



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, INGENIERÍA Y AGRIMENSURA

# TESINA DE LICENCIATURA EN FÍSICA

---

ESTUDIO DE LA TÉCNICA DE BIOSPECKLE COMO UNA  
HERRAMIENTA DE ANÁLISIS DE LA DINÁMICA  
ERITROCITARIA.

---

**Autor:** Martín Alberto Guido.

**Director:** Dr. Gustavo Galizzi.

**Codirector:** Dr. Lucas Tendela.

Tesina presentada para optar al título de Licenciado en Física.

Trabajo realizado en el Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR).

Rosario, Argentina, 2022.

Estudio de la técnica de Biospeckle como una  
herramienta de análisis de la dinámica eritrocitaria.

Martín Alberto Guido.

24 de agosto de 2022

# Agradecimientos

Deseo dedicar este espacio para agradecer a todo aquellos que me acompañaron en este transitar de mi carrera y formación como persona a lo largo de estos años. Particularmente en este proceso de realización de la tesina quiero agradecer:

A mi director el Dr. Gustavo Galizzi por su confianza, guía y compañía a lo largo del desarrollo de esta tesina, especialmente su humildad, amabilidad y calidad humana a la hora de brindar ideas y direccionarme con su extensa experiencia en este trabajo. A mi codirector el Dr. Lucas Tendela, por su disposición y diligencia a la hora de afrontar las dificultades, su creatividad en el aporte de nuevas ideas, y su guía en el análisis y presentación de los datos. También agradecerle a ambos por su generosidad y el excelente clima que generan que hizo agradable el proceso de realizar este trabajo.

También al Dr. Martín Toderi por presentarme a la física médica y enseñarme las técnicas empleadas para la realización de las mediciones. A la Dra. Analía Alet por su gran ayuda en la obtención de las muestras y su instrucción sobre los protocolos de bioseguridad. También agradezco a los miembros del grupo de Física Biomédica por brindarme un espacio en su laboratorio y prestarme su equipo de Transmisión de Luz. Al Dr. Christian Cuadrado Laborde y a la Dra. Andrea Fourty por brindarme un espacio en sus oficinas para la culminación de la escritura de esta tesina. A mi amiga Aimara Alegrechy quien me ha brindado su ayuda siempre que se lo solicite.

También deseo agradecer a mi familia. A Mayra, mi futura esposa, quien me ha acompañado y ha sido un soporte en este proceso de tesina. Ayudándome con sus palabras en los momentos de angustia, y con su alegría y amor me motiva siempre a mejorar. A mis padres, Jorge y Mirtha, quienes me han acompañado e incentivado a culminar la

carrera siempre velando por mi bienestar y procurando que encuentre la felicidad. A mis hermanas Analia y Lourdes, y a sus esposos porque a pesar de la distancia se han hecho presentes con sus mensajes de apoyo, alegría y me han brindado su incondicional apoyo. A mis sobrinas quienes me sorprenden con sus ocurrencias y me siempre me sacan una sonrisa.

Por ultimo, agradezco a Dios por haberme encontrado con estas personas en mi vida, y por su fiel compañía en cada día.

# Objetivos

## Objetivo general

El objetivo de este trabajo es estudiar la dinámica de interacción de componentes de la sangre, en particular la física del proceso de agregación eritrocitaria, por medio de técnicas basadas en tecnologías que hacen uso de la luz. Se propone reconocer, caracterizar y cuantificar factores determinantes del comportamiento reológico de la sangre, y al mismo tiempo, ampliar el conocimiento sobre las técnicas aplicadas.

## Objetivos específicos

- Estudio, evaluación e implementación de las técnicas de Biospeckle láser y transmisión de luz para el estudio del proceso de agregación eritrocitaria.
- Modelizar *in vitro* la composición proteica del plasma sanguíneo mediante solución fisiológica con proteína albúmina y distintas concentraciones de dextrán, para analizar la incidencia en el fenómeno de agregación.
- Analizar experimentalmente el proceso de interacción celular eritrocitaria en distintas condiciones en el medio modelizado, estudiando el comportamiento de la agregación eritrocitaria con respecto a la variación de dextrán.
- Evaluar la obtención de parámetros conocidos referentes a la agregación eritrocitaria y la concepción de nuevos índices que aporten más información.
- Realizar un análisis cualitativo de los valores de los parámetros de agregación obte-

nidos mediante las técnicas de Biospeckle láser y de transmisión de luz.

# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>I</b>
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. El fenómeno de speckle láser . . . . .	1
1.1.1. Formación de una distribución de speckle . . . . .	2
1.1.2. Descripción estadística de la distribución de speckle . . . . .	5
1.1.3. Técnica de Biospeckle láser . . . . .	7
1.1.4. Técnica de transmisión de luz . . . . .	8
1.2. El fenómeno de agregación de glóbulos rojos . . . . .	9
1.2.1. Componentes y determinantes de la agregación en glóbulos rojos . .	11
1.2.2. Importancia de la carga superficial del glóbulo rojo . . . . .	12
1.2.3. Modelización de la agregación eritrocitaria . . . . .	12
1.2.4. Teoría de Depletion y modelo de Bridging . . . . .	15
<b>2. Materiales y metodología</b>	<b>19</b>
2.1. Material biológico . . . . .	19
2.1.1. Muestras de glóbulos rojos . . . . .	19
2.2. Técnica de Biospeckle láser . . . . .	20
2.2.1. Procedimiento, adquisición y procesamiento de datos . . . . .	21
2.2.2. Definición de los parámetros de agregación . . . . .	22
2.3. Técnica de transmisión de luz . . . . .	27
2.3.1. Procedimiento, adquisición de datos y procesamiento. . . . .	28

<b>3. Resultados</b>	<b>31</b>
3.1. Técnica de transmisión de luz . . . . .	32
3.2. Técnica Biospeckle láser . . . . .	35
3.2.1. Intensidad Media . . . . .	35
3.2.2. Coeficiente de Correlación . . . . .	36
3.2.3. Momento de Inercia . . . . .	40
3.2.4. Tamaño de grano de speckle . . . . .	41
<b>4. Discusiones y conclusiones</b>	<b>43</b>
4.1. Discusiones . . . . .	43
4.2. Conclusiones . . . . .	45
<b>A. Complemento de la estadística de la distribución de speckle</b>	<b>47</b>
<b>B. Modelos de la agregación eritrocitaria</b>	<b>53</b>
B.1. Modelo de doble capa difusa y el potencial zeta ( $\zeta$ ) . . . . .	53
B.2. Ecuaciones complementarias Depletion . . . . .	55
<b>Bibliografía</b>	<b>57</b>

# Resumen

La técnica óptica de BioSpeckle láser ha sido de gran utilidad en el estudio de materiales biológicos que presentan algún tipo de actividad. Debido a que es una técnica no destructiva y de alta sensibilidad, es empleada para el estudio de las propiedades del tejido sanguíneo. En el caso de esta tesina se la utilizará para la caracterización de la dinámica en la agregación eritrocitaria. Para validar los resultados obtenidos, se los compararán con los parámetros medidos mediante la técnica de transmisión de luz, la cuál es ampliamente utilizada.

El estudio de la agregación eritrocitaria es de gran importancia, ya que puede ser alterada por enfermedades como diabetes, hipertensión, etc., y una detección temprana de una anomalía en la agregación podría llevar a un rápido tratamiento para evitar la formación de trombos. Por eso, es de interés en Física Biomédica la obtención de parámetros que permitan caracterizar la cinética de la agregación, de manera rápida y sencilla.

Esta tesina está enmarcada en las líneas de investigación de los grupos de Física Biomédica, y de Óptica y Fotónica del Instituto de Física Rosario (IFIR-UNR). Los experimentos fueron llevados a cabo en el IFIR, con la colaboración del Área Física y del Área Química Analítica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia (UNR) para el manejo de muestras biológicas.

El desarrollo de esta tesina comenzó por un estudio de las técnicas ópticas a utilizar, el empleo y cuidado a la hora de manejar material biológico, y los factores biológicos que intervienen en el proceso de agregación junto a los aspectos físicos determinantes para la descripción de este proceso. Por eso, en el primer capítulo se realiza una introducción a la técnica de Biospeckle láser, se introducen conceptos y términos biológicos relevan-

tes al estudio, y se presentan distintos modelos de agregación eritrocitaria. También, se explica el interés del estudio de la agregación de glóbulos rojos como un caracterizador de patologías vasculares. Además, se describe brevemente la técnica transmisión de luz la cual es la más empleada para este tipo de estudios. En el segundo capítulo se presenta el método empleado para modelizar *in vitro* el medio de los glóbulos rojos, los dispositivos experimentales para ambas técnicas y se definen los parámetros para la caracterización de nuestro fenómeno de interés.

En primera instancia se realizaron ensayos de prueba y optimización del dispositivo a modo de aprendizaje, para el perfeccionamiento de las técnicas aplicadas. Una vez dominadas las técnicas se realizaron las mediciones, cuyos resultados son presentados en el tercer capítulo. Luego, en el cuarto capítulo se realizó un análisis comparativo de los parámetros de agregación de las técnicas aplicadas. Los estudios aquí aplicados contribuyen al desarrollo de nuevas técnicas no invasivas basadas en Biospeckle láser para mejorar el diagnóstico de patologías vasculares, en particular, caracterizar la dinámica de la agregación eritrocitaria.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. El fenómeno de speckle láser

La invención del láser permitió disponer de una fuente luminosa con un alto grado de coherencia. Se observó que la mayoría de las superficies iluminadas con un láser presentaban una apariencia granular de naturaleza aleatoria, a este fenómeno se lo denominó speckle [Jones y Wykes, 1989]. En un principio, el speckle fue considerado como un efecto que degradaba las imágenes generadas con un láser. Con el tiempo, al ir profundizando en su conocimiento, dejó de considerarse un problema para convertirse en la base de nuevas técnicas de medición.

El efecto speckle ocurre cuando una superficie ópticamente rugosa es iluminada por una onda de luz coherente. Es decir, en dicha superficie las diferencias de alturas entre puntos vecinos son del orden o mayores que la longitud de onda de la luz incidente, la cual es dispersada en direcciones aleatorias. El resultado de esta dispersión en un punto lejano de observación es un campo óptico resultante de las ondas difundidas por cada punto de la superficie iluminada. De esta manera, se obtiene una distribución espacial de puntos claros y oscuros, producto de las zonas de interferencia constructiva o destructiva como puede observarse en la Fig. 1.1.

Debido a alteraciones del elemento dispersor, como desplazamientos, giros y deformaciones, la distribución del campo óptico se modifica y puede ser aprovechada para estudiar las características de la superficie de dicho elemento [Goodman, 1975]. A causa de esta

propiedad de la distribución de speckle, se desarrollaron numerosos métodos de medición de alta sensibilidad en superficies dispersoras. Entre estos métodos se encuentra la técnica de Biospeckle láser, la cual se describirá en la Sec. 1.1.3. Los desarrollos tecnológicos, en lo que respecta a sistemas de cómputos y de adquisición de datos, y al desarrollo de algoritmos de procesamiento de señales, hicieron posible la aplicación de cámaras de vídeo conectadas a computadoras, que proveen capacidad para el almacenamiento y procesamiento de las imágenes adquiridas y la posibilidad de visualizar los resultados en tiempo real.

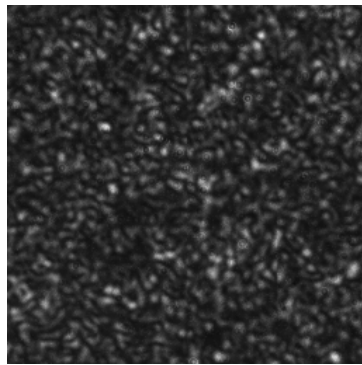


Figura 1.1: Distribución de speckle típica.

### 1.1.1. Formación de una distribución de speckle

Según el principio de Huygens-Fresnel, al iluminar con una luz coherente una superficie rugosa el valor del campo óptico en un punto de observación estará dado por la sumatoria de la totalidad de ondas elementales de cada punto dispersor de dicha superficie. Debido al carácter aleatorio de la variación de las alturas en la superficie rugosa, los valores iniciales del campo complejo de las ondas elementales generadas también serán aleatorios. Consecuentemente, el campo variará aleatoriamente para diferentes puntos de observación.

La distribución de speckle ocupa todo el espacio atravesado por la luz difundida y puede ser observada interponiendo una pantalla, o proyectándola a través de un sistema óptico. Al primer caso se lo conoce como speckle objetivo, ya que depende de las características globales de la superficie, y al segundo caso como speckle subjetivo, pues es el sistema óptico el que condiciona las características del speckle observado.

A continuación se analizará el caso del speckle objetivo, puesto que es la técnica de

nuestro interés.

## Speckle objetivo

Al considerar una fuente de luz coherente de longitud de onda  $\lambda$ , que ilumina una superficie localizada en el plano  $xy$ , como se muestra en la Fig. 1.2, la amplitud compleja  $\Omega(\mathbf{r})$  de la luz dispersada en el punto  $Q$  es la suma de las componentes elementales dispersadas por toda la superficie. Dicha amplitud se puede expresar como [Jones y Wykes, 1989]:

$$\Omega(\mathbf{r}) = \Upsilon_c \int \int_S \omega_j(x, y) \exp \left[ \frac{2\pi i}{\lambda} G \xi(x, y) \right] dx dy, \quad (1.1)$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector posición de los puntos  $Q$ ,  $\Upsilon_c$  es una constante,  $S$  es la superficie dispersora,  $\omega_j(x, y)$  representa la amplitud compleja de la luz incidente en el punto de coordenadas  $(x, y)$ ,  $\xi(x, y)$  es la altura de la superficie en dicho punto y  $G$  es un factor geométrico asociado con las direcciones de iluminación y observación, el cual puede considerarse constante cuando  $Q$  está lo suficiente lejos de la superficie dispersora.

