para calcular las trayectorias de los glóbulos rojos, se utiliza el método propuesto por J. Crocker y D. Grier [52], el cual fue desarrollado para construir trayectorias de partículas brownianas que se desplazan en un plano horizontal y sin flujo. Para compensar esta característica en el presente trabajo se utiliza una velocidad de flujo y una resolución temporal de la cámara de tal forma que las células teñidas se visualicen con una morfología semejante

a la que presentan las partículas esféricas del control. Los glóbulos rojos que se estudian en este trabajo tienen una dinámica advectiva en la dirección de flujo y una dinámica dispersiva en el plano perpendicular a la dirección del flujo. El algoritmo se basa fundamentalmente en que la distancia recorrida por las células entre 2 cuadros subsiguientes sea menor a la distancia promedio entre ellas. Es decir, que los desplazamientos sean suficientemente pequeños para asociar la posición de cada partícula con la posición más cercana localizada en el cuadro anterior. En los experimentos realizados en este trabajo esta condición se logra utilizando una velocidad de grabación de 125 FPS, aplicando un flujo de 0.23, y tiñendo únicamente el 2% de los eritrocitos. Formalmente y para una dinámica browniana, este método implica que para un tiempo τ las partículas brownianas tienen una densidad de probabilidad de desplazamiento $P(\delta, \tau)$ dada por la siguiente expresión:

$$P(\delta, \tau) = \frac{1}{4\pi D\tau} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\tau}\right), \quad (5.1)$$

donde δ es el desplazamiento y D es el coeficiente de difusión. La condición de que los desplazamientos sean pequeños en comparación con la distancia media entre partículas es equivalente a suponer que las partículas no interactúan directamente en esta escala de tiempo y por lo tanto la densidad de probabilidad de desplazamiento para N partículas es:

$$P(\delta_i, \tau) = \left(\frac{1}{4\pi D\tau}\right)^N \exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\tau}\right). \quad (5.2)$$

Entonces, el suponer una condición de mínimo desplazamiento es equivalente a suponer una maximización de $P(\delta, \tau)$. En el sistema de glóbulos rojos la condición que se debe de cumplir es que las células teñidas estén lo suficientemente alejadas entre sí para que el algoritmo no asocie erróneamente las posiciones de las células en un cuadro dado con las posiciones de esas mismas células en el cuadro anterior. En la práctica, este algoritmo se aplicó eligiendo una distancia crítica que sea menor a la distancia que se desplazan las células entre 2 imágenes sucesivas y que esta distancia sea menor a la distancia media entre ellas. Para comprobar si el algoritmo funciona correctamente, se generan videos cortos con las trayectorias calculadas tomando en cuenta las últimas 10 posiciones de las células. De esta forma se garantiza que no existan errores en el seguimiento de las células. En la Fig. 5.11 B) se muestran trayectorias típicas de este tipo de sistemas. Como puede observarse, las trayectorias son de diferente longitud y no siempre comienzan y terminan en los extremos de la imagen. Esto ocurre porque se descartan algunas posiciones cuando 2 células fluorescentes se acercan entre sí de tal forma que se puede perder su identidad. Para evitar errores en estos eventos, se suprimen las secciones de las trayectorias donde los glóbulos rojos teñidos en un cuadro dado se acercan a una distancia menor a la

distancia crítica.

Para el caso de las partículas de látex (experimentos control), se siguió el mismo procedimiento que para los eritrocitos (ver Fig. 5.12). Los resultados obtenidos en este caso coinciden con un método más elaborado para localizar las posiciones de partículas brownianas esféricas sin flujo [52], donde se asume que los perfiles de brillantez de las partículas son gaussianas de revolución en un fondo con ruido con una correlación de 1 pixel. Con estas consideraciones, el algoritmo permite localizar las posiciones de partículas esféricas menores a 1 micra con una precisión del orden de $0.2 \mu m$. Una vez que se calculan las trayectorias se procede a medir las diferentes propiedades dinámicas de las células sometidas a un esfuerzo cortante.

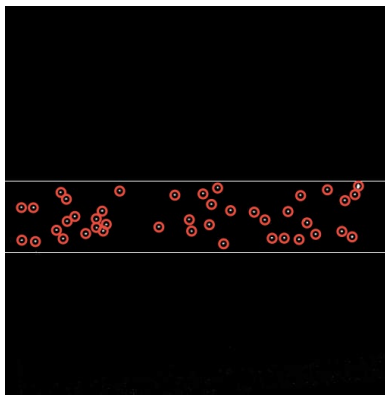


Figura 5.12: Localización de partículas esféricas fluorescentes. Elaboración propia.

6

Resultados

6.1 Perfiles de velocidad de partículas y glóbulos rojos

Las interacciones hidrodinámicas entre eritrocitos y la interacción hidrodinámica entre dichas células y las paredes de un vaso sanguíneo, tal como se describió anteriormente, determinan el perfil de velocidad de una suspensión de eritrocitos sujeta a un flujo cortante. Es por esto que es de suma importancia conocer los cambios de estos perfiles en la microvasculatura para conocer de forma indirecta la dinámica celular cuando la suspensión de células fluye a lo largo de una red vascular, donde se experimentan cambios en el diámetro de los vasos y donde existen diferentes bifurcaciones y convergencias. Para realizar esta descripción primeramente se debe de tomar en cuenta que cuando un fluido se hace pasar por una tubería existe una distancia que se conoce como longitud de entrada hidrodinámica después de la cual el perfil de velocidad del fluido llega a un punto donde ya no cambia de forma. Para el caso de un fluido newtoniano, el perfil de velocidades toma la forma del perfil de Poiseuille correspondiente a la geometría de la tubería. Esto último se debe a la condición de no deslizamiento en las paredes internas del canal, lo cual trae como consecuencia que independientemente de cómo entra el fluido al canal, la tendencia es que se van ralentizando las capas del fluido más cercanas a las paredes del canal. En general se ha estimado que, para geometrías rectangulares, esta longitud se ha estimado en $10D_h$ [53], donde D_h es el diámetro hidráulico dado por $D_h = 4A/P$, siendo A el área transversal y P el perímetro del canal. Para la geometría que se usa en este trabajo la longitud de entrada hidrodinámica es aproximadamente $420 \mu m$. Tomando en cuenta este factor, se espera que los glóbulos rojos alcancen una distribución de equilibrio después de recorrer una distancia de aproximadamente 2.5 mm de la entrada del canal [12]. Por lo tanto, la primera medición se realizó a 1 cm de la

entrada, es decir, justamente antes del comienzo de la primera bifurcación. Adicionalmente, se realizaron mediciones al inicio de la primera bifurcación, al inicio de la segunda bifurcación, al inicio de la primera convergencia, y al inicio de la segunda convergencia. Para obtener el perfil de velocidad en las diferentes regiones de interés se utilizan únicamente las componentes de los desplazamientos instantáneos (entre cuadros sucesivos) de las células en la dirección paralela a la dirección del flujo. Así mismo, los perfiles de velocidad se obtienen al promediar las velocidades en un área determinada por el ancho del canal de cada zona de interés y por una distancia de $100\ \mu\text{m}$ en la dirección del flujo, dividiendo el ancho en carriles de 2 micras. Como control se realizaron mediciones del perfil de velocidad de partículas trazadoras de $2\ \mu\text{m}$ suspendidas en PBS a una concentración volumétrica de aproximadamente 0.2%.

Antes de presentar los resultados para los perfiles de velocidad de los glóbulos rojos es necesario tener una estimación de la distribución espacial de las células sometidas a un esfuerzo cortante en un canal rectangular. Con este fin se va a seguir el procedimiento usado por Yazdan Rashidi y colaboradores [84] para calcular la longitud de la capa libre de células de glóbulos rojos que fluyen por un canal rectangular. Para calcular esta longitud, usaron la información que proporciona la desviación estándar y la media de los niveles de gris. En este procedimiento, estas cantidades se calculan siguiendo las variaciones de los niveles de gris de cada uno de los píxeles a lo largo de un periodo de tiempo en el que los eritrocitos se desplazan a través del microcanal, es decir, se utiliza la información de las variaciones de los niveles de gris de los píxeles a lo largo del tiempo. Esta técnica es apropiada cuando existe un gran contraste de niveles de gris entre el fondo y los niveles de gris correspondientes a los glóbulos rojos. En las zonas por donde pasa una concentración baja de células la desviación estándar alcanza un mayor valor respecto a las zonas por donde pasa un mayor número de eritrocitos debido a que a lo largo del tiempo hay muchas áreas que en ciertos instantes de tiempo tienen un nivel de gris igual al del fondo debido a que no pasan eritrocitos. En este trabajo se realizó el cálculo de la *desviación estándar* y la *media* para la primera zona de interés (canal principal). Con este fin se utilizó un video tomado con microscopia de campo claro con un hematocrito de 35% a una resolución temporal de 500 FPS, y que está conformado por un total de 2420 cuadros. En estas condiciones los eritrocitos tienen suficiente nitidez para distinguirlos del fondo. Una imagen tomada de este video se puede observar en la Fig. 5.8 B). Los resultados para la desviación estándar y la media a lo ancho del canal se presentan en la Fig. 6.1, los cuales están normalizados de tal forma que el valor máximo del nivel de gris es de 255. Para obtener estas cantidades se realizó un promedio a lo largo de $100\ \mu\text{m}$ en la dirección paralela a la dirección del flujo. Los valores máximos de la desviación estándar son un indicador del límite de la capa libre de células. Por otro lado, el valor mínimo

de la mediana proporciona la posición de los bordes laterales del microcanal. En base a esta información, la capa libre de células tiene el valor de $2.3 \mu m$. Adicionalmente, lo que muestra la Fig. 6.1 es que para distancias mayores a $40 \mu m$, respecto al centro del canal, la desviación estándar comienza a crecer hasta alcanzar el valor máximo. Esto significa que existe una menor concentración de células cerca de las paredes laterales del microcanal, es decir, estos resultados muestran que existe una mayor concentración de eritrocitos a lo ancho de $80 \mu m$ alrededor del centro del canal. De hecho el perfil de la desviación estándar es un reflejo del perfil de gradiente de velocidad, es decir, tiene el valor máximo en las zonas donde el gradiente de velocidad local toma el máximo valor, lo cual ocurre cerca de las paredes laterales. Así mismo, estos resultados muestran la tendencia que tienen los eritrocitos a emigrar hacia la zona donde el gradiente de velocidad tiene el valor mínimo (normalmente cero) en el microcanal [28], lo cual influye en todos los segmentos de la red de microcanales.