Debido a la variación aleatoria de  $\xi(x, y)$  en una magnitud del orden o mayor que  $\lambda$ , los términos de fase  $G \xi(x, y)$  también variarán aleatoriamente en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, la amplitud resultante en el punto  $Q$  se describe por medio de un conjunto de vectores de fase aleatoria, los cuales, al ser sumados en forma conjunta, generan una amplitud resultante aleatoria. En consecuencia, la amplitud total varía entre cero y un valor máximo, que se determina por la magnitud y la fase de las amplitudes individuales. A medida que cambia el punto de observación, la amplitud resultante y la intensidad asumirán diferentes valores aleatorios, generándose de esta manera una distribución de speckle.

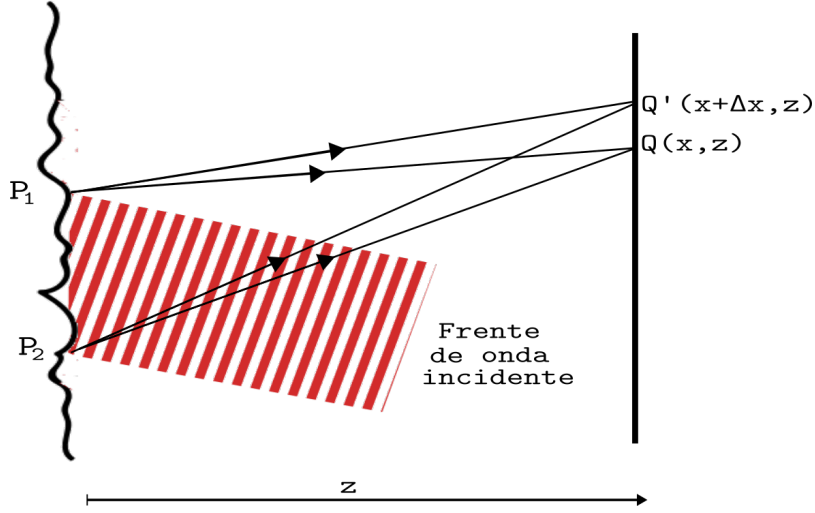


Figura 1.2: Formación del speckle objetivo.

Si se asume que el área iluminada es de dimensiones  $\ell_0 \times \ell_0$  y cuyos límites son los puntos  $P_1$  y  $P_2$ , como se indica en la Fig. 1.2, la diferencia de camino  $s$  entre los puntos  $P_1$  y  $P_2$  al punto  $Q$ , que se encuentra en las coordenadas  $(x, z)$ , está dada por:

$$s = (P_1Q - P_2Q) \approx \frac{x\ell_0}{z} + \frac{1}{2} \frac{\ell_0^2}{z}. \quad (1.2)$$

De manera análoga, para un punto adyacente  $Q'$ , que se encuentra en las coordenadas  $(x + \Delta x, z)$ , se tiene que dicha diferencia de camino se expresa:

$$s = (P_1Q' - P_2Q') \approx \frac{x\ell_0}{z} + \frac{1}{2} \frac{\ell_0^2}{z} + \frac{\Delta x\ell_0}{z}, \quad (1.3)$$

siendo la diferencia relativa de camino  $\Delta s$  entre  $Q$  y  $Q'$ :

$$\Delta s = \frac{\Delta x\ell_0}{z}. \quad (1.4)$$

Para los puntos tales que  $\Delta s < \lambda$ , las fases relativas de las componentes serán aproximadamente las mismas. En cambio, si:

$$\Delta s = \frac{\Delta x\ell_0}{z} \approx \lambda, \quad (1.5)$$

las diferencias en las fases relativas serán lo suficientemente grandes tal que la intensidad en  $Q'$  no esté correlacionada con la incidente en  $Q$ . De esta manera, el tamaño medio del grano de speckle  $d_{sp}$  para este caso se puede expresar por:

$$d_{sp} = \frac{\lambda z}{\ell_0}. \quad (1.6)$$

En consecuencia, el tamaño medio de los granos de speckle depende del área iluminada y de la posición de la pantalla de observación, pero no del sistema óptico utilizado para visualizarlo. Por esta causa, a este tipo de speckle se lo denomina como objetivo.

### 1.1.2. Descripción estadística de la distribución de speckle

Debido a la complejidad del estudio del speckle en condiciones generales se toman las consideraciones del caso simplificado, donde el objeto dispersor y la luz dispersada verifican las siguientes condiciones [Goodman, 1975; Kreis, 1996]:

- El número de elementos dispersores que contribuyen a la formación del speckle es muy grande y del mismo orden de magnitud para todos los puntos de la distribución.
- La amplitud y la fase de las ondas elementales que originan el speckle son variables aleatorias independientes entre sí.
- La fase de dichas ondas elementales es una variable aleatoria de distribución uniforme en el intervalo  $[-\pi, \pi]$ . Esta condición se puede asumir porque la superficie es ópticamente rugosa.
- La luz utilizada es monocromática.
- La luz difundida está polarizada linealmente.

En estas condiciones, la distribución obtenida se denomina speckle completamente desarrollado. Si las condiciones citadas anteriormente no se cumplen en su totalidad, las propiedades de la distribución se alteran dando lugar al speckle parcialmente desarrollado. Las propiedades de este último se estudian como desviaciones del comportamiento ideal del speckle.

En base a las condiciones previamente enumeradas, Goodman dedujo que el speckle completamente desarrollado tiene una distribución de intensidad y de fase descrita por

las siguientes funciones de densidad de probabilidades [Goodman, 1975]:

$$\varrho_I(I) = \begin{cases} \frac{1}{\langle I \rangle} \exp \left[ -\frac{I}{\langle I \rangle} \right] & \text{si } I > 0 \\ 0 & \text{en cualquier otro caso,} \end{cases} \quad (1.7)$$

$$\varrho_\psi(\psi) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi} & \text{si } \psi \in [-\pi, \pi] \\ 0 & \text{en cualquier otro caso.} \end{cases}$$

Por lo tanto, la distribución de intensidad del speckle obedece a una ley de probabilidad exponencial negativa mientras que su fase presenta una distribución uniforme. Esta estadística de primer orden permite explicar las grandes variaciones de intensidad que se observan en una distribución de speckle.

Para determinar el grado de desarrollo de una distribución de speckle, Goodman definió el contraste de speckle  $\nu$  como [Goodman, 1975]:

$$\nu = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} . \quad (1.8)$$

siendo  $\sigma_I$  la desviación estándar de la intensidad. El valor de contraste para un speckle completamente desarrollado es uno.

Del análisis de la estadística de segundo orden de una distribución de speckle, se obtiene la función de autocorrelación  $R_I$  de la intensidad  $I(x, y)$  la cual se define [Lehmann, 2001]:

$$R_I(x, y, x + \Delta x, y + \Delta y) = \langle I(x, y)I(x + \Delta x, y + \Delta y) \rangle . \quad (1.9)$$

La distancia entre dos puntos que minimice a  $R_I$  indicará el tamaño promedio del grano de speckle, ya que ambos puntos tendrán intensidades y fases independientes. Considerando el caso de speckle objetivo, formado por un área  $\ell_0 \times \ell_0$  iluminada uniformemente y con una distancia  $z$  desde la superficie dispersora al plano de observación, el tamaño de grano

obtenido para el primer mínimo de  $R_I$  es:

$$d_{sp} = \Delta x_{sp} = \frac{\lambda z}{l_0}, \quad (1.10)$$

que es igual al resultado obtenido anteriormente en Ec.1.6.

Para quien desee profundizar en el tema en el Apéndice A se desarrolla con mayor detalle la estadística de primer y segundo orden de la distribución de speckle.

A continuación, en las Sec. 1.1.3 y 1.1.4 se describen las técnicas de Biospeckle láser y transmisión de luz, respectivamente, que son los métodos de medición empleados en este trabajo de tesina.

### 1.1.3. Técnica de Biospeckle láser

Cuando la luz láser que da lugar a una distribución de speckle es dispersada por objetos que muestran algún tipo de actividad, como por ejemplo una muestra biológica, la apariencia visual del patrón es similar a la de un líquido en ebullición. Este efecto se denomina speckle dinámico y es causado por variaciones en la fase de la luz producidas por los movimientos de los centros de dispersión [Briers, 1978], cambios en el índice de refracción, etc.

El speckle dinámico, al ser empleado para estudiar materiales biológicos se lo denomina "Biospeckle"(en inglés *BioSpeckle Laser* o BSL), que fue empleado por primera vez por Asakura, al presentar una aplicación factible para el control del flujo sanguíneo [Asakura, 1988]. Diversos trabajos recientes han incursionado en la técnica de Biospeckle para caracterizar la dinámica de sistemas biológicos [Ansari y Nirala, 2015; Braga et al., 2017; Cardoso y Braga, 2014; White et al., 2011]. El registro digital de la evolución temporal de las distribuciones de Biospeckle y su posterior análisis numérico permite hallar una correlación entre la actividad detectada con los cambios en el funcionamiento biológico de células y tejidos [Rabal y Braga, 2009].

La elección de un conjunto determinado de algoritmos para caracterizar la dinámica de los sistemas biológicos está dada por la naturaleza de la señal registrada. En el caso

de un material homogéneo, donde la actividad está distribuida uniformemente en toda la muestra, se prefieren los métodos numéricos estadísticos. Por el contrario, para el caso de materiales no homogéneos, en los cuales la actividad esta localizada en diferentes regiones de la muestra, los métodos de procesamiento de imágenes han mostrado mayor eficiencia para interpretar la actividad de la muestra [Rabal y Braga, 2009]. Se ha reportado el uso de técnicas basadas en BSL en diversas áreas tales como evaluación de la capacidad germinativa y la humedad de semillas, el control de maduración de frutos, la determinación de densidad vascular funcional, la quimiotaxis y la motilidad de microorganismos, detección de hongos y el estudio de circulación sanguínea microvascular [Ansari y Nirala, 2015; White et al., 2011]. Recientemente, se presentaron técnicas basadas en BSL en las cuales es posible caracterizar la agregación eritrocitaria en sangre. [Toderi et al., 2020; Yeom y Lee, 2015]. Particularmente, en este trabajo de tesina se estudió la agregación eritrocitaria en un medio símil a la sangre humana empleando la técnica BSL. Además, los resultados obtenidos se compararon con la técnica de transmisión de luz [Toderi et al., 2017], la cual describiremos brevemente a continuación.

#### 1.1.4. Técnica de transmisión de luz

Como se mencionó anteriormente, la manera en que la luz se comporta al incidir en un medio brinda gran cantidad de información sobre lo que está ocurriendo en el mismo. La luz puede ser absorbida, dispersada o, si es un medio transparente, transmitida. Cuando se trabaja con materiales transparentes o semitransparentes, la transmisión de la luz se puede considerar como una doble refracción. Por ejemplo, en un vidrio la luz sufre una primera refracción al pasar del aire al vidrio, sigue su camino y vuelve a refractarse al pasar de nuevo al aire. Si después de este proceso el rayo de luz no es desviado de su trayectoria se dice que la transmisión es regular. Si se difunde en todas direcciones, como en los vidrios traslúcidos, tenemos el caso de la transmisión difusa. Y si predomina una dirección privilegiada tenemos la transmisión mixta, como ocurre en los vidrios orgánicos o en los cristales de superficie labrada. Debido a su simplicidad, la técnica de transmisión de luz (TL o en inglés *Light Trasmision*) ha sido ampliamente utilizada para estudiar

diferentes materiales, tanto biológicos [De Paepe et al., 2008; Helle L. Nielsen y et al, 2000; Schmid-Schönbein et al., 1972] como no biológicos [Putra et al., 2017]. En el campo de la biología, una de sus principales aplicaciones es la evaluación de la interacción eritrocitaria [Baskurt y Meiselman, 2009; Toderi et al., 2017]. En estos casos se estudia un silectograma [Brinkman et al., 1966], el cual es un gráfico que muestra la variación de intensidad de luz transmitida en función del tiempo (ver Fig. 1.3). Los parámetros característicos que brinda un silectograma se definirán en la Sec 2.3.1.

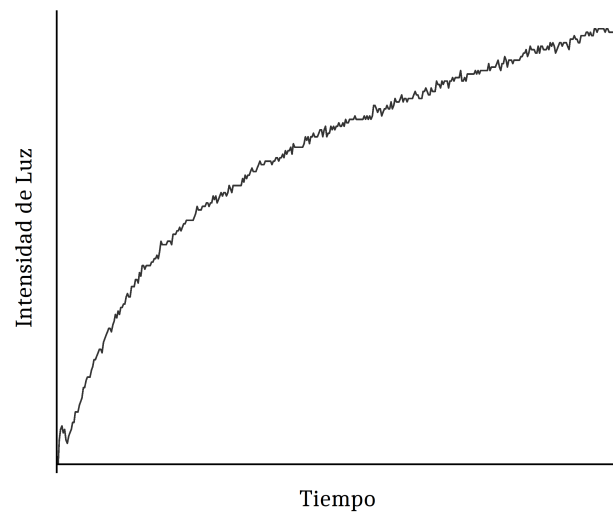


Figura 1.3: Ejemplo de silectograma típico para una muestra con dextrán al  $0,4 \frac{g}{dl}$  representando la intensidad de luz (registrada por algún medio en unidades arbitrarias) en función del tiempo.

## 1.2. El fenómeno de agregación de glóbulos rojos

Los globulos rojos (GR), también conocidos como eritrocitos, son células que componen en un 40 % el tejido sanguíneo. En varones normales cada milímetro cúbico de sangre contiene aproximadamente 5.000.000 de GR, mientras que en mujeres normales esta cantidad es de aproximadamente 4.200.000 [Dacie y Lewis, 2012]. Los GR normales, como se ve en la Fig. 1.4, presentan la forma de discos bicóncavos que tienen el diámetro medio de  $7,8 \mu m$  y un espesor de  $2,5 \mu m$  en su punto más grueso y  $1 \mu m$  en el centro.

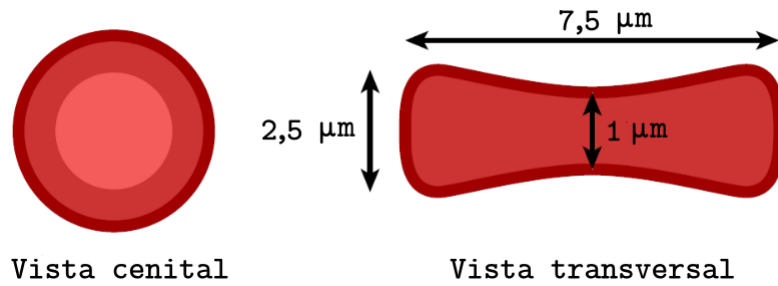


Figura 1.4: Esquema del GR mostrando sus dimensiones y su característica forma bicóncava [Toderi, 2020].

En la membrana del GR las proteínas cumplen funciones biológicas importantes: controlan la morfología de la célula, los mecanismos de transferencia y las actividades enzimáticas [Berk y Hochmuth, 1992]. Particularmente, las sialoglicoproteínas por su terminal de ácido siálico confieren cargas electronegativas al GR, e inducen la repulsión electrostática intereritrocitaria manteniéndolo monodisperso [D'Arrigo, 2000]. En la Fig. 1.5 se presenta la agregación en una geometría plana de dos dimensiones. Estas estructuras son llamadas *rouleaux* y pueden formar estructuras tridimensionales bajo condiciones apropiadas [Cokeley y Goldsmith, 1991]. La formación de *rouleaux* de mayores tamaños depende de las fuerzas de atracción y repulsión entre células, descritas en la Sec.1.2.3, y factores como la geometría del espacio disponible como puede verse en la Fig. 1.5.

Es conocido que la agregación de GR involucra fuerzas de atracción relativamente débiles [Neu et al., 2003; Skalak y Zhu, 1990]. Por lo que los agregados son disociados en estructuras más pequeñas o células individuales por la aplicación de fuerzas debidas al flujo del fluido (torrente sanguíneo). Por lo tanto, la agregación eritrocitaria, es un proceso reversible debido a que los agregados se reconstruyen al entrar en estasis\* una vez ausentes las fuerzas externas de corte. Mediante diversas técnicas se definen los índices de agregación eritrocitaria, los cuales son específicos a la suspensión celular.

---

\*Estasis: se hace referencia al estado de los GR con respecto a su medio, es decir, que se encuentra libre de flujo.

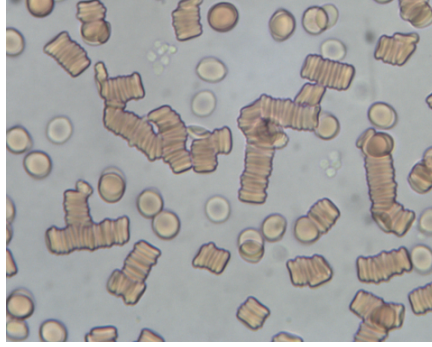


Figura 1.5: Imagen obtenida al fotografiar una concentración de  $0,1\% \frac{V}{V}$  de GR en plasma en estasis\* *in vitro*.

### 1.2.1. Componentes y determinantes de la agregación en glóbulos rojos

El fenómeno de agregación en sangre en estasis está asociado con la carga eléctrica en la superficie de los GR y el apantallamiento de la misma debido a las partículas suspendidas en su medio (el plasma sanguíneo) [Seaman, 1975]. En los GR este tipo de comportamiento también se puede obtener cambiando el medio mediante la suspensión de polímeros solubles de alta masa molecular tales como dextrán [Buxbaum et al., 1982; Flormann et al., 2016; Wagner et al., 2013]. Sin embargo, la agregación no ocurre en soluciones salinas como la solución fisiológica o el buffer fosfato salino (PBS, a pH 7,4, 295 mOsmol/kg). Esto se puede observar en la Fig. 1.6 (a) donde se muestran GR suspendidos en PBS con albúmina al  $1\% \frac{V}{V}$ <sup>†</sup>. Por otro lado, los GR suspendidos en plasma (Fig. 1.6 (b)) o dextrán (Fig. 1.6 (c)) sí forman *rouleaux*. Con esto se ve la importancia de las proteínas presentes en el plasma, las cuales son las encargadas de establecer las ligaduras entre los GR y cómo el dextrán genera un efecto similar.

---

<sup>†</sup>Se adiciona albúmina sérica humana para evitar la crenación de los GR, producto del contacto con el vidrio del portaobjeto (efecto vidrio [Londero et al., 2016]).

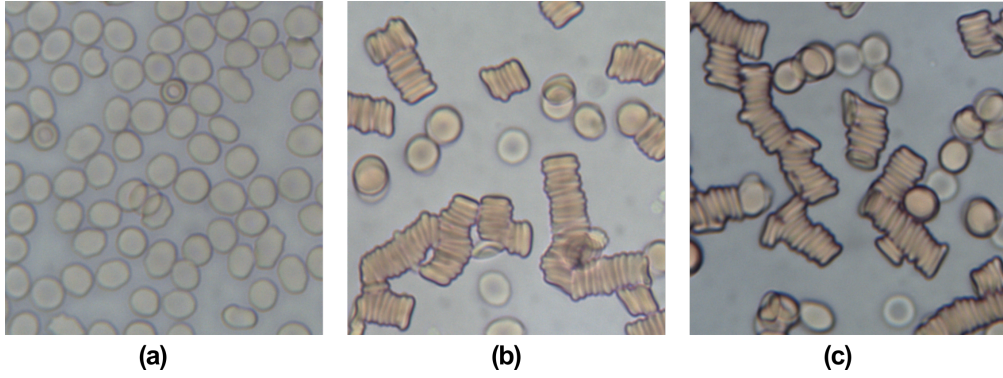


Figura 1.6: Imágenes obtenidas al fotografiar GR, (a) en una solución de albúmina al 1%  $\frac{V}{V}$ , (b) en plasma y (c) en una solución con albúmina y dextrán al 4%  $\frac{V}{V}$ .

### 1.2.2. Importancia de la carga superficial del glóbulo rojo

Una suspensión de GR en un medio fisiológico constituye un estado estable o metaestable que se puede esquematizar como la resultante de la acción de dos tipos de fuerzas opuestas: las fuerzas cohesivas, que tienden a atraer las células, y las fuerzas repulsivas, que tienden a separarlas. Estudios previos demuestran que los GR se comportan como partículas cargadas eléctricamente con características aniónicas [Seaman, 1975]. El origen de esta carga está ligado principalmente a la presencia en la superficie de grupos carboxílicos de los ácidos siálicos unidos a las glicoproteínas de membrana, constituyendo el glicocálix [Chien y Sung, 1987; Seaman, 1975]. Todos los GR son portadores de la misma carga, lo que genera en suspensión salina una fuerte repulsión entre células como se observa en la Fig. 1.6(a). En tal sistema, a nivel de la interfaz sólido-líquido, existe una fase de contacto caracterizada por la presencia de moléculas ionizadas en la que los efectos son modulados por movimientos brownianos.

### 1.2.3. Modelización de la agregación eritrocitaria

En el estudio del fenómeno de agregación eritrocitaria, el factor a considerar es la distancia media que separa las partículas en suspensión, la cual es modificada por procesos inmunológicos y por alteraciones de naturaleza puramente fisicoquímica. La suma de estos acontecimientos es lo que determina la formación de los agregados. Una suspensión estable de eritrocitos es la conjunción de dos fuerzas, las de repulsión ligadas a la carga

electrostática del GR y las fuerzas de cohesión ligadas a la tensión superficial entre los eritrocitos y la presencia de ligandos<sup>‡</sup> [Van Oss y Absolom, 1983].

### Modelo de doble capa difusa y el potencial zeta ( $\zeta$ )

El modelo de doble capa se utiliza para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se forma en las proximidades de un GR, debido a su carga negativa, y además para explicar el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas [Seaman, 1975].

En este modelo existen iones positivos que son atraídos por la carga negativa del GR, y se adhieren al mismo, formando así lo que se conoce como capa Stern. A su vez, existen otros iones positivos que son rechazados por dicha capa, pero al mismo tiempo son atraídos por la carga negativa del GR. Este sistema de iones que son atraídos y repelidos genera un equilibrio dinámico formando una capa difusa de carga neutra. En dicha capa, la concentración de iones disminuye a medida que se aumenta la distancia a la superficie del GR [Gramhame, 1947; Ruhenstroth-Bauer, 1965], como se puede ver en la Fig. 1.7.

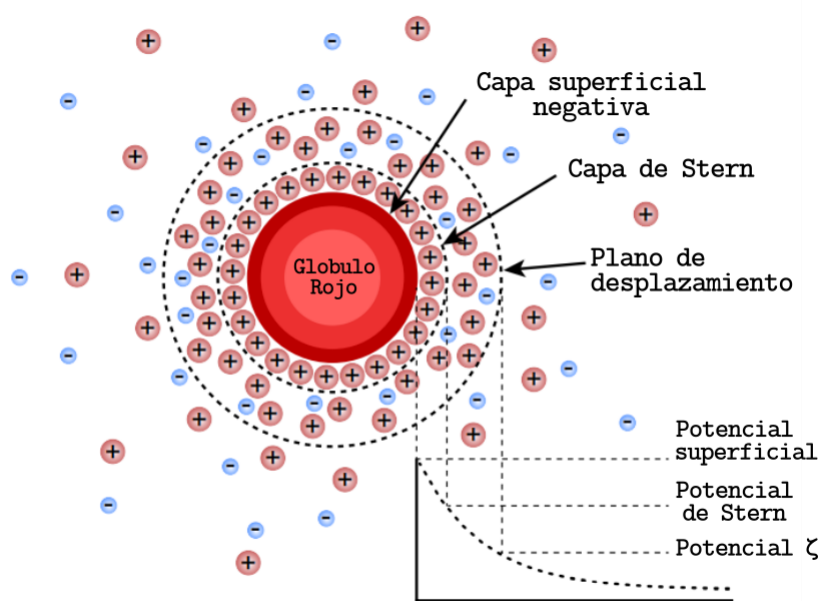


Figura 1.7: Distribución de iones alrededor del GR. Se observa una capa compacta de iones absorbidos y una capa difusa más externa [Toderi, 2020].

<sup>‡</sup>Denominación que recibe una molécula capaz de interactuar con un receptor de membrana.

Se crea entonces una diferencia de potencial entre el medio y la nube de contraiones<sup>§</sup> que rodea al eritrocito originando el potencial zeta  $\zeta$  [Stratton et al., 1973], el cual se expresa:

$$\zeta = \frac{\sigma x_D}{\epsilon}, \quad (1.11)$$

siendo  $x_D = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{2F^2 L}}$  la distancia de Debye-Hückel<sup>¶</sup> y  $L = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 C_i$  la fuerza iónica [Moelwyn-Hughes, 1961],  $\epsilon$  la permitividad eléctrica del medio y  $\sigma$  la densidad superficial de cargas. Para quien desee profundizar en el tema, puede encontrar en el apéndice B.1 la obtención del potencial  $\zeta$ .

La agregación, que es un proceso reversible, requiere la presencia de factores extracelulares e intracelulares. Una modificación en cualquiera de estos factores lleva a una modificación de  $\zeta$  y, en consecuencia, a un cambio en el patrón de agregación. Siendo la agregación más probable cuanto más débil sea el potencial  $\zeta$ . Como consecuencia, este potencial puede disminuir en tres circunstancias [Pollack et al., 1965]:

1. Reducción de la carga eléctrica superficial  $\sigma$ : Se incluyen en esta categoría los efectos debidos a la fijación de ligandos (fibrinógeno, anticuerpos, etc.) o la pérdida de ácido siálico de los GR (por enzimas proteolíticas, alteraciones patológicas, etc.).
2. Modificación de la constante dieléctrica del medio de suspensión  $\epsilon$ : Variación que puede introducirse por ejemplo mediante la modificación del contenido de moléculas en el medio.
3. Variación de la fuerza iónica del medio de reacción  $L$ : Estos efectos se basan sobre todo en la modificación de la composición iónica del medio [Chien y Sung, 1987].

Basándose en estos argumentos es posible modelizar las reacciones de agregación y modificarlas artificialmente. A continuación se describen los dos modelos de agregación eritrocitaria más empleados actualmente, los cuales se basan en el potencial zeta ( $\zeta$ ) y la distancia de Debye-Hückel ( $x_D$ ), y que se utilizaron para analizar los resultados obtenidos.