Para tener una referencia teórica es necesario recurrir a la solución de las ecuaciones de Stokes para obtener el perfil de velocidad y el flujo para una geometría rectangular, las cuales se muestran en las ecuaciones 6.1 y 6.2 [54]. Tomando en cuenta que el flujo (Q) depende de la velocidad media (v) y del área transversal y que está dado por la ecuación $Q = vA$, entonces es posible calcular el perfil de velocidad si se conoce el valor medio de la velocidad del fluido. Este resultado (línea continua verde) junto con los perfiles de velocidad de los glóbulos rojos (símbolos rojos) a un hematocrito de 35 % y de las micropartículas trazadoras (símbolos negros), ver Fig. 6.2 A). Adicionalmente, en esta figura se muestra que el perfil de velocidad de los glóbulos rojos se puede aproximar a un perfil de Poiseuille (línea azul) con una velocidad media 15 % menor a la velocidad media medida con las partículas trazadoras. Esta reducción en la velocidad media se puede asociar a un aumento en la viscosidad de 18 % respecto a la viscosidad del control. En todos los resultados que se muestran en este trabajo se normaliza el ancho de los canales para que los valores estén entre -0.5 y 0.5, donde el valor negativo corresponde a la pared lateral izquierda tomando en cuenta una vista en la dirección del flujo. Esta misma convención se sigue para los resultados de las bifurcaciones y confluencias. Como puede observarse, los resultados obtenidos con las partículas trazadoras concuerdan con el perfil teórico del flujo de Poiseuille para un fluido newtoniano. Como puede observarse, los resultados obtenidos con las partículas trazadoras concuerdan con el perfil teórico de Poiseuille para un fluido newtoniano. También es necesario resaltar que en los perfiles teóricos se promedió la componente z , tal y como ocurre en los experimentos que tienen la limitación de que no se tiene la información de la componente z de las partículas y de los glóbulos rojos. El perfil tridimensional de velocidades se puede observar en la Fig. 6.3. El perfil de velocidad para los glóbulos rojos es prácticamente simétrico respecto

al origen en la dirección y , lo que significa que en el trayecto que realizaron los glóbulos rojos fue suficiente para que se alcanzara un equilibrio en la distribución de glóbulos rojos dentro del microcanal. Adicionalmente, se observa que la diferencia en la velocidad entre las partículas trazadoras y los eritrocitos es de aproximadamente $150 \mu\text{m}/\text{s}$. Esta diferencia se debe en parte a la migración de los eritrocitos hacia la parte central del microcanal lo cual genera un mayor número de colisiones entre glóbulos rojos y al mismo tiempo una pequeña disminución en su velocidad. En los extremos laterales ($20 \mu\text{m}$) del microcanal coinciden los resultados de los glóbulos rojos y de las partículas lo cual también es explicado por la tendencia que tienen los glóbulos rojos a alejarse de las paredes debido a la fuerza de sustentación. El perfil de velocidad para la primera bifurcación es notoriamente diferente a la del canal de entrada (principal). Hay una disminución considerablemente mayor en la velocidad de los glóbulos rojos respecto al perfil de las partículas trazadoras. El perfil de las partículas sigue aproximándose al flujo de Poiseuille (línea continua verde). Esto último implica que el fluido inmediatamente se adapta a la nueva geometría rectangular de la rama. En cambio, el perfil de velocidad de las células es notoriamente asimétrico. Esta asimetría se debe a que, antes de la bifurcación y como se describió anteriormente, hay un mayor número de glóbulos rojos en el centro del canal principal con la máxima velocidad incidiendo en la bifurcación. Adicionalmente, cerca de la pared interna (pared lateral izquierda) se genera un aumento del estrés de corte lateral [55] respecto al estrés de corte lateral de la pared externa de la bifurcación (pared lateral derecha). Esta combinación de factores hace que haya una disminución diferenciada en la velocidad de las células a lo ancho del canal respecto al perfil de las partículas. Para el caso de la segunda bifurcación es notoria la disminución de la velocidad tanto de las partículas como de las células. Esto último se debe a que esta sección corresponde al ancho más pequeño de la red de microcanales. En este caso se mantiene la misma tendencia del perfil asimétrico para el caso de los eritrocitos y tiene el mismo comportamiento teórico del flujo de Poiseuille (línea continua verde) para las partículas. Esto se debe probablemente a que el ángulo de la segunda bifurcación tiene un valor ligeramente mayor que el de la primera bifurcación y que la distancia (1.8 mm) que recorren las células a lo largo del canal previo es insuficiente para que algunas células puedan migrar hacia el centro del canal. Este último efecto ha sido abordado en los trabajos [56], [57]. Este efecto puede ser relevante desde el punto de vista fisiológico porque puede generar una distribución sesgada de glóbulos rojos en las ramas que se encuentran río abajo respecto a la bifurcación. El caso de la primera confluencia muestra la tendencia ligeramente opuesta a la de las bifurcaciones, es decir, ahora el máximo del perfil de velocidad de los eritrocitos está ligeramente cargado hacia la pared externa mientras que el perfil de las partículas se sigue aproximando al perfil de Poiseuille (línea

continua verde). Este resultado para la primera confluencia posiblemente se debe a la ligera diferencia tanto en el hematocrito local como en la velocidad de flujo para las células que fluyen cerca de la pared lateral externa (pared lateral derecha) y las células que fluyen cerca de la pared lateral interna (pared lateral izquierda). Finalmente, es notorio que el perfil de velocidad para la segunda confluencia tenga valores muy cercanos al del canal principal. Esto último se debe a que tiene prácticamente las mismas dimensiones que el canal principal. Adicionalmente es notoria la coincidencia entre el perfil de velocidad de los glóbulos rojos y el perfil de Poiseuille (línea continua verde) que fue obtenido al reducir 15% la velocidad media del perfil de las partículas trazadoras, es decir, es la misma reducción de la velocidad media que se realizó en la primera zona de interés. En esta última zona de interés se tiene una mayor coincidencia entre los perfiles experimentales y teóricos. Esto se debe posiblemente a que esta sección del canal se acerca más a una sección rectangular perfecta.

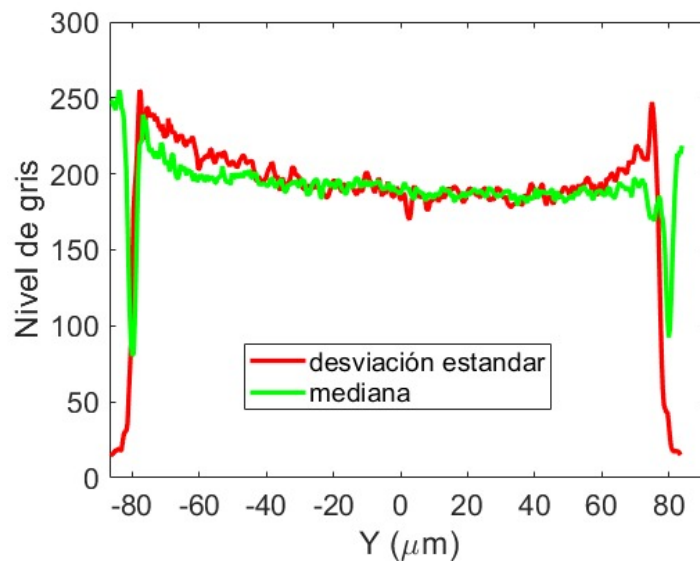


Figura 6.1: Desviación Estándar y mediana de los niveles de gris a lo ancho del canal principal. Elaboración propia.

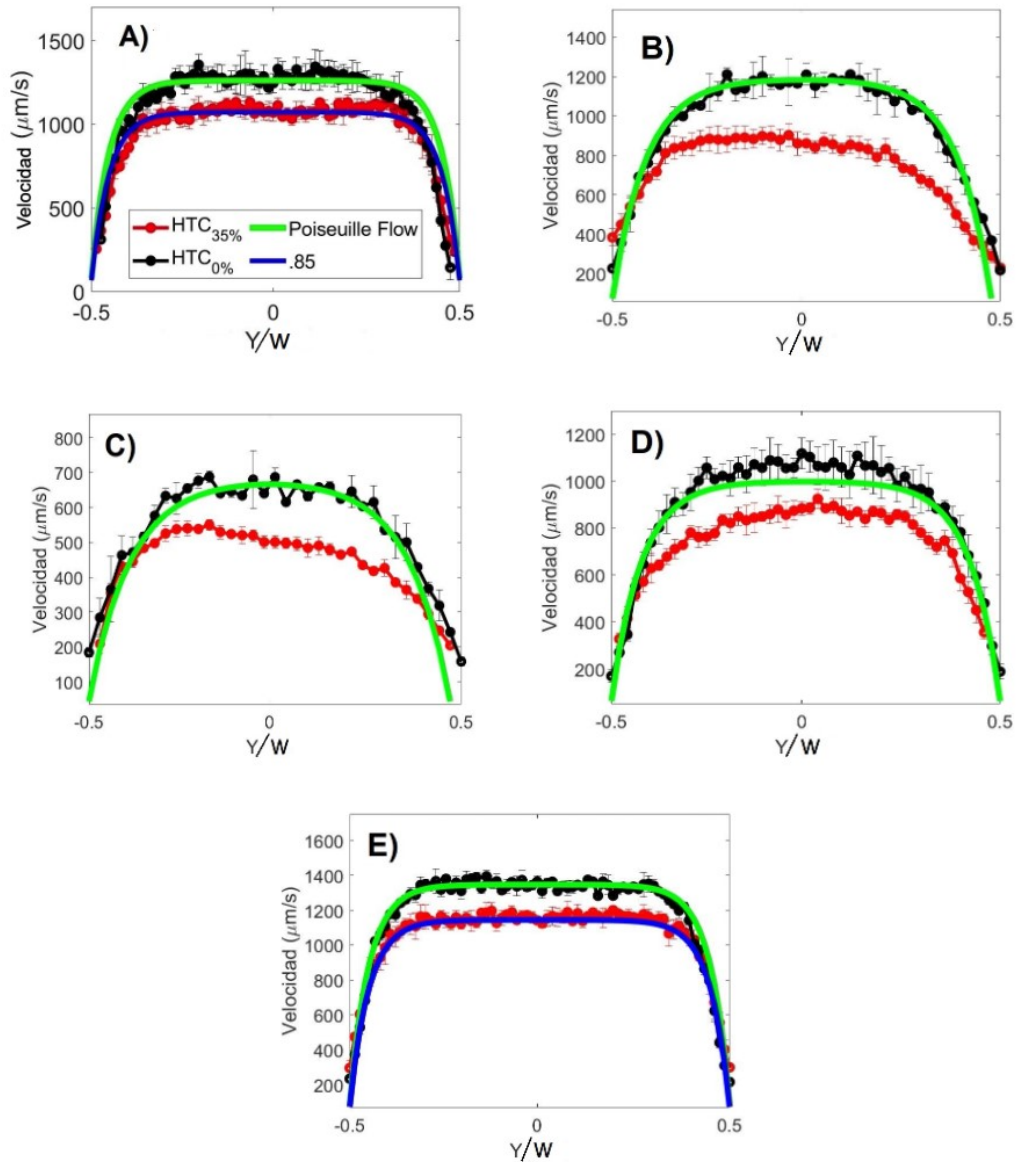


Figura 6.2: Perfiles de velocidad comparado con partículas de $2\ \mu\text{m}$ de diámetro. El hematocrito utilizado fue de 35 %. A) Velocidades en el canal principal junto con el perfil de Poiseuille. B) Velocidades en la primera bifurcación. C) Velocidades en la segunda bifurcación. D) Velocidades en la primera confluencia. E) Velocidades en la segunda confluencia. Las líneas continuas verdes y azules se obtuvieron de las ecuaciones 6.1 y 6.2 al promediar la componente z del perfil de Poiseuille. Elaboración propia.