---

<sup>§</sup>Un contraión es el ion que acompaña una especie iónica y mantiene la neutralidad eléctrica. En la sal de mesa, el catión sodio es el contraión para el anión cloruro y viceversa.

<sup>¶</sup>La distancia de Debye-Hückel es el tamaño de longitud de la capa difusa.

### 1.2.4. Teoría de Depletion y modelo de Bridging

La agregación eritrocitaria es un proceso inducido por macromoléculas, tales como el fibrinógeno y algunos expansores de plasma como el dextrán. Existe una diferencia fundamental entre ellas, por ejemplo, a medida que el fibrinógeno aumenta en concentración, éste favorece la formación de *rouleaux*; sin embargo, un incremento de dextrán genera un máximo de formación de estructuras del cual al superar esta concentración se disminuyen los aglomerados de células [Buxbaum et al., 1982; Flormann et al., 2016], como se puede ver en la Fig. 1.8. Para abordar la dinámica macromolecular que interviene en el proceso de agregación eritrocitaria, consideraremos dos enfoques, la teoría de Depletion o agotamiento, y el modelo de Bridging o puente. Este último, considera la absorción de macromoléculas en la membrana del GR. Por otra parte, la teoría de Depletion implica efectos coloidales. En este caso, la exclusión de macromoléculas suspendidas entre dos eritrocitos adyacentes crea un gradiente osmótico que reduce el grado de hidratación de la superficie de los GR y facilita el contacto de las membranas próximas.

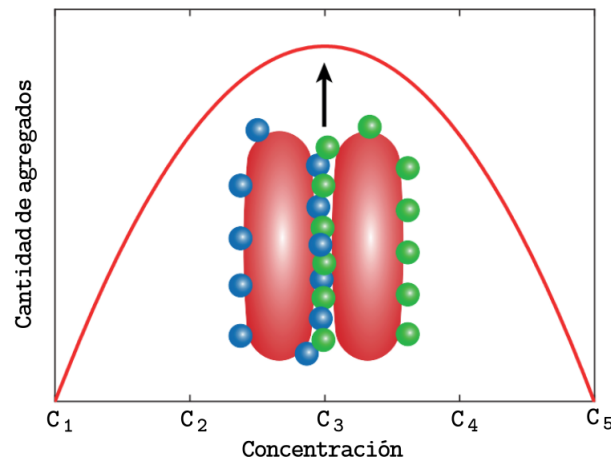


Figura 1.8: Curva de concentración de macromoléculas versus cantidad de agregados. Las macromoléculas azules corresponden al eritrocito de la izquierda y las verdes al de la derecha. En el punto en que existe un 50 % de ocupación en cada célula, se puede inferir que la energía de interacción está en un máximo [Toderi, 2020].

#### Teoría de Depletion.

Para este desarrollo se considera un medio en el que hay esferas pequeñas rígidas, macromoléculas en el caso de la sangre, y dos grandes discos o esferas, los GR. En este

modelo, el centro de masa de las esferas más pequeñas no se puede acercar a la superficie de los cuerpos grandes a una distancia menor que el radio de dichas esferas pequeñas. Así se obtiene un volumen alrededor de los cuerpos grandes denominado capa de agotamiento. Cuando estas capas se superponen se obtienen zonas “prohibidas”, como se muestra en la Fig. 1.9. Las macromoléculas no pueden ocupar este volumen que se convierte en una fase de solvente puro. De esta manera, para llegar al equilibrio surge una fuerza equivalente a la presión osmótica de la solución de macromoléculas, que actúa en la superficie exterior de los cuerpos grandes que origina la atracción mutua [Asakura y Oosawa, 1958].

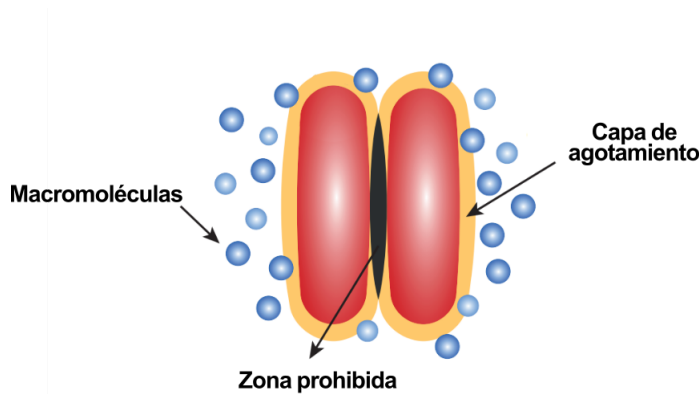


Figura 1.9: Se observa la existencia de una zona de solvente puro (color negro) entre los GR, las macromoléculas (color azul), las capas de agotamiento (color amarillo) de ambas células [Toderi, 2020].

Para este caso, se tienen en cuenta elementos de mayor complejidad como la capacidad de compresión de las macromoléculas cuando están cerca de una interfaz [Vincent, 1990]. Además, las macromoléculas también pueden penetrar el glicocáliz del eritrocito alterando el efecto atractivo originado por las moléculas exteriores [Neu et al., 2003].

Teniendo en cuenta los factores mencionados, se escribe la energía de interacción atractiva de la siguiente manera:

$$\omega_D = -2\Pi \left( \Lambda - \frac{d}{2} + \delta_{gl} - p \right), \quad (1.12)$$

siendo  $\Lambda$  el grosor de la capa de agotamiento,  $d$  la distancia entre las caras adyacentes,  $\delta_{gl}$  el grosor del glicocáliz y  $p$  la distancia de penetración. Tanto la presión osmótica  $\Pi$  como la capa de agotamiento  $\Lambda$  y la distancia de penetración  $p$  dependen de la concentración de la masa del polímero  $c_2^b$ . En consecuencia,  $\omega_D$  es función de  $c_2^b$ . Para quien este interesado en el tema, puede profundizar dicha relación en el apéndice B.2.

Por otro lado, si consideramos la energía electrostática de interacción intercelular  $\omega_E$ , cuyo desarrollo se encuentra en el apéndice B.2, la energía total de interacción por unidad de área de la superficie celular para dos GR agregados está dada por:

$$\omega_T = \omega_D + \omega_E. \quad (1.13)$$

Debido a la dependencia de  $\omega_D$  de la concentración de la masa del polímero  $c_2^b$  y que  $\omega_E$  solo depende de la distancia entre células, esta teoría permite explicar de manera simplificada el comportamiento de tipo campana de la Fig. 1.8, debido a que los cambios en la energía de interacción total son replicados en la agregación de los GR. A mayor módulo de  $\omega_T$  mayor agregación y viceversa.

### Modelo de Bridging

El modelo de Bridging sostiene que las macromoléculas filamentosas, como el fibrinógeno, promueven la agregación al interponerse entre los eritrocitos formando puentes entre sus membranas, que reducen la repulsión electrostática de las células. El marco teórico de la física de adhesión celular se puede aplicar de manera general sin referenciar un mecanismo molecular específico y se centra en la formación del enlace [N'Dri et al., 2003; Zhu, 1991]. La fuerza de agregación  $f_{ag}$  por unidad de longitud de la membrana celular es:

$$f_{ag} = f_e n_e \frac{X}{l}, \quad (1.14)$$

siendo  $X$  la distancia entre células,  $l$  la distancia de estiramiento,  $n_e$  la densidad de enlaces por célula y  $f_e$  la fuerza asociada a cada uno de los enlaces. Dichos enlaces, al comportarse como resortes que se estiran, permiten determinar la fuerza  $f_e$  como:

$$f_e = k_e(l - l_0). \quad (1.15)$$

La fuerza intermembrana, debido al entrecruzamiento de moléculas, es gobernada por ecuaciones de reacción, con tasas que dependen de la distancia entre las membranas. El término de reacción para una célula se calcula sobre todas las demás células, obteniendo la distancia mínima entre células vecinas. Si esta distancia es menor a cierto umbral, el par formará un enlace. La reacción depende de la variación temporal de  $n_e$ , para esto se

aplica este marco teórico en simulaciones numéricas [N'Dri et al., 2003], lo que permite explicar de manera intuitiva el comportamiento de tipo campana para la formación de agregados en presencia de macromoléculas que se aprecia en la Fig. 1.8. Si las superficies de los eritrocitos tuvieran “ocupados” todos los puntos de vínculo, no podría generarse un enlace hacia la otra célula. Por lo que es razonable pensar que el punto óptimo ocurrirá cuando ambas células tengan media ocupación de los puntos de vínculo en sus membranas. La suposición que sustenta este razonamiento es que ambas células agregadas contribuyen en igual número de moléculas a la formación del enlace, lo cual podría limitar en cierta forma el modelo a su ajuste empírico.

Los fenómenos de Depletion y Bridging pueden coexistir en sistemas coloidales variando la concentración de los elementos más pequeños, en nuestro caso las macromoléculas [Fantoni et al., 2015]. Como se ha mencionado, de acuerdo al modelo de Bridging, la situación óptima para la formación de agregados se encuentra en ocupaciones medias para cada célula. Cuando la concentración de macromoléculas es mayor, las superficies de los GR se vuelven neutras ya que poseen ocupados todos sus puntos de vínculo, y una capa de agotamiento puede formarse llevando a las células a acercarse y formar agregados. El fenómeno de Depletion puede ocurrir sin necesidad de tener Bridging al 100% debido a la presión osmótica de las macromoléculas, y es por esto que ambos fenómenos coexisten.

# Capítulo 2

## Materiales y metodología

### 2.1. Material biológico

Para realizar las mediciones correspondientes se utilizaron muestras de sangre humana, las cuales fueron extraídas y procesadas en el Área Química Analítica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia (FCByF), de la Universidad Nacional de Rosario (UNR). Se siguieron los protocolos y normas de Bioética y Seguridad establecidas por la FCByF. La extracción de la sangre se realizó mediante punción venosa y anticoagulada con EDTA\*. Las muestras fueron conservadas a  $4^{\circ}C$  hasta su utilización dentro de las 24 horas de extraídas.

#### 2.1.1. Muestras de glóbulos rojos

Para la obtención de GR, se centrifugó la sangre extraída mediante la centrífuga (Paralwall Model PWL 12T) durante 5 minutos a 2500 rpm y a  $25^{\circ}C$ . Luego se extrajeron los GR mediante una pipeta automática de volumen variable, descartando así el plasma y la capa leucoplaquetaria.

Para el tratamiento de las muestras se emplearon: tubos de plástico contenedores, guantes de látex, micropipetas automáticas de volumen variable Boeco de capacidades máximas  $1000\mu L$ ,  $200\mu L$ , y  $50\mu L$ , portaobjetos de vidrio comunes (B&C Germany de

---

\*EDTA: es un anticoagulante empleado para la conservación de las muestras de sangre.

$75 \times 25\text{mm}^2$  ).

Luego, para la observación y adquisición de las imágenes digitales de los GR y la formación de *rouleaux* se empleó un Microscopio Óptico Biológico Boeco (BM-117) con cámara Arcano de  $5Mp$  incorporada. Con este sistema de adquisición se obtuvieron las fotografías de GR con hematocrito del 2% en distintos medios de suspensión que se observan en la Fig. 3.1.

Los rangos fisiológicos normales de hematocrito<sup>†</sup> varían con la edad y el sexo de la persona. Los valores normales en hombres adultos varían del 42% al 54%, mientras que en mujeres adultas estos valores varían del 38% al 46% [Kasper et al., 2011]. Para las distintas etapas de trabajo se preparó un hematocrito del 40%, a modo de replicar la composición promedio fisiológica natural de la sangre humana.

### Tratamiento con dextrán

Para reemplazar el plasma sanguíneo se preparó un medio de suspensión (MS) mezclando PBS, EDTA (0,056%) y albúmina (BSA Sigma) al 1%. Para inducir la formación de agregados de eritrocitos, se utilizó dextrán 500 ( $500kDa$  de peso molecular) [Neu et al., 2008]. Se preparó una solución principal de dextrán al 10% en PBS y se mezcló con el MS para constituir soluciones de dextrán a  $0,2\frac{g}{dl}$ ,  $0,4\frac{g}{dl}$ ,  $0,8\frac{g}{dl}$  y  $1,2\frac{g}{dl}$ . Posteriormente, se prepararon suspensiones de GR en estos medios de dextrán junto con una muestra de control sin dextrán. Finalmente, estas muestras se analizaron con las técnicas de BSL y TL.

## 2.2. Técnica de Biospeckle láser

El dispositivo experimental utilizado para analizar las muestras por medio de la técnica de BSL se puede ver esquematizado en la Fig. 2.1, donde se observa el láser He-Ne ( $\lambda = 632,8nm$ ,  $60mW$ , Melles Griot) empleado para iluminar la muestra, cuyo haz atraviesa un atenuador dimmer para ajustar la intensidad del láser. Luego, se coloca una lente expansora de  $10\times$ , y se filtran las altas frecuencias con un filtro del tipo pinhole con el fin

---

<sup>†</sup>Se denomina hematocrito al porcentaje del volumen total de sangre que esta compuesta por GR.

de homogeneizar la fuente lumínica. Posteriormente, el haz es reflejado por el espejo 1 y es redireccionado hacia el chip óptico (soporte físico para la muestra de suspensión de GR, ver Fig. 2.2 ). El chip óptico se colocó en un plano horizontal nivelado en superficies para así obtener una distribución más homogénea de los GR dentro de la muestra. Finalmente, el espejo 2 permitió la observación del haz dispersado hacia adelante, obteniendo una imagen de BSL. Los datos fueron registrados con una vídeo cámara (Dalsa modelo CA-D6,  $100\mu m^2$  por píxel) controlada externamente por un frame grabber (Coreco Imaging PC-DIG) ubicado dentro de una computadora, el cual digitaliza las imágenes adquiridas por la cámara en 256 niveles de gris (8 bits) con una resolución de  $256 \times 256$  píxeles. Para evitar interferencias de vibraciones mecánicas externas el sistema se montó en una mesa óptica antivibratoria Melles Griot.

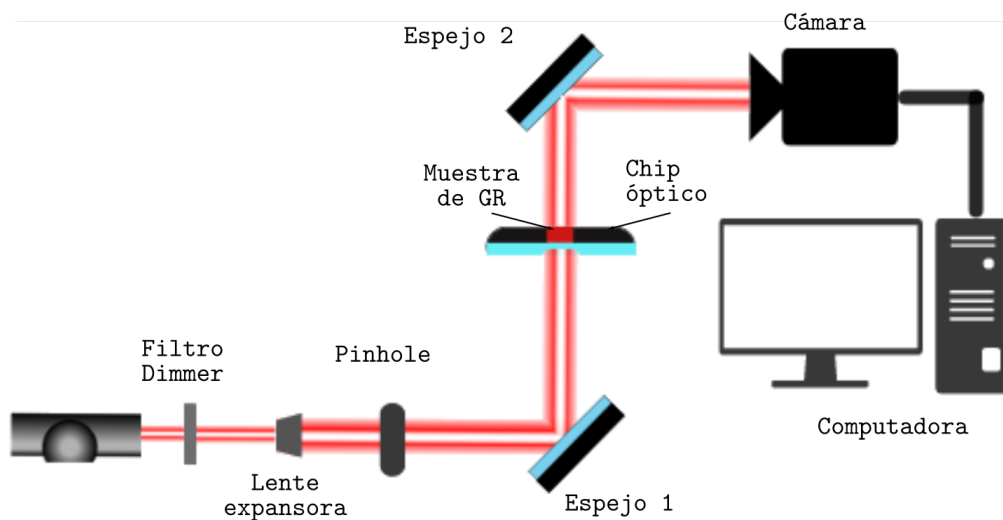


Figura 2.1: Esquema del dispositivo experimental BSL.

### 2.2.1. Procedimiento, adquisición y procesamiento de datos

Antes de iniciar las mediciones, se hacía funcionar el láser por 10 minutos aproximadamente para que la intensidad de su salida se estabilice, de forma de minimizar las variaciones de intensidad. Posteriormente, se inició el software que controla la cámara de video, y se fijó la frecuencia de adquisición en 8 imágenes por segundo (8 fps). Para realizar las mediciones se llenó el chip óptico con  $15\mu L$  de la suspensión de GR. Posteriormente, se desagregó la muestra mediante agitación con la punta de la micropipeta por 1 minuto y

se la dejó reposar. Finalmente, se adquirieron 2000 imágenes de BSL durante 250s. Para el análisis de los datos se empleó un software propio, el cual crea una matriz 3D del mapa de niveles de grises, con la que se trabajará para hallar los parámetros de agregación.

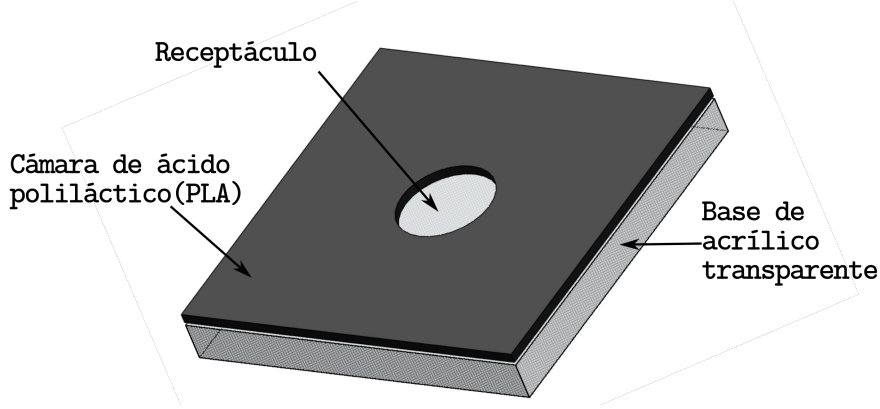


Figura 2.2: Esquema del chip óptico empleado como soporte físico de las muestras [Toderi, 2020].

### 2.2.2. Definición de los parámetros de agregación

Para el estudio de la dinámica de la distribución de BSL se utilizaron los siguientes parámetros: Intensidad Media  $\langle I \rangle$ , Coeficiente de Correlación  $CC$ , Momento de Inercia  $IM$ , y Tamaño de grano de speckle  $d_{sp}$ .

#### Intensidad Media

La Intensidad Media  $\langle I(\tau) \rangle$  para el frame  $\tau$  se obtiene evaluando el promedio matemático de los elementos de la matriz tridimensional  $I(x, y, \tau)$ , con  $x = 1; 2; \dots; M$ ,  $y = 1; 2; \dots; N$ , y  $\tau = 1; 2; \dots; 2000$ , es decir:

$$\langle I(\tau) \rangle = \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I(m, n, \tau), \quad (2.1)$$

en nuestro caso  $M$  y  $N$ , representan el número de filas y columnas respectivamente, ambos con valor de 256.

## Coefficiente de Correlación

Se define el Coeficiente de Correlación  $CC(\tau_0, \tau)$  entre imágenes como [Federico et al., 2006]:

$$CC(\tau_0, \tau) = \frac{\langle I(\tau_0)I(\tau) \rangle - \langle I(\tau_0) \rangle \langle I(\tau) \rangle}{\sqrt{(\langle I^2(\tau_0) \rangle - \langle I(\tau_0) \rangle^2)(\langle I^2(\tau) \rangle - \langle I(\tau) \rangle^2)}}, \quad (2.2)$$

donde  $\langle \rangle$  denota el valor medio. Este coeficiente proporciona una comparación cuantitativa de la similitud de cada distribución de BSL, correlacionando  $I(\tau)$  de la serie temporal, con respecto a  $I(\tau_0)$ , correspondiente al frame  $\tau_0$  elegido como estado de referencia. Además, la gráfica de  $CC(\tau_0, \tau)$  en función del número de frame proporciona una medición cualitativa de la dinámica del proceso bajo análisis. Por lo que, este índice está relacionado con el movimiento de los GR en la muestra.

## Momento de Inercia

Para calcular el Momento de Inercia  $IM$  es necesario construir el “Time History Speckle Pattern” (*THSP*) [Oulamara et al., 1989] y la Matriz de Coocurrencia  $COM$  [Arizaga et al., 1999]. El *THSP* almacena la variación de la intensidad de cada píxel a través del tiempo y está representada por una imagen donde la coordenada vertical “ $a$ ” corresponde a cada píxel  $(x, y)$  y la horizontal “ $\tau$ ” a cada frame de la colección. El valor de intensidad del punto de coordenadas  $(a, \tau)$  es el valor del píxel  $a$  en el frame  $\tau$  como se observa en la Fig. 2.3. El *THSP* permite apreciar evoluciones temporales de mayor o menor actividad, en función de la continuidad de las líneas horizontales en su expresión gráfica. Las líneas son formadas cuando un píxel no varía su valor de intensidad a lo largo del tiempo.

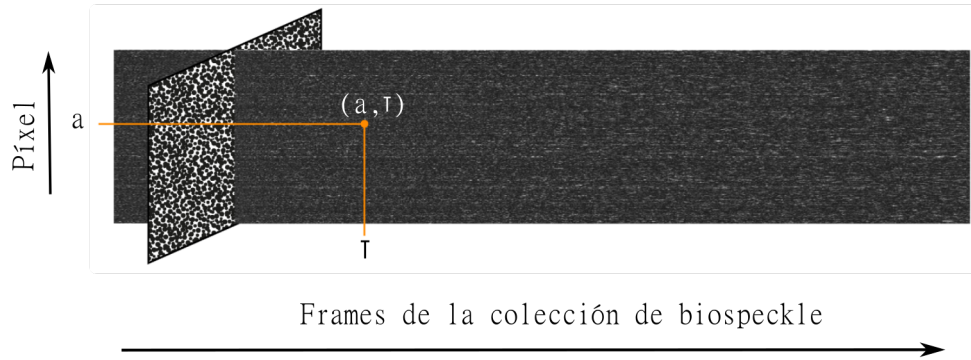


Figura 2.3: Ejemplo del *THSP* construido a partir de los píxeles de una línea vertical. Cada fila representa la evolución temporal de la intensidad del píxel correspondiente.

En este trabajo de tesina, los puntos que constituyen el *THSP* fueron seleccionados aleatoriamente, basado en una distribución gaussiana en 2 dimensiones alrededor del píxel central de las imágenes de la matriz de BSL, como se ve en la Fig. 2.4. Esta selección se realiza para cada colección de imágenes.

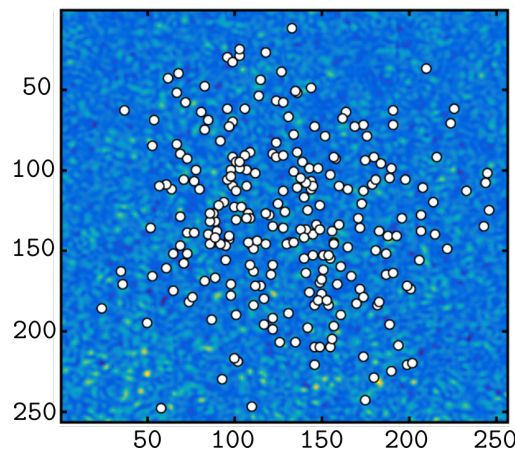


Figura 2.4: Distribución gaussiana para 256 píxeles (círculos blancos) elegidos aleatoriamente alrededor del centro de la imagen, utilizados para construir el *THSP*.

Se define como *COM* a la matriz que permite evaluar la dispersión de píxeles consecutivos en el *THSP*, representando un histograma de transición de intensidades. La matriz *COM* está compuesta, en nuestro caso, por 256 filas y 256 columnas, siendo la fila 1 el nivel de gris 0 y la fila 256 el nivel de gris 255, de manera análoga para las columnas. El valor de cada elemento de la matriz  $COM(i, j)$  representa el número de veces que un nivel de gris  $i$  es seguido inmediatamente por un nivel de gris  $j$ . Se presenta en la Fig. 2.5 (a) un ejemplo de *COM* en 2D, donde la variación de color representa el número de ocurrencias.

cias consecutivas de cada elemento, y en la Fig. 2.5 (b) se lo presenta en 3D para que se puedan apreciar, con mayor facilidad, la variación de los valores de cada elemento de la *COM*.

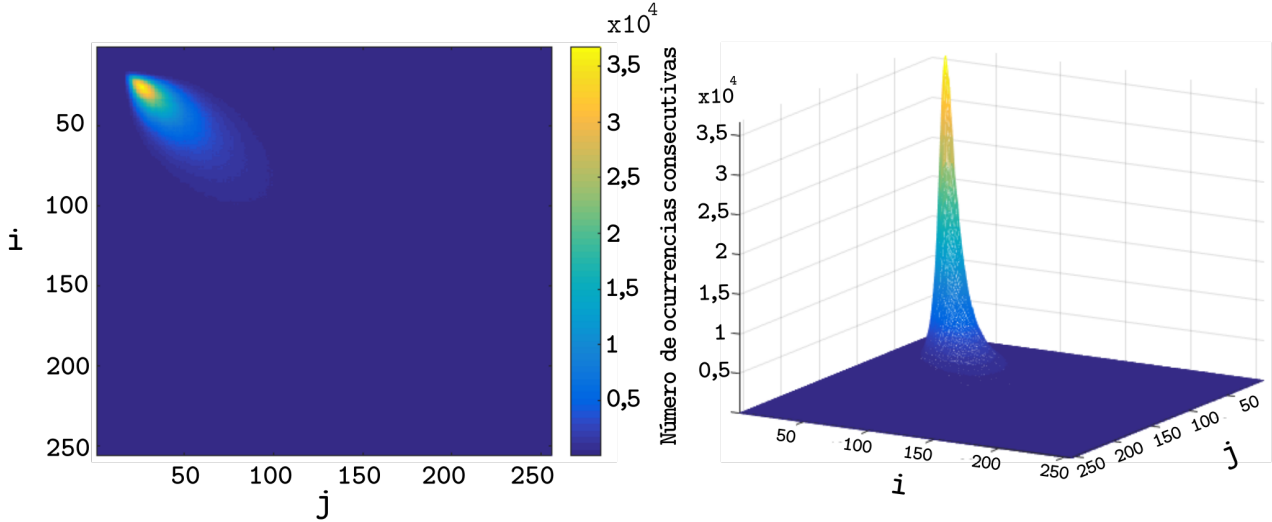


Figura 2.5: Matriz de Coocurrencia (*COM*) calculada a partir del *THSP* con selección de distribución gaussiana: (a) en 2D y (b) en 3D.