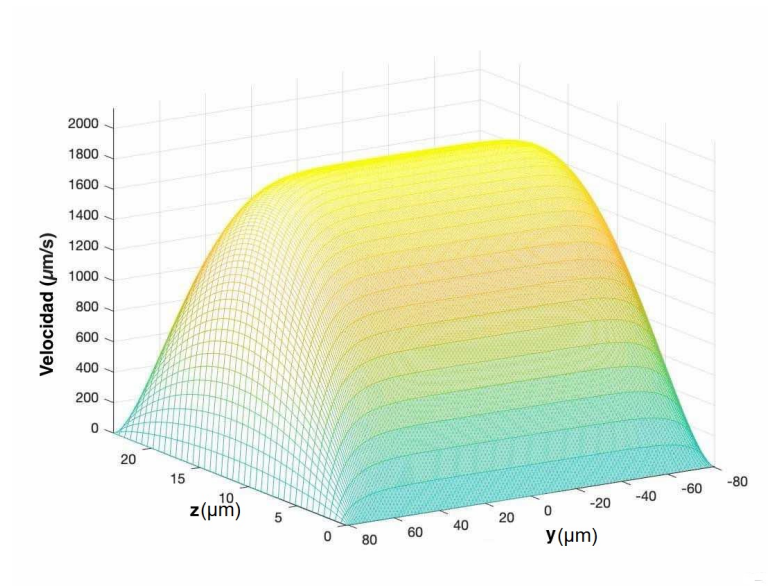


Figura 6.3: Perfil de velocidad de Poiseuille de un canal rectangular de $160\ \mu\text{m}$ de ancho (eje y) por $24\ \mu\text{m}$ de alto (eje z) correspondiente al canal principal, el cual se obtuvo usando las ecuaciones 6.1 y 6.2. Elaboración propia.

$$u_x(y, z) = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\mu L} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh(n\pi\frac{y}{h})}{\cosh(n\pi\frac{w}{2h})} \right] \sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right). \quad (6.1)$$

Integrando la ecuación anterior en el plano (y,z) [54], se obtiene la siguiente expresión para el flujo transversal:

$$Q = \frac{wh^3\Delta p}{12\mu L} \left[1 - \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right) \right]. \quad (6.2)$$

6.2 Dinámica dispersiva de glóbulos rojos

Debido a que no existe un marco teórico que permita describir la dinámica dispersiva de una suspensión de glóbulos rojos sometida a un esfuerzo cortante y a que existe evidencia experimental de la dinámica dispersiva de dichas células para microcanales rectos, recientemente [58] se han realizado simulaciones computacionales que se basan en considerar que la dinámica de estas células sujetas a un estrés de corte está determinada por una ecuación de difusión [58]. Sin embargo, aún es necesario indagar si la dinámica de estas células cumple con todas las propiedades que se han observado en otros fenómenos difusivos de partículas. El caso más estudiado es el del movimiento browniano. Con este objetivo, se va a partir del hecho de que los eritrocitos están sujetos a un proceso estocástico que se puede describir por la densidad de probabilidad de desplazamiento $P(\Delta\vec{r}, t)$ de que una célula realice un desplazamiento $\Delta\vec{r}$ en el tiempo t. Esta función está normalizada de la siguiente manera:

$$\int P(\Delta\vec{r}, t) d\vec{r} = 1. \quad (6.3)$$

Debido a que los glóbulos rojos exhiben una dinámica dispersiva en el plano perpendicular al flujo, esta integral se realiza en un área. Conociendo esta función es posible calcular el valor esperado de cualquier función $f(\Delta\vec{r}, t)$, es decir:

$$\langle f(\Delta\vec{r}) \rangle = \int f(\Delta\vec{r}) P(\Delta\vec{r}, t) d\vec{r}. \quad (6.4)$$

De forma general el momento m de $P(\Delta\vec{r}, t)$ está dado por: $\langle (\Delta\vec{r})^m \rangle = \mu_m$. Para un sistema isotrópico y homogéneo se espera que $\mu_1 = 0$, debido a que las células no están sometidas a ninguna fuerza externa que induzca movimientos en alguna dirección preferencial. El siguiente momento μ_2 es justamente el desplazamiento cuadrático medio (ver ecuación 6.5). El tercer momento está relacionado con la asimetría en la densidad de distribución de desplazamientos, es

decir, es un momento que indica si existe una mayor probabilidad de que existan desplazamientos en una u otra dirección.

$$W_y(t) = \int (\Delta y)^2 P(\Delta y, t) dy. \quad (6.5)$$

Para calcular la función $P(\Delta \vec{r}, t)$ es necesario conocer las trayectorias de las células en la dirección y y z . Sin embargo, con el arreglo experimental que se usa en este trabajo solo se tiene acceso a las trayectorias en el plano (x, y) donde los desplazamientos aleatorios únicamente se llevan a cabo a lo largo del eje y . En este caso la función $P(\Delta y, t)$ está normalizada con el área para obtener la densidad de probabilidad. Por el confinamiento en la dirección z es de esperarse que los desplazamientos sean muy pequeños y por lo tanto se va a considerar que los eritrocitos tienen un movimiento cuasi-bi-dimensional en el plano (x, y) . Esta última consideración está basada en experimentos realizados visualizando lateralmente el flujo de glóbulos rojos teñidos. Las trayectorias observadas de los glóbulos rojos no muestran un desplazamiento a lo largo del eje z . El desplazamiento cuadrático medio (DCM) de los eritrocitos en la dirección y está dado por la siguiente ecuación,

$$W_y(t) = \langle [y(t) - y(0)]^2 \rangle, \quad (6.6)$$

mientras que la densidad de probabilidad gaussiana normalizada está dada por,

$$P_y(y, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D_y t}} e^{-\frac{\Delta y^2}{4D_y t}}, \quad (6.7)$$

donde D_y es el coeficiente de dispersión en la dirección y . Esta ecuación es la solución para la ecuación de difusión en el eje y .

En la Fig. 6.4 se muestran los resultados para el DCM de los glóbulos rojos (en color rojo) y el obtenido para las partículas trazadoras (en color verde) para el canal principal y para un hematocrito de 35 %. Como puede apreciarse existe una gran diferencia de los valores para los dos casos. Así mismo, se muestra el valor obtenido al considerar que $W_y(t) = 2D_y t$, es decir, dando por hecho que la dinámica de las células es difusiva. En el caso más general $W_y(t) \propto t^\alpha$, donde α es la potencia que determina si el sistema es subdifusivo ($\alpha < 1$) o difusivo ($\alpha = 1$). Cabe señalar que el valor de α se determina graficando $\log(W_y(t))$ vs $\log(t)$ y realizando una regresión lineal en diferentes intervalos de tiempo para determinar el intervalo de tiempo en el que el DCM es difusivo y subdifusivo. Experimentalmente la potencia de t es muy cercana a 1 pero no en todos los casos es igual a 1. En la referencia [57] establecen que la dinámica difusiva ocurre cuando $\alpha > 0.9$. Esto ocurre porque el efecto que causa los desplazamientos aleatorios en la dirección perpendicular al flujo son debidos a las colisiones entre células y debido a la distribución no uniforme de las células en los microcanales es de esperarse que en ciertos instantes de tiempo

algunas células no lleven a cabo colisiones lo cual lleva a que la dinámica celular se aproxime a una dinámica difusiva. En este trabajo consideramos que un intervalo de tiempo para el DCM es difusivo cuando la potencia de t se encuentra en el intervalo de 0.93-1.0. Cuando $\alpha < 0.9$ se considera una dinámica subdifusiva. Para el caso del resultado de la Fig. 6.4 el valor de α es de 0.97. La pendiente del DCM de las células es aproximadamente 14 veces mayor a la pendiente del DCM de las partículas trazadoras. Por lo tanto, el DCM se puede considerar difusivo hasta 0.3 s. Posteriormente a este tiempo, $\alpha = 0.81$, por lo que este intervalo de tiempo se considera que el DCM es subdifusivo. Para el caso de las partículas trazadoras, su DCM es del orden del DCM esperado para un movimiento browniano, es decir, que el coeficiente de difusión es cercano al obtenido por la ecuación de Stokes-Einstein. El hecho de que el DCM sea difusivo para todo el intervalo de tiempo implica que la mayoría de los glóbulos rojos se encuentran alejados de las paredes laterales del microcanal. Esto último es de esperarse debido a la formación de la capa libre de células cuyo valor se ha estimado en aproximadamente $6 \mu m$ para un hematocrito de 45 % [12]. Entonces, es razonable que para el hematocrito usado en este caso este valor sea ligeramente mayor. Así mismo, en la Fig. 6.5 se muestran los resultados para las densidades de probabilidad de desplazamiento $P(\Delta y, t)$ medida directamente con los desplazamientos y usando la probabilidad de desplazamiento gaussiana usando el coeficiente de dispersión medido con el desplazamiento cuadrático medio para los tiempos de 0.08, 0.16, y 0.24 s. La densidad de probabilidad es simétrica respecto al origen lo cual demuestra que las células tienen la misma probabilidad de desplazarse hacia valores positivos o negativos en el eje y . Adicionalmente las densidades de probabilidad muestran una coincidencia casi completa con la densidad de probabilidad gaussiana. Esto último implica que la dinámica de los glóbulos rojos se puede describir con una ecuación de difusión en el eje y .

Los resultados del DCM para las 2 bifurcaciones y 2 confluencias se muestra en la Fig. 6.6. Un análisis de esta figura indica que para los intervalos de tiempo donde el DCM no es difusivo, el DCM muestra un valor de $\alpha < 1$ que es característico de una dinámica subdifusiva. La dinámica subdifusiva está asociada a una dinámica donde las partículas tienen desplazamientos en un sistema muy concentrado y/o cerca de una pared de tal forma que disminuye la probabilidad de que las partículas realicen desplazamientos aleatorios de gran longitud, es decir, que las partículas tienen una menor probabilidad de desplazarse grandes distancias en comparación con una dinámica difusiva. En el caso de los glóbulos rojos sujetos a un esfuerzo cortante, los desplazamientos transversales de los eritrocitos dependen de las colisiones entre las mismas células. Antes de entrar a las bifurcaciones, se espera que los eritrocitos mantengan la tendencia de fluir cerca del centro del canal previo. Por lo tanto, al entrar a las bifurcaciones una parte

importante de los eritrocitos va a fluir cerca de la pared lateral interior y una parte del ancho del canal va a tener una concentración menor de células. Esta combinación de factores hace que se tenga un régimen subdifusivo a tiempos pequeños con valores de $\alpha = 0.7$ y $\alpha = 0.8$ para la primera y segunda bifurcación, respectivamente. Para un intervalo de tiempo entre 0.2 y 0.3 s la dinámica dispersiva se recupera por el gran número de colisiones que las células realizan en esos lapsos de tiempo dando valores de $\alpha = 0.98$ y $\alpha = 0.94$ para la primera y segunda bifurcación, respectivamente. Para tiempos mayores a 0.3 s la dinámica vuelve a ser subdifusiva con una α de 0.61 y 0.85 para la primera y segunda bifurcación, respectivamente. Es notable que para las 2 convergencias el valor de α en los intervalos de tiempo que consideramos difusivos sean 1.02 y 0.93 para la primera y segunda convergencia, respectivamente. Adicionalmente, es notorio que el intervalo de tiempo donde el DCM es difusivo sea entre 0.12 y 0.22 s, es decir, que este intervalo ocurre en tiempos menores a los observados en las bifurcaciones. Estos resultados se pueden esperar porque hay una mayor probabilidad de que la distribución de los eritrocitos sea uniforme a lo ancho del canal por la tendencia de las células a viajar hacia el centro del canal en las secciones previas.