Los puntos de la *COM* se distribuyen a lo largo de la diagonal principal de la matriz, lo que indica la actividad de la muestra. Esta actividad, se atribuiría al movimiento browniano de las células aisladas, a la formación de agregados y al proceso de sedimentación. De manera visual, cuanto mayor es la actividad, mayor es la dispersión alrededor de la diagonal principal. Esta dispersión puede cuantificarse por el Momento de inercia *IM*, que se define como:

$$IM = \sum_{i=0}^{255} \sum_{j=0}^{255} \frac{COM(i, j)}{Norm} |i - j|^2, \quad (2.3)$$

siendo *Norm* la suma de todas las coocurrencias [Moreira, 2013].

### Tamaño de grano de speckle

Para realizar una estimación del tamaño de grano de BSL se calcula la función de autocovarianza normalizada de la distribución de intensidades registrada en la matriz 3D para cada frame. Este método utiliza la función de autocorrelación de la intensidad que proporciona una medida del radio promedio de un grano de speckle [Piederrière et al., 2005], el cual nos permite comparar la diferencia en las intensidades de dos puntos distin-

tos, por ejemplo  $(x_1, y_1)$  y  $(x_2, y_2)$  en un dado frame. Para esto emplearemos la función de autocorrelación de la intensidad  $R_I(x, y)$  definida anteriormente por la Ec. 1.9, de esta manera podemos expresar la función de autocovarianza normalizada de la intensidad,  $AC(x, y)$  como:

$$AC(x, y) = \frac{R_I(x, y) - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2}. \quad (2.4)$$

Según el teorema de Wiener-Khintchine, la función de autocorrelación está dada por la transformada inversa de Fourier  $FT^{-1}$  de la densidad espectral de potencia (en inglés *Power Spectral Density* o *PSD*) que se expresa como [Piederrière et al., 2004]:

$$PSD(v_x, v_y) = |FT[I(x, y)]|^2, \quad (2.5)$$

donde  $FT$  es la transformada de Fourier. De esta manera,  $AC(x, y)$  calculada a partir de la distribución de BSL resulta:

$$AC(x, y) = \frac{FT^{-1}[|FT(I(x, y))|^2] - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2}, \quad (2.6)$$

donde,  $AC(x, 0)$  y  $AC(0, y)$  son los perfiles horizontal y vertical de  $AC(x, y)$  respectivamente. Luego, el ancho a la mitad del máximo de la función  $AC$  se define como  $a_h$  y  $a_v$  para el perfil horizontal y el vertical respectivamente, como se muestra en la Fig. 2.6. Estos parámetros brindan información de las dimensiones del grano de speckle. Adicionalmente, se definió  $d_{sp} = a_h \times a_v$  como una aproximación de la superficie que ocupa el grano en la distribución de BSL.

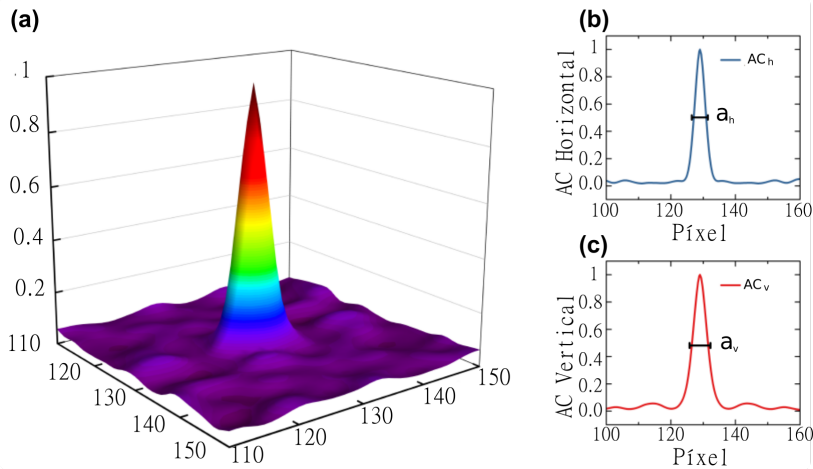


Figura 2.6: (a) Reconstrucción 3D de la función de autocovarianza para un frame particular de la colección obtenida de BSL de una muestra de suspensión de GR, (b) perfil horizontal y semi ancho  $a_h$ , (c) perfil vertical y semi ancho  $a_v$ .

Para calcular el tamaño de grano de speckle se emplea la Ec. 1.9 en vez de Ec. 1.6, debido a que la teoría de la Sec. 1.1.1 describe un speckle con dispersores estáticos, en cambio en nuestro experimento contamos con los GR como elementos dispersores, los cuales presentan movimientos brownianos, y movimientos debidos a la sedimentación y a la agregación, además de ser elementos traslúcidos.

## 2.3. Técnica de transmisión de luz

Para la técnica de TL se empleó como soporte físico de la muestra el mismo chip óptico descrito en la técnica BSL. Como fuente lumínica se empleó un led equipado con un estabilizador de corriente para reducir posibles ruidos en la intensidad de la fuente. Para el registro de la variación de intensidad lumínica se utilizó un fotomultiplicador (Photomultiplier Photometer Model 1118A11) y para su procesamiento una computadora.

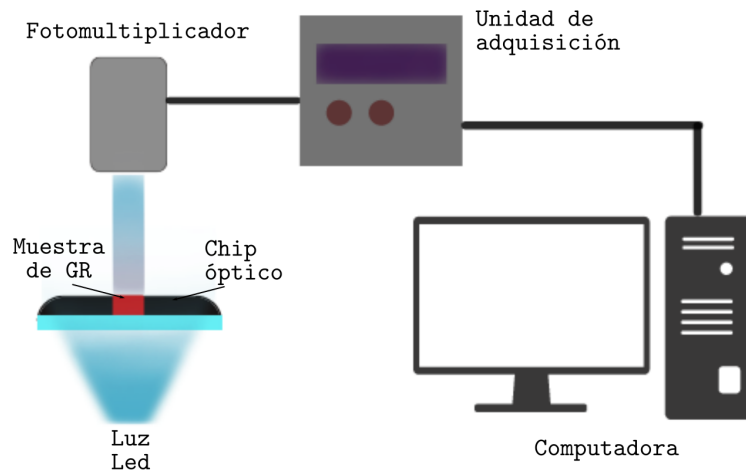


Figura 2.7: Esquema del dispositivo experimental de la técnica de TL.

El dispositivo experimental se puede ver esquematizado en la Fig. 2.7. El mismo consta de una luz led ubicada debajo del porta muestra donde se coloca el chip óptico. Una vez que el haz atraviesa la muestra es registrado por el fotomultiplicador. Luego, la señal es transmitida a través de un puerto serie a una computadora, donde es registrada por un software de adquisición específico que confecciona una tabla de intensidad de luz versus tiempo transcurrido.

### **2.3.1. Procedimiento, adquisición de datos y procesamiento.**

Para dar inicio al proceso de medición se encendió la luz led y la unidad de control. Posteriormente, se alineó el fotomultiplicador para que cubriera el mayor área posible del sensor del fotomultiplicador con el haz de luz. Como paso siguiente, se colocó el chip en el soporte, entre el fotomultiplicador y el led, haciendo coincidir el paso del haz. Al momento de efectuar las mediciones, se inyectó la muestra en el chip y se agitó con la punta de la micropipeta por un minuto el fluido suavemente para desagregar los GR que se encontraban en estasis. A continuación, se activó el registro de datos en la computadora. Es necesario resaltar que la habitación donde se encontraba nuestro sistema experimental fue previamente aislada de cualquier fuente de luz externa.

Al inyectar la suspensión de GR, la luz transmitida disminuía drásticamente, lo que hizo necesario aumentar la sensibilidad del aparato para notar las variaciones en intensidad buscadas. El tiempo entre que se activó la medición y se aisló el sistema fue de 10 segundos, que fueron descartados en las tablas confeccionadas. Se dejó evolucionar la muestra por aproximadamente 7 minutos y se obtuvo una tabla de dos columnas, registrando intensidad de luz y tiempo transcurrido, para luego graficar el silectograma correspondiente.

#### **Definición de los parámetros de agregación.**

La dinámica de agregación eritrocitaria es un proceso relativamente lento pero que tiene fases marcadas y tiempos característicos, los cuales están marcados por la formación de *rouleaux* y los aglomerados tridimensionales. Además, se ven afectados por otros procesos que ocurren en simultáneo como la sedimentación de las células o deshidratación de la muestra.

Teniendo en cuenta la curva del silectograma obtenido se calcularon los parámetros que la caracterizan y describen el proceso de agregación, que definiremos a continuación. La curva de intensidad en función del tiempo obtenida obedece al ajuste [Toderi et al.,

2017]:

$$I(t) = I_f \cdot \exp\left[\frac{-t}{T_f}\right] + I_s \cdot \exp\left[\frac{-t}{T_s}\right] + I_0, \quad (2.7)$$

donde  $T_f$  y  $T_s$  son constantes temporales del proceso de agregación que pueden considerarse como un conjunto de eventos múltiples, dobletes, *rouleaux*, y formaciones tridimensionales descritos en la Sec. 1.2, que ocurren en minutos. Las constantes temporales  $T_f$  y  $T_s$  representan la rápida formación de *rouleaux* y la agregación tridimensional lenta, respectivamente.

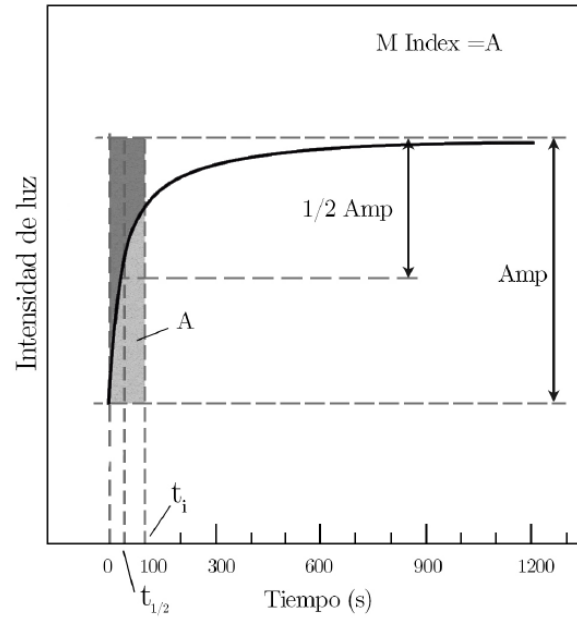


Figura 2.8: Representación de los parámetros de agregación en el silectograma [Toderi et al., 2017].

Los parámetros de agregación que se muestran en la Fig. 2.8, son los siguientes:

- Amplitud (Amp): La diferencia entre  $I_{min}$  y la intensidad de luz en un tiempo  $t_i$  determinado.
- Tiempo mitad ( $t_{1/2}$ ): El tiempo requerido para alcanzar la intensidad de luz  $I_{min} + \frac{Amp}{2}$ , indicando la constante temporal característica para alcanzar el nivel medio de agregación en  $t_i$ .
- $M_{index}$ : El área debajo del silectograma en un periodo de tiempo  $t_i$ , indicando el grado de acumulación de agregados durante ese tiempo.

Los tiempos  $t_i$  elegidos para el calculo de los parámetros de agregación en este trabajo fueron: 60s, 120s y 400s.

# Capítulo 3

## Resultados

En primera instancia, se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica TL que es un método ampliamente utilizado para la caracterización de la agregación eritrocitaria. Luego, dichos resultados se comparan con los obtenidos mediante BSL, particularmente con los obtenidos analizando la Intensidad Media  $\langle I \rangle$  de las distribuciones de speckle. En este caso, se realiza un análisis similar al de TL. Posteriormente, se presentan nuevos parámetros obtenidos empleando la técnica BSL, para caracterizar la dinámica de la agregación eritrocitaria comenzando por el Coeficiente de Correlación  $CC$ , seguido por los del Momento de Inercia  $IM$ , y para finalizar se presentan los resultados obtenidos para la variación del Tamaño de Grano de speckle  $d_{SP}$ . Para esto, se realizaron pruebas de GR suspendidos en distintos MS, como se mencionó en la Sec. 2.1.1, con concentraciones de dextrán al  $0,2 \frac{g}{dl}$ ,  $0,4 \frac{g}{dl}$ ,  $0,8 \frac{g}{dl}$  y  $1,2 \frac{g}{dl}$ .

La Fig. 3.1 muestra fotografías de GR con hematocrito del 2% en distintos medios de suspensión, obtenidas por medio de la técnica de microscopía con el Microscopio Óptico Biológico Boeco (BM-117) con cámara Arcano de  $5Mp$  incorporada y utilizando un objetivo  $\times 40$ . De estas imágenes se puede ver un incremento en el tamaño de los *rouleaux*, evidenciando un aumento en la agregación eritrocitaria con la concentración de dextrán. En base a esta relación, se utilizó la concentración de dextrán como parámetro para la representación de la agregación de GR en las técnicas TL y BSL.