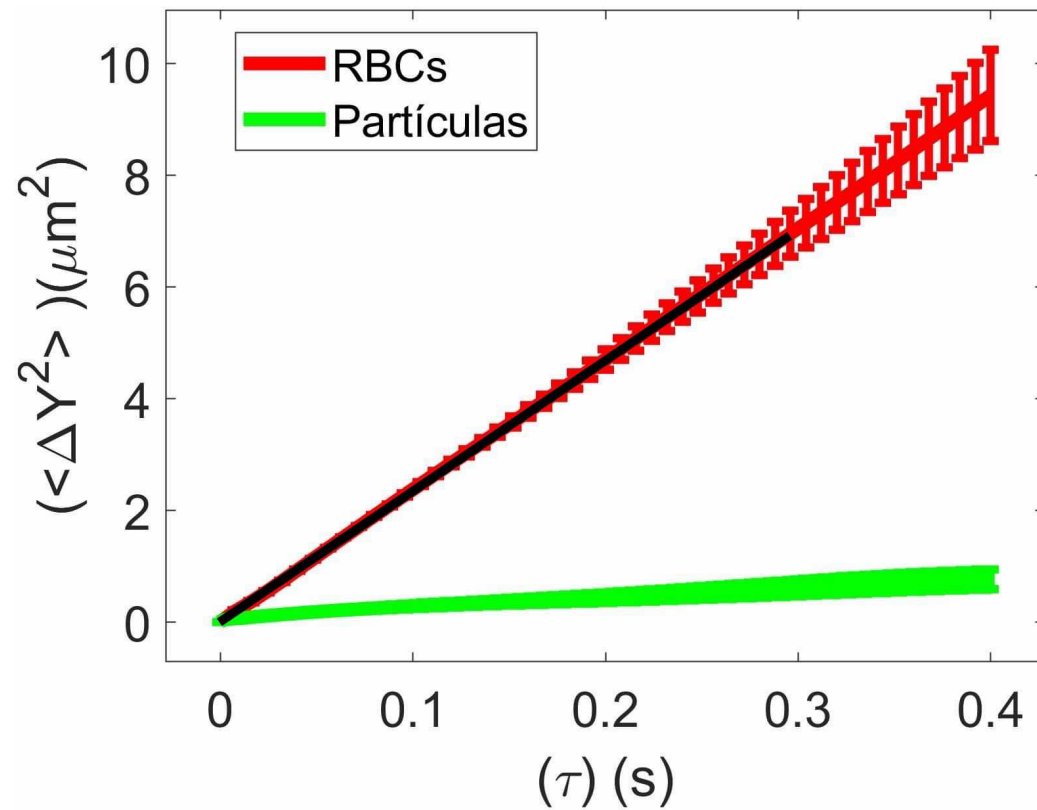


Figura 6.4: Desplazamiento cuadrático medio de los glóbulos rojos en el canal principal (en rojo) y las partículas trazadoras (en verde). También se incluye una línea recta obtenida al calcular el valor del coeficiente de dispersión de los eritrocitos $W_y(t) = 2D_y t$. Elaboración propia.

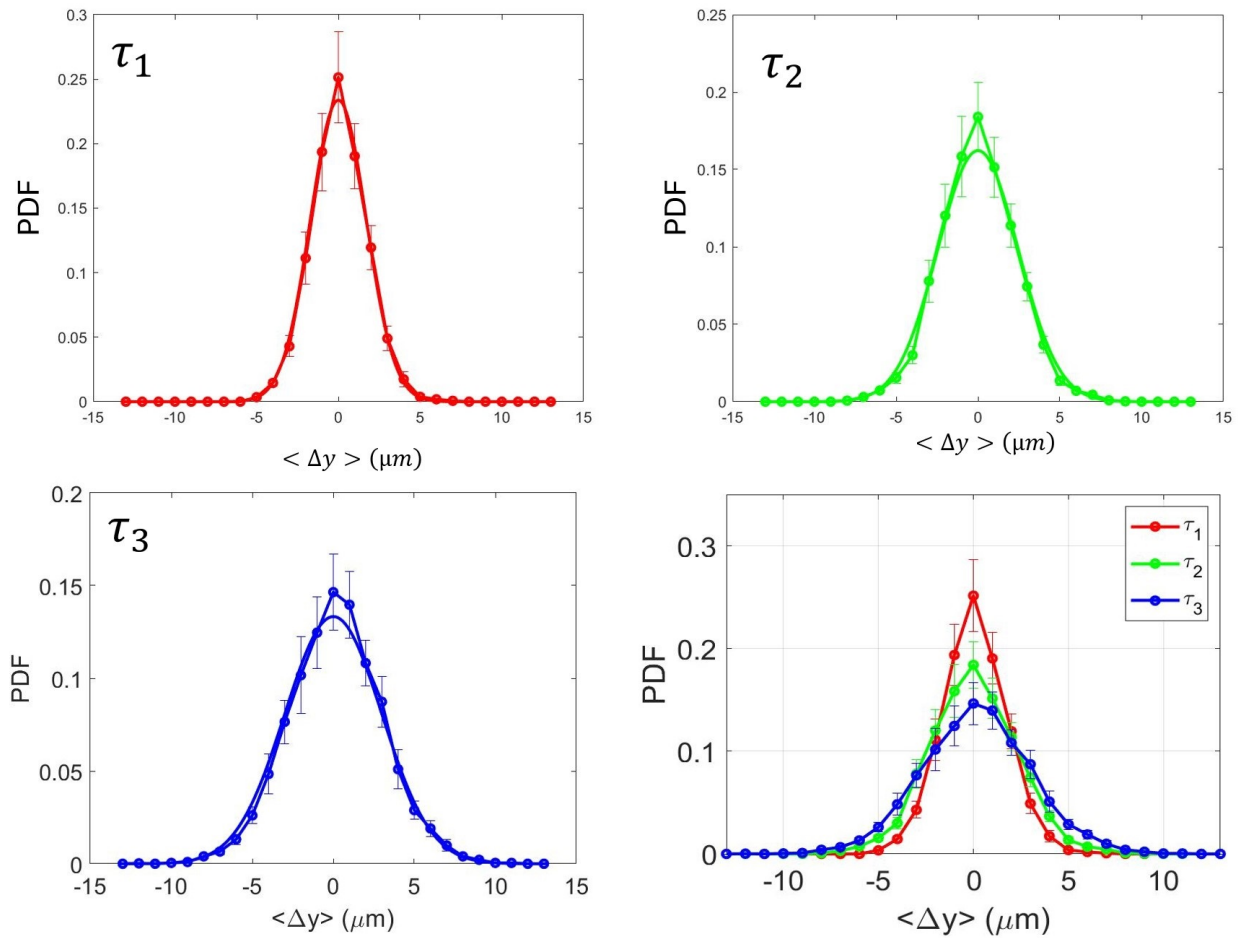


Figura 6.5: Distribuciones de densidad de probabilidad en la dirección y para tres tiempos diferentes (0.08, 0.16, y 0.24 s) obtenidos directamente con los desplazamientos en la dirección y (símbolos) y las obtenidas con la distribución de densidad de probabilidad gaussiana para el canal principal. Elaboración propia.

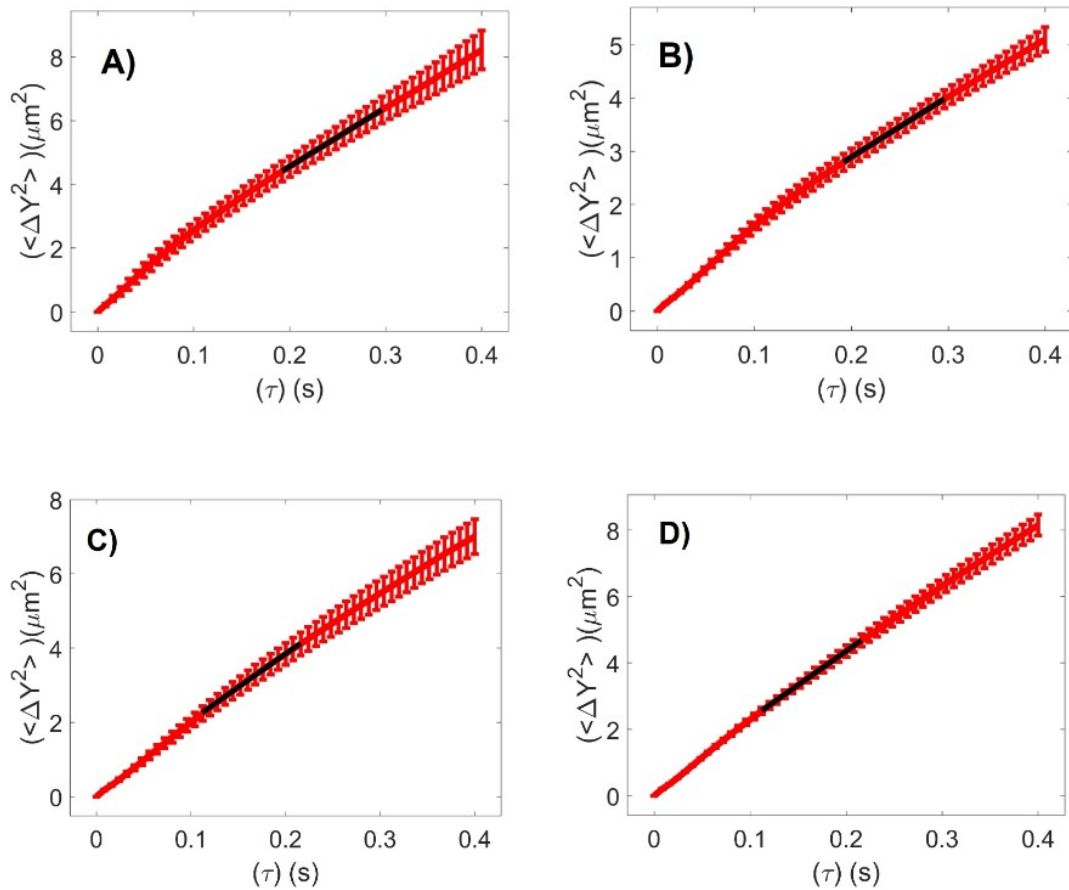


Figura 6.6: Desplazamiento cuadrático medio de los glóbulos rojos en las diferentes regiones de interés. La línea negra fue calculada usando el coeficiente de dispersión en el intervalo de tiempo donde el DCM es difusivo. A) Primera bifurcación, B) segunda bifurcación, C) primera confluencia y D) segunda confluencia. Elaboración propia.

6.3 Coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos vs *shear rate*

Para calcular el gradiente de velocidad de pared (*wall shear rate*) para un canal rectangular es necesario partir de la relación entre el estrés de corte y el gradiente de velocidad ($\tau = \mu\dot{\gamma}$). El estrés de corte se calcula tomando en cuenta todas las fuerzas que actúan sobre un volumen infinitesimal del fluido en la geometría rectangular, el cual queda expresado en términos de ΔP , es decir, en términos de la caída de la presión a lo largo de la dirección del flujo. Así mismo, ΔP , puede ser expresada en términos del flujo (Q) y la viscosidad (μ) de acuerdo a la ecuación 6.2. Esto da como resultado las ecuaciones 6.8 y 6.9 para el gradiente de velocidad de pared, donde $x = H/W$, es decir, es el cociente entre la altura y el ancho del canal [59]. Cabe señalar que esta expresión es válida para un fluido newtoniano. Para determinar si esta aproximación es válida en el presente trabajo, es necesario recordar que existe una transición en el gradiente de velocidad de aproximadamente 100 s^{-1} [60]. Para que esta aproximación sea válida, la viscosidad debe de ser una constante para valores del gradiente de velocidad mayores al valor de transición. Esta característica se puede observar en la Fig. 1.2 A). Los resultados para la red de canales que se analizaron en este trabajo se muestran en la Fig. 6.7, donde se puede observar que todos los valores para el gradiente de velocidad de pared están muy por arriba del valor de transición. Adicionalmente se puede observar que el gradiente de velocidad de pared va decreciendo conforme los glóbulos rojos recorren los diferentes segmentos de la red de microcanales hasta que alcanzan un valor mínimo para posteriormente aumentar su valor en las confluencias. Esta misma característica se presenta en la microvasculatura. El gradiente de velocidad de pared en la Fig. 6.7 no es simétrico debido a pequeñas diferencias en las dimensiones de los microcanales.

$$\dot{\gamma}_a = \left(\frac{6Q}{WH^2} \right) \left(1 + \frac{H}{W} \right) f^* \left(\frac{H}{W} \right) \quad (6.8)$$

$$f^*(x) = \left[\left(1 + \frac{1}{x} \right)^2 \left(1 - \frac{192}{\pi^5 x} \sum_{i=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{\tanh(\frac{\pi}{2}ix)}{i^5} \right) \right]^{-1} \quad (6.9)$$

Tomando en cuenta que el gradiente de velocidad varia a lo largo de la red de microcanales, se calculó el coeficiente de dispersión de acuerdo a la Ec. 1.9. En la Fig. 6.8 se muestra el resultado tomando en cuenta las diferentes zonas de interés. En esta figura se muestra que el coeficiente de dispersión es una función lineal respecto al gradiente de velocidad tal y como lo predice la

Ec 1.9. Sin embargo, llama la atención que los valores para los coeficientes de dispersión para el canal de entrada y el de salida sean iguales. Es decir, en los resultados de este trabajo no se observa una diferencia en el coeficiente de dispersión en la segunda confluencia como se esperaría en el caso de que se formara una capa libre de células central como la observada por Christian Bacher y colaboradores [9]. Esta consideración también se realizó al observar las trayectorias de las células en la primera y segunda confluencia. La diferencia entre los resultados del presente trabajo y los de la referencia [9] posiblemente se deba a que dichos autores en su simulación usaron una velocidad media de flujo de 2.5 mm/s, la cual está por arriba de la usada en este trabajo. Esto implica que posiblemente existe un valor umbral para la velocidad de flujo a partir de la cual se puede formar la capa libre de células central en una confluencia. Utilizando la ecuación 1.9, se obtiene la pendiente de la Fig. 6.8, la cual se nombró como C_1 . Esta depende de los siguientes parámetros: $C_1 = K_y a^2 Hct$. Tomando en cuenta que el hematocrito usado en estos experimentos fue de 35 %, que el valor de radio de un eritrocito está dado por $2a = 7.6 \mu m$ [61], y que el valor de la pendiente $C_1 = 0.038$, nos proporciona el valor para la constante desconocida $k_y = 8.60 \times 10^{-5}$.

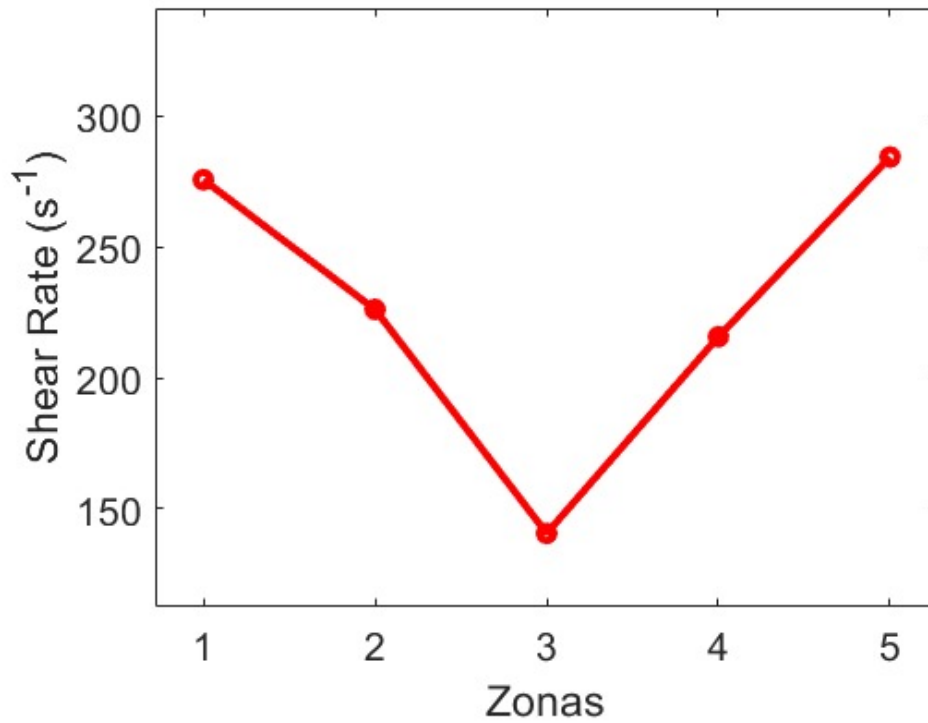


Figura 6.7: Variación del shear rate en diferentes zonas del canal. 1) Canal principal, 2) primera bifurcación, 3) segunda bifurcación, 4) primera confluencia y 5) segunda confluencia. Elaboración propia.

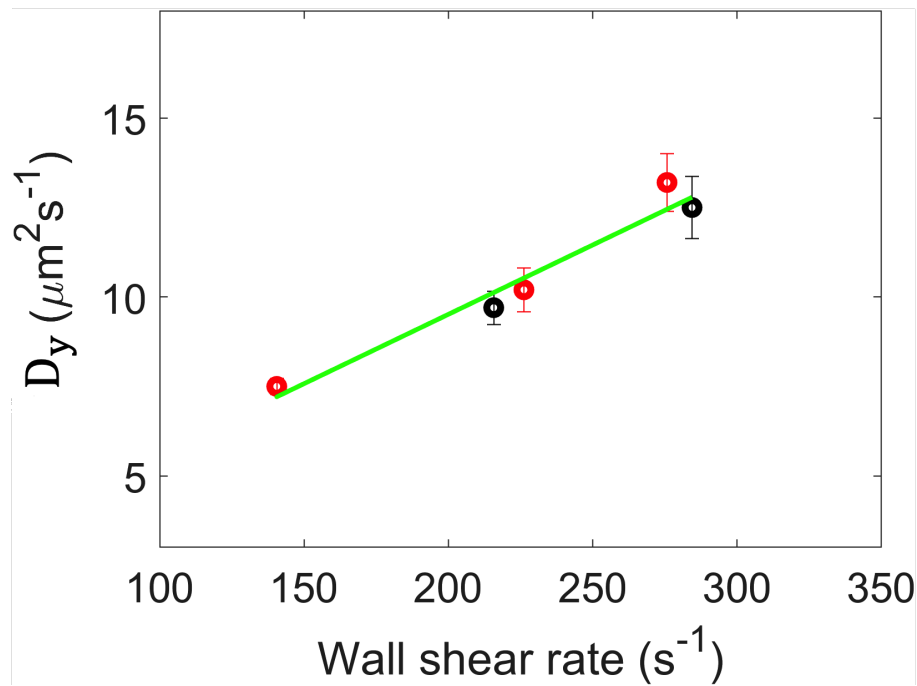


Figura 6.8: *Wall shear rate* para distintas zonas del canal. De izquierda a derecha. Punto rojo (segunda bifurcación), punto negro (primera convergencia), punto rojo (primera bifurcación), punto rojo (canal principal) y el punto negro (segunda convergencia). La pendiente de la línea verde es de 0.0388. Elaboración propia.

6.4 Coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos vs hematocrito

Tomando en cuenta que la ecuación para el coeficiente de dispersión es válida para el caso donde se tienen colisiones entre pares de células, es importante revisar su validez para un rango de hematocritos. Adicionalmente, al tomar en cuenta el antecedente de la referencia [9], es importante verificar si el coeficiente de dispersión en las confluencias sigue siendo una función lineal del hematocrito. Tomando en cuenta esto, se realizaron experimentos para determinar el comportamiento del coeficiente de dispersión como función del hematocrito para 2 zonas de interés, el cual se muestra en la Fig. 6.9. En estos experimentos se eligió la segunda convergencia debido a que es en la que se obtuvo el mayor valor para el coeficiente de dispersión para el hematocrito de 35%. Es importante tomar en cuenta que en la referencia [9] se mostró que la capa libre de células central ocurre en hematocritos de 12 y 20%, por lo que el rango del hematocrito en el que se determinó el coeficiente de dispersión es de 20-35%. Como segunda zona de interés se eligió la zona del canal principal con el objetivo de determinar si existe algún

cambio en el coeficiente de dispersión para hematocritos más pequeños. Los resultados de la Fig. 6.9 indican que el coeficiente de dispersión es una función lineal del hematocrito como se predice con la ecuación 1.9. Adicionalmente muestra que el coeficiente de dispersión tiene los mismos valores para las 2 zonas de interés, lo cual concuerda con el análisis de las trayectorias para el rango de hematocrito de interés en este trabajo, las cuales muestran que no existe una capa libre de células central en las confluencias. Realizando el mismo análisis que en la sección anterior, pero ahora se obtuvo la pendiente de la Fig. 6.9, la cual se nombró como C_2 y tiene un valor de 0.37. Tomando en cuenta que la variable independiente es el hematocrito (Hct), la pendiente $C_2 = K_y a^2 \dot{\gamma}$. Utilizando esta pendiente y los valores de los parámetros, incluyendo el del gradiente de velocidad (275.72 s^{-1}), se determinó que el valor para $K_y = 1.00 \times 10^{-4}$. Como se esperaba, este valor es consistente con el valor obtenido para k_y al usar la pendiente de la Fig. 6.8, con una diferencia de 14%. Es necesario tomar en cuenta que para obtener los resultados de la Fig. 6.8 se parte de una expresión para el gradiente de velocidad de pared, la cual es solo válida para fluidos newtonianos. Adicionalmente, la linearidad del coeficiente de dispersión mostrado en la Fig. 6.9, muestra que la dinámica de los glóbulos rojos esta dominada por colisiones entre pares de células.