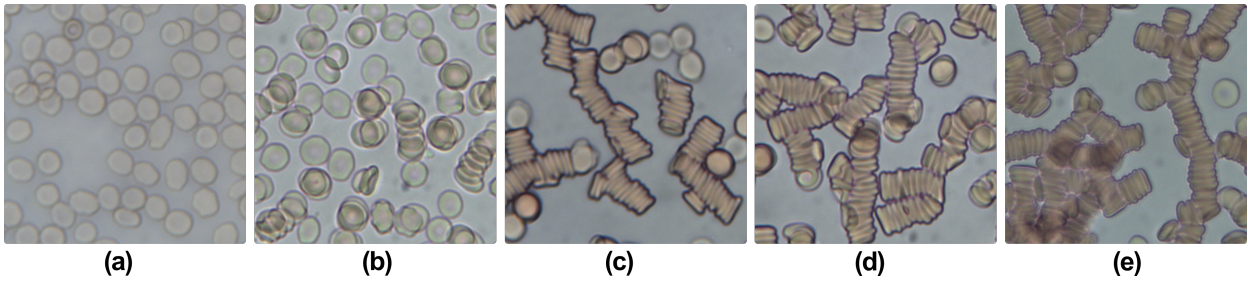


Figura 3.1: Fotografías de GR con un hematocrito del 2% en distintos medios de suspensión: (a) sin dextrán, (b) dextrán al  $0,2 \frac{g}{dl}$ , (c) dextrán al  $0,4 \frac{g}{dl}$ , (d) dextrán al  $0,8 \frac{g}{dl}$  y (e) dextrán al  $1,2 \frac{g}{dl}$ .

### 3.1. Técnica de transmisión de luz

En esta sección se estudia la variación de la intensidad lumínica registrada en función del tiempo de exposición para la muestra de control y con concentraciones de dextrán al  $0,4 \frac{g}{dl}$ ,  $0,8 \frac{g}{dl}$  y  $1,2 \frac{g}{dl}$ . La Fig. 3.2 muestra los silectogramas correspondientes a cada muestra y sus respectivas aproximaciones por medio de la Ec. 2.7, para un tiempo de agregación de 400s.

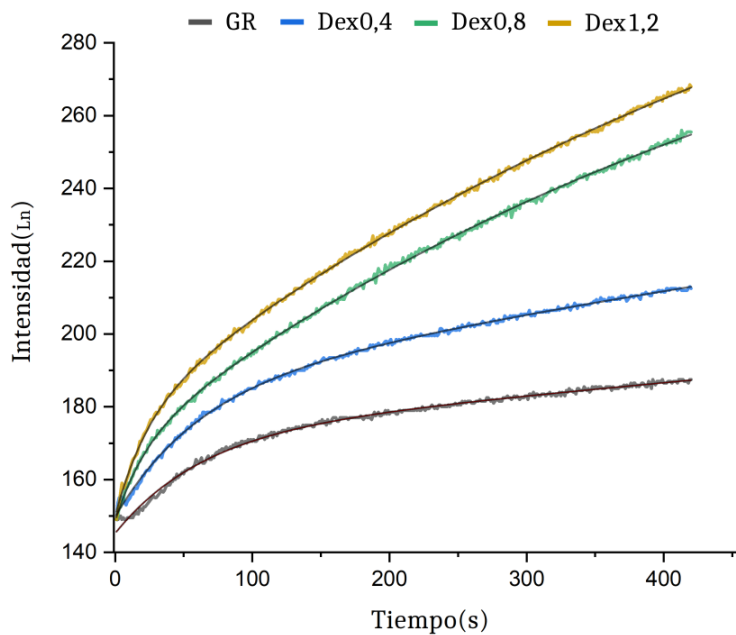


Figura 3.2: Selectograma para muestras suspendidas en diferentes concentraciones de dextrán para un tiempo de agregación de 400s.

Se calcularon los parámetros  $T_f$ ,  $T_s$  y  $t_{\frac{1}{2}}$  para un tiempo de 400s, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 3.1. En la misma se observa un decrecimiento de  $T_f$ , que representa un aumento en la velocidad de formación de agregados con respecto al aumento

en la concentración de dextrán. Para  $T_s$ , que representa la formación de agregados tridimensionales, se observa para la muestra de control un valor muy grande en comparación con el resto de las muestras, lo que podría considerarse como un tiempo infinito para la formación de los mismos. Por último, se observa una tendencia creciente del parámetro  $t_{\frac{1}{2}}$ , lo cual indica una disminución en la velocidad de formación de agregados respecto al tiempo de 400s.

**Tabla 3.1:** Índices de agregación calculados mediante la técnica de TL.

Muestras	$T_f$	$T_s$	$t_{\frac{1}{2}}$
GR	63,4±1,3	10013500*	166± 1
Dex0,4	60±2	1600±800	181± 2
Dex0,8	21,6±0,8	550±10	200±1
Dex1,2	23,4±0,6	610±15	207± 1

Adicionalmente, se calcularon los parámetros  $Amp_{60}$ ,  $Amp_{120}$  y  $Amp_{400}$ , que se presentan en la Tabla 3.2. Es importante aclarar que  $Amp_{60}$  y  $Amp_{120}$  se determinaron utilizando la misma medición, pero considerando tiempos de agregación de 60s y 120s respectivamente. Globalmente, se observa un crecimiento de los valores de estos parámetros con respecto a la concentración de dextrán. En particular,  $Amp_{60}$  y  $Amp_{120}$  tienen un crecimiento aproximadamente lineal. Por otro lado, para el parámetro  $Amp_{400}$  no se aprecia el mismo comportamiento. Esto se debe a una desaceleración en la formación de nuevos agregados.

**Tabla 3.2:** Índices de agregación calculados para las diferentes concentraciones de dextrán.

Muestras	$Amp_{60}$	$Amp_{120}$	$Amp_{400}$
GR	18,9±0,3	27,6±0,2	41±0,1
Dex0,4	26±8	39± 9	62± 5
Dex0,8	35± 2	51± 2	103± 2
Dex1,2	42±3	59± 3	115± 3

Además, la diferencia entre  $Amp_{60}$  y  $Amp_{400}$  ( $\Delta Amp_{400-60}$ ) aumenta a medida que se

\*El error obtenido para este valor es despreciable en comparación con el valor obtenido.

incrementa la concentración de dextrán, esto se puede ver más claramente en la Tabla 3.3. También, al comparar la diferencia entre  $\text{Amp}_{60}$  y  $\text{Amp}_{120}$  ( $\Delta\text{Amp}_{120-60}$ ) con la diferencia entre  $\text{Amp}_{120}$  y  $\text{Amp}_{400}$  ( $\Delta\text{Amp}_{400-120}$ ) se observa que la mayor variación en el parámetro Amp se da entre los tiempos de 120s hasta el de 400s. Adicionalmente, para las concentraciones de dextrán al  $0,8 \frac{g}{dl}$  y al  $1,2 \frac{g}{dl}$  las diferencias del parámetro Amp se mantienen muy similares, lo cual puede asociarse al acercamiento de la concentración de saturación de dextrán para la formación de agregados mencionado en la Sec. 1.2.4.

**Tabla 3.3:** Índices de agregación calculados para las diferentes concentraciones de dextrán.

Muestras	$\Delta\text{Amp}_{120-60}$	$\Delta\text{Amp}_{400-120}$	$\Delta\text{Amp}_{400-60}$
GR	9	14	23
Dex0,4	12	23	35
Dex0,8	16	52	68
Dex1,2	17	56	73

Por otro lado, los valores obtenidos para el parámetro  $M_{index}$  se presentan en la Tabla 3.4. En dicha tabla,  $M_{index}^{60}$  y  $M_{index}^{120}$  se pueden considerar constantes, mientras que no ocurre lo mismo para  $M_{index}^{400}$ , para el cual se observa un crecimiento con respecto a la concentración de dextrán. Este comportamiento se puede comparar con lo observado para el parámetro Amp, para este último se puede apreciar un comportamiento creciente lineal para los tiempos de 60s y 120s. Mientras que para 400s se observaba un comportamiento distinto. Esto se debe a que ambos parámetros indican de distintas maneras el grado de acumulación de GR agregados.

**Tabla 3.4:** Índices de agregación calculados para las diferentes concentraciones de dextrán.

Muestras	$M_{index}^{60}$	$M_{index}^{120}$	$M_{index}^{400}$
GR	9300±700	19000±1300	70000±2000
Dex0,4	9800±700	20800± 1300	77000± 4200
Dex0,8	10200± 300	21700± 600	86000± 2000
Dex1,2	10500±400	22600± 800	90000± 2500

**Tabla 3.5:** Índices de agregación calculados para las diferentes concentraciones de dextrán.

Muestras	$\Delta M_{index}^{120-60}$	$\Delta M_{index}^{400-120}$	$\Delta M_{index}^{400-60}$
GR	10100	50500	60600
Dex0,4	11000	56500	67500
Dex0,8	11500	64000	75500
Dex1,2	12000	67000	79000

## 3.2. Técnica Biospeckle láser

### 3.2.1. Intensidad Media

Se presenta en la Fig 3.3 la evolución de  $\langle I \rangle$  con respecto al tiempo para las concentraciones de dextrán al  $0, 2\frac{g}{dl}, 0, 4\frac{g}{dl}, 0, 8\frac{g}{dl}, 1, 2\frac{g}{dl}$  y una muestra de GR. Dado que las curvas en esta figura tienen un comportamiento "similar" a los silectogramas mostrados en la Fig.3.2, también se las aproximaron por medio de la Ec. 2.7, y se calcularon los parámetros  $t_{\frac{1}{2}}$  y  $M_{index}^{\dagger}$ , mencionados en la Sec. 2.3.1, para poder compararlos luego con los calculados mediante la técnica TL. La Tabla 3.6 muestra los valores obtenidos, en la cual se puede observar una tendencia decreciente del parámetro  $T_f^{bsl}$  con respecto al aumento en la concentración de dextrán. Por otro lado, para el parámetro  $T_s^{bsl}$  se observa un incremento respecto al aumento de dextrán. También se ve un aumento en los parámetros  $t_{\frac{1}{2}}^{bsl}$  y  $M_{index}^{bsl}$  con respecto a la concentración del dextrán.

**Tabla 3.6:** Índices de agregación calculados para la muestra de GR control y las distintas concentraciones de dextrán.

Muestras	$T_f^{bsl}$ (s)	$T_s^{bsl}$ (s)	$M_{index}^{bsl}$ 240 s	$t_{\frac{1}{2}}^{bsl}$ (s)
GR	630±50	630±50	285000±4000	18,4±0,1
Dex0,2	600±140	600±150	297000±7000	19,1±0,2
Dex0,4	114±9	1590±90	302000±3000	19,3±0,1
Dex0,8	130±17	1400±100	308000±4000	20,2 ±0,3
Dex1,2	80±17	2400±300	311000±3000	20,1±0,2

<sup>†</sup>Se eligieron estos parámetros debido a que en la técnica de transmisión de luz,  $t_{\frac{1}{2}}$  es la constante temporal característica que indica el nivel medio de agregación y  $M_{index}$  indica el grado de acumulación de agregados.

Para los parámetros:  $T_f^{bsl}$ ,  $t_{\frac{1}{2}}^{bsl}$  y  $M_{index}^{bsl}$  se observan comportamientos similares a los obtenidos para la técnica TL, por lo que se puede asociar el  $T_f^{bsl}$  a la formación rápida de *rouleux*, el  $t_{\frac{1}{2}}^{bsl}$  como una constante temporal característica que indica el grado medio de agregación y  $M_{index}^{bsl}$  al nivel de acumulación de agregados.

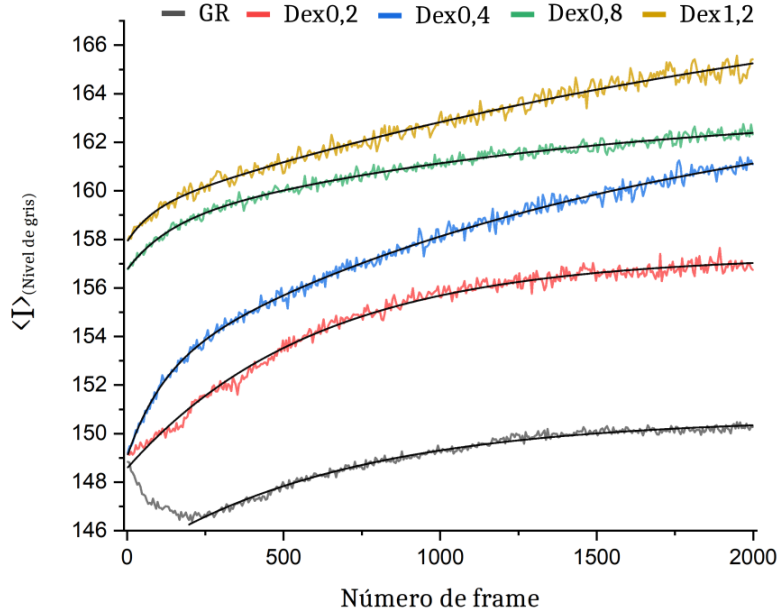


Figura 3.3: Evolución temporal de la  $\langle I \rangle$  para distintas concentraciones de dextrán.

### 3.2.2. Coeficiente de Correlación

El coeficiente de correlación se calculó de dos maneras distintas: en una primera instancia se tomó un frame de referencia fijo y se computó el  $CC$  con los 12 frames siguientes, y así observar la evolución temporal del mismo. Se eligió la cantidad de 12 frames debido al rápido decaimiento del  $CC$ , como se observa en la Fig. 3.4. En segunda instancia, se calculó el  $CC$  entre 2 imágenes sucesivas, obteniendo así su evolución temporal. A este último método lo llamaremos Frame to Frame, al cual notaremos como  $CC_{FTF}$ .

#### Con un frame de referencia.

En esta subsección se presenta la variación temporal del  $CC$  para las distintas concentraciones anteriormente mencionadas, tomando como frames de referencia a los tiempos:  $0s$ ,  $60s$ ,  $120s$ ,  $240s$ .