Para caracterizar la dependencia del coeficiente de dispersión como función de la posición respecto a las paredes laterales, se realizó la medición del perfil del coeficiente de dispersión para la zona de interés correspondiente al canal principal. En este caso, primeramente, se dividió el ancho del canal en 8 carriles de 20 micras y en cada carril se realizó el cálculo del desplazamiento cuadrático medio con lo cual se determinó el coeficiente de dispersión local (ver Fig. 6.10). Estos resultados muestran la dependencia espacial del coeficiente de dispersión a lo ancho del canal. En la zona que se encuentra alrededor del centro del canal se tiene un mínimo local como resultado de la alta concentración de glóbulos rojos en esa zona. A una posición de $\pm 30 \mu\text{m}$ respecto al centro del canal se tiene un valor máximo lo que implica que en esa zona se tiene una mayor frecuencia de colisiones entre células y al mismo tiempo la concentración de células no es tan grande que impida que las células se desplacen lateralmente. Finalmente, se puede observar que los valores más pequeños del coeficiente de dispersión se obtiene cerca las paredes. Esto último se debe a que en esas zonas existe una menor concentración de glóbulos rojos y por lo tanto disminuye la frecuencia de colisiones entre células. Alrededor de las zonas donde se obtienen los valores máximos es muy probable que exista una transición gradual en la concentración local de glóbulos rojos, es decir, de zonas de alta concentración de glóbulos rojos en la parte central del canal a zonas de baja concentración de eritrocitos cerca de las paredes laterales. Estos resultados son consistentes con los observados en la referencia [28], donde se encontró

que el coeficiente de dispersión local para glóbulos rojos fluyendo en un capilar cilíndrico de vidrio de $100 \mu m$ tiene un valor máximo en una posición radial entre $0.4 R$ y $0.8 R$, donde R es el radio del capilar. Adicionalmente, la Fig. 6.10 incluye resultados [12] correspondientes al coeficiente de dispersión de partículas de $2.0 \mu m$ fluyendo en una suspensión de glóbulos rojos con un hematocrito de 45% en el mismo dispositivo microfluídico. Aunque el hematocrito sea diferente se puede observar que la dinámica dispersiva de las micropartículas tiene las mismas características que la dinámica mostrada por los eritrocitos en este trabajo. La diferencia es que el máximo en el coeficiente de dispersión ocurre a una distancia de $\pm 50 \mu m$ respecto al centro del canal. Esto refleja el efecto que tiene la variación local de la dinámica celular en un microcanal. Además pone de manifiesto el efecto del tamaño de las células que inducen los movimientos laterales de las partículas (eritrocitos).

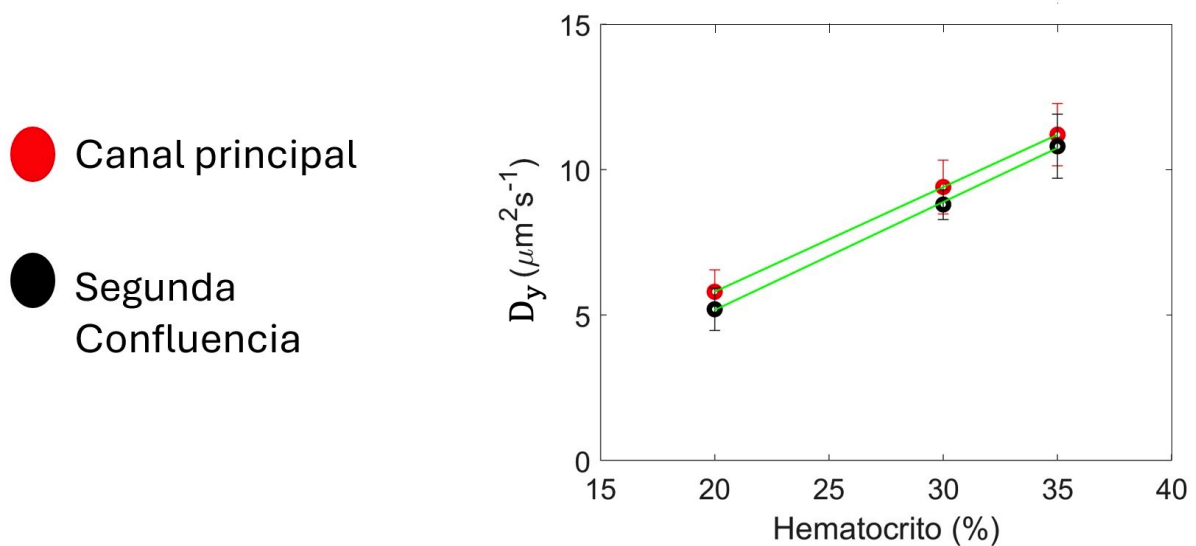


Figura 6.9: Coeficiente de dispersión vs el hematocrito para el canal principal y la segunda confluencia. La pendiente promedio de los 6 puntos es de 0.37. Elaboración propia.

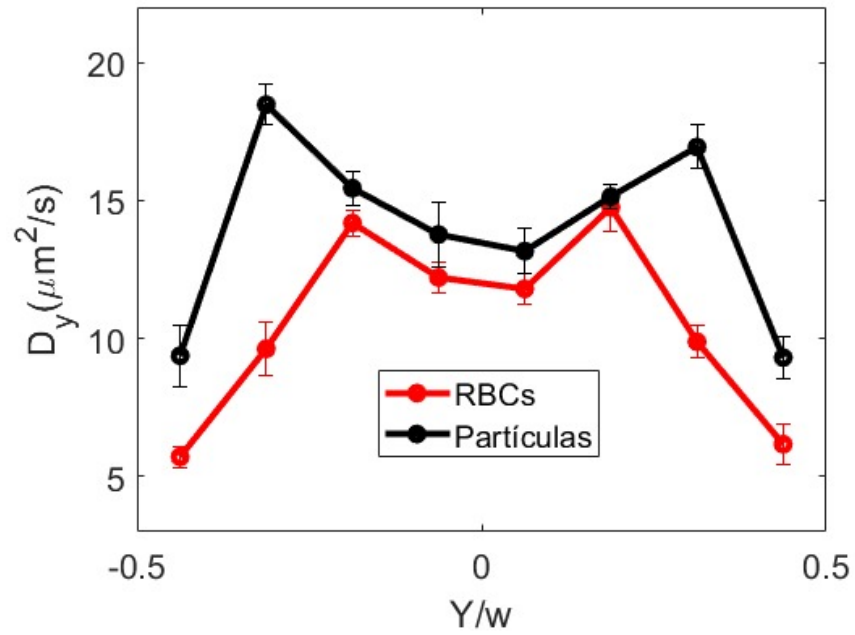


Figura 6.10: Coeficiente de dispersión en el canal principal con respecto a la posición tanto de los glóbulos rojos como de las partículas [12]. Elaboración propia.

7

Discusión

En este trabajo de tesis se estudió la dinámica de glóbulos rojos que fluyen por una red de microcanales con geometría rectangular con el fin de estudiar la dinámica dispersiva de las células en una red de microcanales que tiene una de las características más importantes de una red microvascular que es la disminución y aumento gradual de las dimensiones de los microcanales. Por practicidad en este trabajo se utilizó una red de microcanales rectangulares donde la altura de los canales es siempre más pequeña que el ancho de tal forma que se pueden visualizar todos los eritrocitos teñidos al utilizar microscopia de fluorescencia y que al mismo tiempo permite obtener un gran número de trayectorias de eritrocitos teñidos. La gran mayoría de los estudios que se han realizado para estudiar la dinámica de glóbulos rojos en vasos sanguíneos se han llevado a cabo en microcanales rectos con geometrías cilíndrica y rectangular lo cual está muy lejos de un sistema microvascular de un organismo [28], [62]. Sin embargo, en años recientes se ha comenzado a trabajar con dispositivos microfluídicos que se acercan un poco más a una red vascular real, es decir, incluyen una red de microcanales con bifurcaciones, confluencias, curvaturas, variaciones en las dimensiones de los microcanales, e incorporando una monocapa de células endoteliales en la periferia de los microcanales [63], [64].

Una de las características principales de someter un fluido sanguíneo a un esfuerzo cortante es la dinámica de desplazamientos aleatorios en la dirección perpendicular al flujo que ocurren como consecuencia de las interacciones entre células. Para poder contribuir al entendimiento del origen de la dinámica dispersiva de células o en general de diversas partículas sometidas a un esfuerzo cortante, se han realizado diversos estudios con partículas de diferente naturaleza. Por ejemplo, en uno de los estudios se usaron suspensiones acuosas de partículas esféricas de látex de $0.8 \mu m$ y partículas de arcilla de $2 \mu m$ de diámetro que tienen una superficie irregular con

cierta semejanza a la irregularidad superficial que presentan las plaquetas [65]. Los experimentos se realizan con velocidades de flujo lo suficientemente grandes, dentro del régimen laminar, de tal forma que es posible atenuar el efecto del movimiento browniano, debido a que la advección domina a la difusión browniana. En este trabajo se muestra que la difusión inducida por las partículas de arcilla presenta un coeficiente de dispersión de aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que el de las partículas esféricas para el mismo rango de fracción de volumen. Estos resultados muestran que el fenómeno de dispersión inducido por estrés de corte también ocurre con partículas rígidas que tienen una superficie rugosa. Así mismo, en este trabajo se mostró que el coeficiente de dispersión es una función lineal de la fracción de volumen de las partículas y del gradiente de velocidad. Este estudio confirmó los resultados encontrados por otros autores [66], donde se observaron efectos dispersivos en una suspensión acuosa de partículas de polimetilmetacrilato de 1 mm de diámetro con una superficie rugosa que fue sometida a un esfuerzo cortante. Otro estudio realizado con simulaciones computacionales con el fin de estudiar el efecto de fuerzas repulsivas, la irregularidad de la superficie, y el papel de las interacciones hidrodinámicas en la dispersión inducida por estrés de corte generada por las colisiones entre pares de partículas muestra que los efectos que más contribuyen son la forma de la partícula, la irregularidad de la superficie de las partículas, así como el efecto de las interacciones hidrodinámicas [67]. Para mostrar este efecto realizaron simulaciones en las que forman agregados pequeños formados por partículas esféricas coloidales, donde los agregados incluyen cúmulos lineales de partículas como dímeros y pentámeros hasta agregados muy ramificados. Por lo tanto, para partículas rígidas, la rugosidad es un mecanismo suficiente para generar una asimetría longitudinal con la cual se inducen desplazamientos en la dirección perpendicular a la dirección del flujo después de una serie de colisiones entre partículas. En conjunto, los trabajos realizados con partículas rígidas han dado como resultado que existe una dependencia lineal del coeficiente de dispersión con el gradiente de velocidad y con la fracción de volumen de las partículas. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con suspensiones diluidas de partículas, lo que es equivalente a suponer que las colisiones ocurren entre pares de partículas [8]. Estos estudios y los realizados con suspensiones de partículas flexibles sujetas a un esfuerzo cortante como es el caso de emulsiones [68] han servido de base para el entendimiento de la dinámica dispersiva de las componentes sanguíneas.

El primer estudio que se realizó para cuantificar la dinámica de glóbulos rojos sujetos a un flujo cortante y a un hematocrito fisiológico (10-26%) fue publicado en el 2008 por Rui Lima y colaboradores [28]. Estos autores usaron las ventajas que proporciona la microscopia confocal para realizar mediciones sobre la dinámica radial de glóbulos rojos ubicando el plano

focal a la mitad de la altura de capilares cilíndricos de vidrio de 50 y 100 μm de diámetro. Sus experimentos consisten en teñir con un fluoroforo una fracción pequeña de los glóbulos rojos de tal forma que al seguir sus trayectorias se puede cuantificar el efecto provocado por la interacción con las células no teñidas. Entre sus resultados más importantes encontraron que existe un crecimiento del coeficiente de dispersión radial como función del hematocrito. Sin embargo, sus resultados indican que el coeficiente de dispersión no es una función lineal del hematocrito. De la misma manera, el coeficiente de dispersión tampoco es una función lineal del gradiente de velocidad. Estos resultados posiblemente se deben a los valores pequeños del gradiente de velocidad aplicado, los cuales están en el rango de 2-12 s^{-1} . Interesantemente, en este trabajo se muestra el papel que juega la geometría al comparar los coeficientes de dispersión para capilares de 50 y 100 μm . La disminución en el diámetro genera un decremento en el coeficiente de dispersión, lo cual se explica por la posible reducción en el hematocrito al disminuir el diámetro del capilar [69]. Además, en este trabajo se establece que existe una dependencia radial del coeficiente de dispersión, el cual tiene un valor máximo a una distancia radial que se encuentra entre 0.4-0.8 R, donde R es el radio del capilar. Esta dependencia es de suma importancia ya que es un indicador indirecto de la variación local del hematocrito, lo cual afecta directamente las interacciones entre células.

Muchos de los estudios que se han realizado sobre la dinámica de glóbulos rojos se han llevado a cabo al generar una capa muy angosta de eritrocitos generada por un dispositivo microfluídico de enfoque de flujo [61] cuyo ancho inicial es del orden de 50 μm y que inicialmente fluyen muy cerca de la pared inferior de un canal rectangular con dimensiones de 100 μm de alto por 497 μm de ancho. Bajo estas condiciones, se inducen interacciones entre los eritrocitos y las paredes de tal forma que las células emigran hacia el centro del canal aumentando gradualmente el ancho de la capa de eritrocitos. Aunque estos experimentos no corresponden a una situación fisiológica, es posible determinar los valores de las constantes adimensionales de dispersión (k_y y k_z), es decir, es posible determinar analíticamente una función que contiene los coeficientes de dispersión de las células en el plano perpendicular a la dirección de flujo. En este trabajo, los autores asumen que el coeficiente de dispersión tiene una dependencia funcional como la de la ecuación 1.9. Comparativamente, los valores que se obtienen para k_z en estos experimentos [61] son 3 ordenes de magnitud mayores al valor que se obtiene en este trabajo. Esta diferencia posiblemente se deba a la diferencia de las condiciones experimentales.

Un estudio que se realizó en condiciones experimentales más cercanas al de este trabajo es el publicado por John Higgins y colaboradores [70]. En este trabajo se cuantifica el coeficiente de dispersión de una suspensión de glóbulos rojos que fluye por un canal con geometría rectangular

de $12 \mu m$ de alto por $150 \mu m$ de ancho. En estas condiciones las células no realizan movimientos en la dirección vertical y por lo tanto es posible seguir las trayectorias bidimensionales de las células y determinar el valor del coeficiente de dispersión (D) a través del desplazamiento cuadrático medio ($\langle \Delta Y^2(\tau) \rangle = D\tau$). En este caso el coeficiente de dispersión es generado por las colisiones tangenciales entre células. En este trabajo se usa la ecuación para el coeficiente de dispersión dada por: $D = C\dot{\gamma}\lambda^2$, donde λ es una distancia característica del sistema cuasi-bi-dimensional. C es una constante, que incluye implícitamente el valor del hematocrito. Estos autores encontraron una relación lineal entre el coeficiente de dispersión y la velocidad media del fluido, la cual es proporcional al gradiente de velocidad. Tomando en cuenta un valor para el coeficiente de dispersión de $8 \frac{\mu m^2}{s}$ para un hematocrito de 33 % en donde la distancia característica esta dada por la distancia media entre células de $3 \mu m$, resulta en un coeficiente de dispersión de 7.57×10^{-4} , el cual es cercano al obtenido en este trabajo.

La determinación del coeficiente de dispersión de glóbulos rojos se considera importante debido a que estas células son las que determinan en gran medida la dinámica dispersiva de las otras componentes sanguíneas como lo son las plaquetas. Debido a que hay evidencias de que el coeficiente de dispersión de los glóbulos rojos depende linealmente con el gradiente de velocidad y el hematocrito, se considera que la misma expresión es válida para el coeficiente de dispersión de partículas rígidas [39] y flexibles como son las burbujas [71] que fluyen en una suspensión de glóbulos rojos. Particularmente, en un trabajo se mostró que el coeficiente de dispersión para partículas de látex de $1 \mu m$ es 0.7 veces el coeficiente de dispersión para los glóbulos rojos a un hematocrito del 10 % [39]. Al fluir en una suspensión de glóbulos rojos y como resultado de la dinámica dispersiva las partículas terminan marginándose en la periferia de los microcanales tal y como ocurre con las plaquetas en un vaso sanguíneo. Este último efecto es de suma importancia para diversas aplicaciones como lo es la liberación controlada de fármacos donde se necesita que las partículas acarreadoras del fármaco puedan migrar hacia la periferia de los vasos para que posteriormente se anclen por interacciones ligando receptor en una zona específica dentro de la vasculatura. Un estudio reciente en esta dirección se puede consultar en [72]. Es importante señalar que cuando se trata de partículas brownianas también juega un papel relevante el movimiento browniano. Por lo tanto, es importante continuar con estudios que involucren todos los efectos que están presentes en una red vascular fisiológica.

8

Conclusiones y Perspectivas

8.0.1 Conclusiones

-La dinámica de los glóbulos rojos en una red de microcanales está determinada por una dinámica difusiva en la dirección perpendicular al flujo que muestra fuertemente el efecto de la fuerza de sustentación sobre los eritrocitos.

-La ecuación para el coeficiente de dispersión se puede generalizar para una red de microcanales ajustando los valores del hematocrito y gradiente de velocidad local.

8.0.2 Perspectivas

-Determinar el perfil del coeficiente de dispersión para el resto de las zonas de interés para completar la descripción de la dinámica local de los glóbulos rojos.

-Realizar mediciones sobre la dinámica de los glóbulos rojos en la dirección vertical [12] para determinar si el sistema se puede aproximar a un sistema cuasi-bi-dimensional.

-Encontrar el umbral de la velocidad de flujo a partir de la cual se genera la capa libre de células central en las confluencias para determinar si corresponde a flujos fisiológicos.

-Realizar una simulación computacional con los resultados obtenidos para poder calcular la dinámica de los glóbulos rojos en una red de canales que incluya un mayor número de bifurcaciones y confluencias con el fin de aproximarlos a una red microvascular más realista.

Bibliografía

- [1] G. O. Miranda, “Sistema circulatorio humano,” 6 2021. [Online]. Available: <https://www.abc.com.py/edicion-impresa/suplementos/escolar/sistema-circulatorio-humano-1491547.html>
- [2] T. Alexy, J. Detterich, P. Connes, K. Toth, E. Nader, P. Kenyeres, J. Arriola-Montenegro, P. Ulker, and M. J. Simmonds, “Physical properties of blood and their relationship to clinical conditions,” 7 2022.
- [3] R. E.Klabunde, “Viscosity of blood,” 12 2022.
- [4] W. Sae-Lee, C. L. McCafferty, E. J. Verbeke, P. C. Havugimana, O. Papoulas, C. D. McWhite, J. R. Houser, K. Vanuytsel, G. J. Murphy, K. Drew, A. Emili, D. W. Taylor, and E. M. Marcotte, “The protein organization of a red blood cell,” *Cell Reports*, vol. 40, 7 2022.
- [5] R. Bijleveld, J. D. Kok, B. V. D. Zwaag, R. V. Wijk, and T. Diekman, “The netherlands journal of medicine solving a cold case of haemolysis: Back to the basics.”
- [6] A. Nait-Ouhra, A. Guckenberger, A. Farutin, H. Ez-Zahraouy, A. Benyoussef, S. Gekle, and C. Misbah, “Lateral vesicle migration in a bounded shear flow: Viscosity contrast leads to off-centered solutions,” *PHYSICAL REVIEW FLUIDS*, vol. 3, p. 123601, 2018.
- [7] 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*, vol. 23, p. 035301, 2012. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/23/3/035301>
- [8] L. Etienne, V. Annie, and A. Manouk, *Dynamics of Blood Cell Suspensions in Microflows*. CRC Press, 2020.
- [9] C. Bächer, A. Kihm, L. Schrack, L. Kaestner, M. W. Laschke, C. Wagner, and S. Gekle, “Antimargination of microparticles and platelets in the vicinity of branching vessels,” *Biophysical Journal*, vol. 115, pp. 411–425, 7 2018.

- [10] G. M. Whitesides and A. D. Stroock, “Flexible methods for microfluidics,” *Physics Today*, vol. 54, p. 42, 2001.
- [11] “Vybrant® cell-labeling solutions mp 22885.” [Online]. Available: www.omegafilters.com
- [12] O. A. Águila Torres, “Estudio de la distribución de las partículas a través de una red de microcanales,” 7 2024.
- [13] “Structure and function of blood vessels.” [Online]. Available: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/>
- [14] A. M. Taylor and B. Bordoni, “Histology, blood vascular system,” 5 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
- [15] P. Cones, O. Hue, and S. Perrey, *Exercise Physiology: From a cellular to an integrative approach*. IOS Press, 2010. [Online]. Available: https://www.google.com.mx/books/edition/Exercise_Physiology/ijfZZxzd16YC?hl=es-419&gbpv=0
- [16] D. Matienzo and B. Bordoni, “Anatomy, blood flow,” 7 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554457/>
- [17] M. Abkarian and A. Viallat, *On the Importance of the Deformability of Red Blood Cells in Blood Flow*. The Royal Society of Chemistry, 11 2015, p. 0. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1039/9781782628491-00347>
- [18] L. Moggi, “Hemorreología y microcirculación artículo de revisión.”
- [19] E. Nader, S. Skinner, M. Romana, R. Fort, N. Lemonne, N. Guillot, A. Gauthier, S. Antoine-Jonville, C. Renoux, M. D. Hardy-Dessources, E. Stauffer, P. Joly, Y. Bertrand, and P. Connes, “Blood rheology: Key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise,” 2019.
- [20] Y. Qiu, D. R. Myers, and W. A. Lam, “The biophysics and mechanics of blood from a materials perspective,” pp. 294–311, 5 2019.
- [21] “Overview: Blood composition and functions (pp. 635-636).”
- [22] C. Pozrikidis, *Boundary Integral and Singularity Methods for Linearized Viscous Flow*. Cambridge University Press, 1992. [Online]. Available: <https://books.google.com.mx/books?id=qXt5bOqDEgQC>

- [23] H. Zhao, E. S. Shaqfeh, and V. Narsimhan, “Shear-induced particle migration and margination in a cellular suspension,” *Physics of Fluids*, vol. 24, 1 2012.
- [24] I. Cantat and C. Misbah, “Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow,” 1999.
- [25] S. Meßlinger, B. Schmidt, H. Noguchi, and G. Gompper, “Dynamical regimes and hydrodynamic lift of viscous vesicles under shear,” 6 2009. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/0906.4170><http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.80.011901>
- [26] 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*, vol. 724, pp. 154–174, 2013. [Online]. Available: <https://www.cambridge.org/core/product/66FDC7BDFD9763E9ED8109A45C5F2E16>
- [27] P.-Y. Gires, A. Srivastav, C. Misbah, T. Podgorski, and G. Couplier, “Pairwise hydrodynamic interactions and diffusion in a vesicle suspension,” 1 2014. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1401.5965><http://dx.doi.org/10.1063/1.4861900>
- [28] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, and T. Yamaguchi, “Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: The role of hematocrit and geometry,” pp. 2188–2197, 2008.
- [29] M. Weiss and T. Nilsson, “In a mirror dimly: tracing the movements of molecules in living cells,” *Trends in Cell Biology*, vol. 14, pp. 267–273, 2004. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892404000868>
- [30] A. Meunier and G. Bossis, “The influence of surface forces on shear-induced tracer diffusion in mono and bidisperse suspensions,” *European Physical Journal E*, vol. 25, pp. 187–199, 2 2008.
- [31] D. Leighton and A. Acrivos, “The shear-induced migration of particles in concentrated suspensions,” *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 181, pp. 415–439, 1987. [Online]. Available: <https://www.cambridge.org/core/product/76E78E555D82DA4E108A4BF3259F7E1F>
- [32] L. Kolitsi and S. Yiantsios, “Effects of artery size on the hydrodynamic diffusivity of red cells and other contained particles,” *Physical Review Fluids*, vol. 4, 11 2019.

- [33] S. D. Hudson, F. R. Phelan, M. D. Handler, J. T. Cabral, K. B. Migler, and E. J. Amis, “Microfluidic analog of the four-roll mill,” *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 335–337, 7 2004.
- [34] N. Nguyen, P. Thurgood, N. C. Sekar, S. Chen, E. Pirogova, K. Peter, S. Baratchi, and K. Khoshmanesh, “Microfluidic models of the human circulatory system: versatile platforms for exploring mechanobiology and disease modeling,” 7 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00815-8>
- [35] S. R. Moses, J. J. Adorno, A. F. Palmer, and J. W. Song, “Vessel-on-a-chip models for studying microvascular physiology, transport, and function in vitro,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 320, pp. C92–C105, 1 2021.
- [36] D. E. Ingber, “Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine,” pp. 467–491, 8 2022.
- [37] H. Yin, Y. Wang, N. Liu, S. Zhong, L. Li, Q. Zhang, Z. Liu, and T. Yue, “Advances in the model structure of in vitro vascularized organ-on-a-chip,” *Cyborg and Bionic Systems*, vol. 5, 04 2024.
- [38] K. H. Wong, J. M. Chan, R. D. Kamm, and J. Tien, “Microfluidic models of vascular functions,” pp. 205–230, 8 2012.
- [39] M. Saadatmand, T. Ishikawa, N. Matsuki, M. J. Abdekhodaie, Y. Imai, H. Ueno, and T. Yamaguchi, “Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube,” *Journal of Biomechanics*, vol. 44, pp. 170–175, 1 2011.
- [40] P. Balogh and P. Bagchi, “Direct numerical simulation of cellular-scale blood flow in 3d microvascular networks,” *Biophysical Journal*, vol. 113, pp. 2815–2826, 12 2017.
- [41] “Polydimethylsiloxane - american chemical society.” [Online]. Available: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/p/polydimethylsiloxane.html>
- [42] “Pdms: a review on polydimethylsiloxane in microfluidics - elveflow.” [Online]. Available: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/>
- [43] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” pp. 368–373, 7 2006.

- [44] 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*, vol. 109, 12 2019.
- [45] “Declaración de helsinki de la amm.”
- [46] A. Merlo, S. Losserand, F. Yaya, P. Connes, M. Faivre, S. Lorthois, C. Minetti, E. Nader, T. Podgorski, C. Renoux, G. Coupier, and E. Franceschini, “Influence of storage and buffer composition on the mechanical behavior of flowing red blood cells,” *Biophysical Journal*, vol. 122, pp. 360–373, 1 2023.
- [47] D. B. Goldstein, “Effect of alcohol on cellular membranes,” *Annals of Emergency Medicine*, vol. 15, pp. 1013–1018, 9 1986.
- [48] M. Patra, E. Salonen, E. Terama, I. Vattulainen, R. Faller, B. W. Lee, J. Holopainen, and M. Karttunen, “Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers,” *Biophysical Journal*, vol. 90, pp. 1121–1135. [Online]. Available: <http://www.softsimu.org/downloads.shtml/>
- [49] Y. Lee and S. Q. Choi, “Quantitative analysis for lipophilic drug transport through a model lipid membrane with membrane retention,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 134, pp. 176–184, 6 2019.
- [50] W. D. Stein, “Chapter 1 permeability for lipophilic molecules,” *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 2, pp. 1–28, 1 1981.
- [51] D. Pinho, R. O. Rodrigues, V. Faustino, T. Yaginuma, J. Exposto, and R. Lima, “Red blood cells radial dispersion in blood flowing through microchannels: The role of temperature,” *Journal of Biomechanics*, vol. 49, no. 11, pp. 2293–2298, 2016, selected Articles from the International Conference on CFD in Medicine and Biology (Albufeira, Portugal – August 30th - September 4th, 2015). [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002192901500679X>
- [52] J. C. Crocker and D. G. Grier, “Methods of digital video microscopy for colloidal studies,” pp. 298–310, 1996.
- [53] Y. C. A. and J. C. M., *Fluid mechanics: fundamentals and applications*, primera ed. McGrawHill Higher Education, 2006.

- [54] X. Zheng and Z. H. Silber-Li, "Measurement of velocity profiles in a rectangular microchannel with aspect ratio = 0.35," *Experiments in Fluids*, vol. 44, pp. 951–959, 6 2008.
- [55] T. W. Secomb, "Hemodynamics," *Comprehensive Physiology*, vol. 6, pp. 975–1003, 4 2016.
- [56] B. Namgung, Y. C. Ng, H. L. Leo, J. M. Rifkind, and S. Kim, "Near-wall migration dynamics of erythrocytes in vivo: Effects of cell deformability and arteriolar bifurcation," *Frontiers in Physiology*, vol. 8, 11 2017.
- [57] P. Balogh and P. Bagchi, "Analysis of red blood cell partitioning at bifurcations in simulated microvascular networks," *Physics of Fluids*, vol. 30, 5 2018. [Online]. Available: [/aip/pof/article/30/5/051902/905406/Analysis-of-red-blood-cell-partitioning-at](https://aip/pof/article/30/5/051902/905406/Analysis-of-red-blood-cell-partitioning-at)
- [58] Q. M. Qi and E. S. Shaqfeh, "Theory to predict particle migration and margination in the pressure-driven channel flow of blood," *Physical Review Fluids*, vol. 2, 9 2017.
- [59] Y. Son, "Determination of shear viscosity and shear rate from pressure drop and flow rate relationship in a rectangular channel," *Polymer*, vol. 48, pp. 632–637, 1 2007.
- [60] A. Chen, A. A. Basri, N. B. Ismail, and K. A. Ahmad, "The numerical analysis of non-newtonian blood flow in a mechanical heart valve," *Processes*, vol. 11, 1 2023.
- [61] X. Grandchamp, G. Coupier, A. Srivastav, C. Minetti, and T. Podgorski, "Lift and down-gradient shear-induced diffusion in red blood cell suspensions," *Physical Review Letters*, vol. 110, 3 2013.
- [62] R. D'Apolito, F. Taraballi, S. Minardi, X. Liu, S. Caserta, A. Cevenini, E. Tasciotti, G. Tomaiuolo, and S. Guido, "Microfluidic interactions between red blood cells and drug carriers by image analysis techniques," *Medical Engineering Physics*, vol. 38, no. 1, pp. 17–23, 2016, micro and Nano Flows 2014 (MNF2014) - Biomedical Stream. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350453315002465>
- [63] J.-H. Huang, J. Kim, N. Agrawal, A. Sudarsan, J. Maxim, A. Jayaraman, and V. Ugaz, "Rapid fabrication of bio-inspired 3d microfluidic vascular networks," *Advanced Materials*, 09 2009.
- [64] A. van der Meer, A. Poot, M. Duits, J. Feijen, and I. Vermes, "Microfluidic technology in vascular research," *Journal of biomedicine biotechnology*, vol. 2009, p. 823148, 11 2009.

- [65] R. Rusconi and H. Stone, “Shear-induced diffusion of platelike particles in microchannels,” *Physical review letters*, vol. 101, p. 254502, 12 2008.
- [66] I. E. Zarraga and J. Leighton, David T., “Measurement of an unexpectedly large shear-induced self-diffusivity in a dilute suspension of spheres,” *Physics of Fluids*, vol. 14, no. 7, p. 2194, Jul. 2002.
- [67] M. Lopez and M. D. Graham, “Shear-induced diffusion in dilute suspensions of spherical or nonspherical particles: Effects of irreversibility and symmetry breaking,” *Physics of Fluids*, vol. 19, 2007.
- [68] M. L. O. E. W. E. N. B. E. R. G. . A. N. D, “Collision of two deformable drops in shear flow,” pp. 299–315, 1997.
- [69] L. N. Toksvang and R. M. Berg, “Using a classic paper by robin fãhraeus and torsten lindqvist to teach basic hemorheology,” *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, vol. 37, pp. 129–133, 2013.
- [70] J. M. Higgins, D. T. Eddington, S. N. Bhatia, and L. Mahadevan, “Statistical dynamics of flowing red blood cells by morphological image processing,” *PLoS Computational Biology*, vol. 5, 2009.
- [71] A. Dasgupta, T. Sun, R. Palomba, E. Rama, Y. Zhang, C. Power, D. Moeckel, M. Liu, A. Sarode, M. Weiler, A. Motta, C. Porte, Z. Magnuska, A. S. Elshafei, R. Barmin, A. Graham, A. McClelland, D. Rommel, E. Stickeler, F. Kiessling, R. M. Pallares, L. D. Laporte, P. Decuzzi, N. McDannold, S. Mitragotri, and T. Lammers, “Nonspherical ultrasound microbubbles,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 120, 3 2023.
- [72] Z. Xu and C. Kleinstreuer, “Direct nanodrug delivery for tumor targeting subject to shear-augmented diffusion in blood flow,” *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 56, pp. 1949–1958, 11 2018.
- [73] M. Abkarian and A. Viallat, “Dynamics of vesicles in a wall-bounded shear flow,” *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. 1055–1066, 2005.
- [74] “Classification structure of blood vessels | seer training.” [Online]. Available: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/blood/classification.html>

- [75] “Red blood cell- part-1-erythropoeisis and rbc maturation, rbc counting procedure.” [Online]. Available: <https://labpedia.net/red-blood-cell-rbc-part-1-erythropoeisis-and-rbc-maturation-rbc-counting-procedure/>
- [76] D. Qin, Y. Xia, and G. M. Whitesides, “Soft lithography for micro- and nanoscale patterning,” 2010.
- [77] J. A. A. Valencia, “Flujo de glóbulos rojos en una red de microcanales con vasos parcialmente obstruidos,” 8 2022.
- [78] J. Mo and M. G. Raizen, “Highly resolved brownian motion in space and in time,” *Annu. Rev. Fluid Mech*, vol. 51, pp. 403–428, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-010518->
- [79] T. W. Secomb, “Blood flow in the microcirculation,” pp. 443–461, 1 2017.
- [80] C. Schaaf, “Particle dynamics in inertial microfluidics vorgelegt von master of science.”
- [81] A. Noguchi, Y. Tange, T. Itano, and M. Sugihara-Seki, “Margination of platelet-sized particles in red blood cell suspensions flowing through a y-shaped confluence microchannel,” *Fluid Dynamics Research*, vol. 55, 6 2023.
- [82] H. Lee, M. Chung, and N. L. Jeon, “Microvasculature: An essential component for organ-on-chip systems,” *MRS Bulletin*, vol. 39, pp. 51–59, 2014.
- [83] G. Závodszky, B. V. Rooij, B. Czaja, V. Azizi, D. D. Kanter, and A. G. Hoekstra, “Red blood cell and platelet diffusivity and margination in the presence of cross-stream gradients in blood flows,” *Physics of Fluids*, vol. 31, 3 2019.
- [84] Y. Rashidi, O. Aouane, A. Darras, T. John, J. Harting, C. Wagner, and S. M. Recktenwald, “Cell-free layer development and spatial organization of healthy and rigid red blood cells in a microfluidic bifurcation,” *Soft Matter*, vol. 19, pp. 6255–6266, 7 2023.