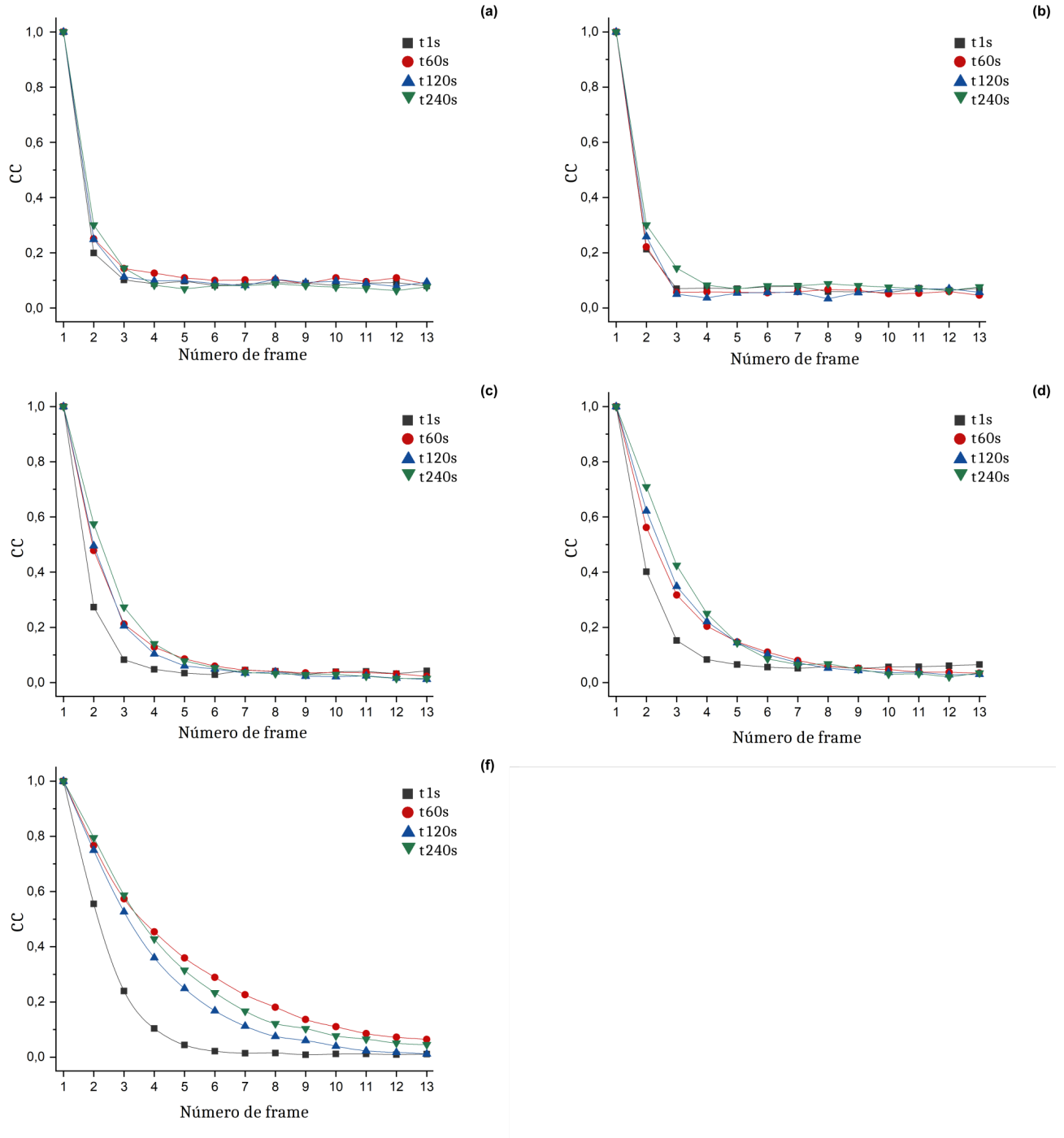


Figura 3.4:  $CC$  para las muestras de GR suspendidas: (a) en MS, (b) en dextrán al  $0,2\frac{g}{dl}$ , (c) en dextrán al  $0,4\frac{g}{dl}$ , (d) en dextrán al  $0,8\frac{g}{dl}$  y (e) en dextrán al  $1,2\frac{g}{dl}$ .

Como se observa en la Fig. 3.4, los  $CC$  presentan un decrecimiento exponencial, y a medida que se incrementa la concentración de dextrán aumenta la correlación con respecto a los frames consecutivos, lo que indica que hay una mayor correlación entre las distribuciones de speckle obtenidas. Para hacer más visible este fenómeno, se calcularon

las pendientes iniciales, aplicando el logaritmo natural a los  $CC$  calculados. A modo de ejemplo, la Fig. 3.5(a) muestra las rectas calculadas para las distintas concentraciones de dextrán, tomando como frame de referencia a  $t_{120s}$ . A las pendientes de dichas rectas, que llamaremos "pendientes de correlación"  $m_{CC}$ , se las pueden observar en la Fig. 3.5(b), en la cual se puede ver una tendencia creciente del  $m_{CC}$  con respecto al incremento de la concentración de dextrán. Este crecimiento está asociado al aumento del tamaño en los agregados formados, lo cual genera una disminución en su velocidad de movimiento browniano, que a su vez reduce el número de GR disponibles para formar nuevos agregados.

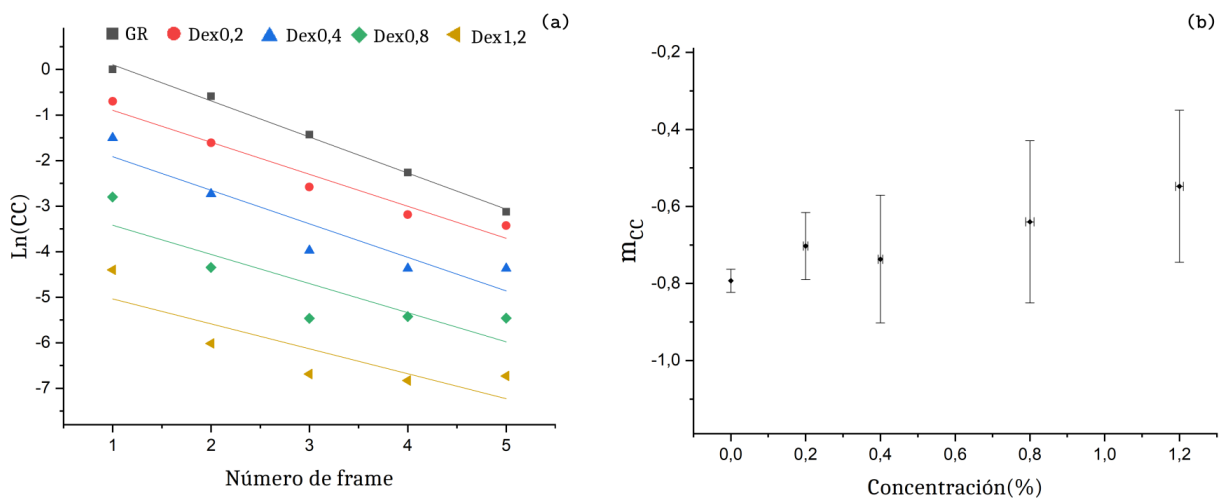


Figura 3.5: (a) Rectas calculadas para las distintas concentraciones de dextrán, tomando como frame de referencia a  $t_{120s}$ , (b) sus correspondiente pendientes  $m_{CC}$ .

### Frame to Frame

Debido al rápido decaimiento del valor de  $CC$  con respecto a los frames consecutivos, se calculó el  $CC_{FTF}$  para aportar nueva información acerca de la evolución temporal de los GR respecto al incremento de dextrán. En la Fig. 3.6 se presenta la evolución por frame del  $CC_{FTF}$  para las distintas concentraciones de dextrán, donde se observa un incremento en los valores iniciales de las curvas respecto al aumento de la concentración. Este incremento se debe a la presencia de agregados, y al aumento en su tamaño cuando se incrementa la concentración de dextrán.

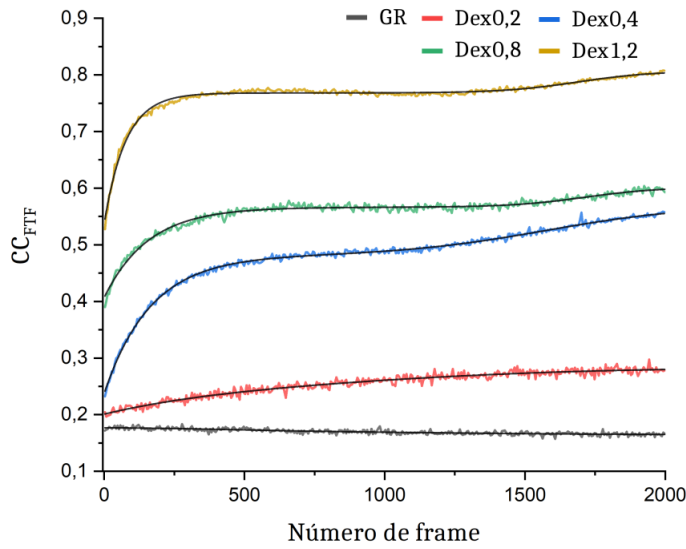


Figura 3.6:  $CC_{FTF}$  para las muestras de GR suspendidas y para las concentraciones de dextrán  $0,2\frac{g}{dl}$ ,  $0,4\frac{g}{dl}$ ,  $0,8\frac{g}{dl}$  y  $1,2\frac{g}{dl}$ .

Además, a partir de las concentraciones dextrán al  $0,4\frac{g}{dl}$  se pueden ver en las curvas dos distintas tendencias de crecimiento del  $CC_{FTF}$ . Para poder analizar este comportamiento se aproximó la curva por la función *BiDoseResp* [OriginLab], la cual nos permite asociar a los valores de  $h_1$  y  $h_2$  a los distintos crecimientos que se observan, debido a que son proporcionales a las pendientes de crecimiento, en los puntos donde cambia la concavidad de la curva, esto se ejemplifica en la Fig. 3.7.

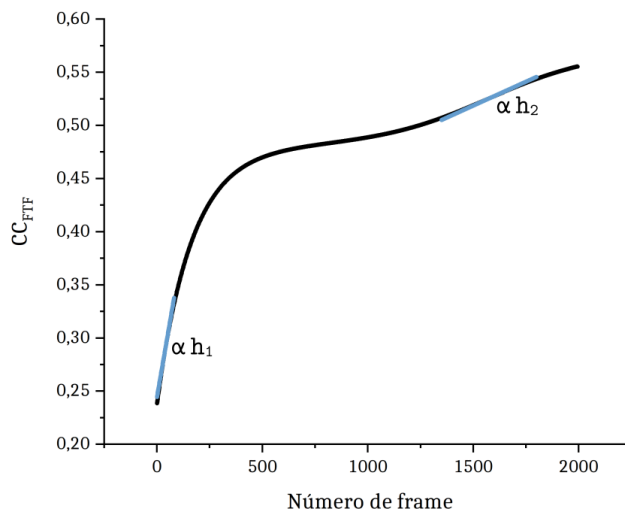


Figura 3.7:  $CC_{FTF}$  para las muestra de dextrán al  $0,4\frac{g}{dl}$ .

En la Tabla 3.7 se pueden ver los valores iniciales de  $CC_{FTF}$ , y las constantes  $h_1$  y  $h_2$  para las distintas muestras. Se puede observar la tendencia creciente de los valores de  $h_1$  y  $h_2$ . El crecimiento de  $h_1$  se debe al aumento del tamaño de los agregados, disminuyendo así su velocidad de movimientos brownianos, y el estancamiento en el incremento de  $h_2$  se debe al cese de la formación de nuevos agregados, lo que explica la variación en la concavidad de las curvas de  $CC_{FTF}$ , ya que para la concentración de dextrán al  $0,2 \frac{g}{dl}$  y la muestra de control no se presenta.

**Tabla 3.7:** Índices de agregación calculados para cada muestra de GR control y para concentraciones de dextrán:  $0,2 \frac{g}{dl}$ ,  $0,4 \frac{g}{dl}$ ,  $0,8 \frac{g}{dl}$  y  $1,2 \frac{g}{dl}$ .

Muestras	$CC_{FTF}^{inicial}$	$h_1$	$h_2$
GR	0,17165	$-0,002 \pm 0,003$	$-0,001 \pm 0,004$
Dex0,2	0,20435	$0,001 \pm 0,007$	$0,001 \pm 0,002$
Dex0,4	0,23209	$0,0026 \pm 0,0001$	$0,0017 \pm 0,0001$
Dex0,8	0,38998	$0,0028 \pm 0,0002$	$0,0032 \pm 0,0005$
Dex1,2	0,52742	$0,0056 \pm 0,0002$	$0,0032 \pm 0,0003$

### 3.2.3. Momento de Inercia

El  $IM$  se calculó para las concentraciones anteriormente mencionadas utilizando distintas cantidades de píxeles aleatoriamente seleccionados, como se explicó en la Sec. 2.2.2, iniciando con 500 píxeles hasta 10.000 píxeles, con pasos de a 500 píxeles.

En la Fig. 3.8 se puede observar una tendencia decreciente del valor de  $IM$  con respecto al aumento de la concentración de dextrán. Esta tendencia, como se mencionó en la Sec. 2.2.2, se atribuye al movimiento browniano de las células aisladas, al proceso de sedimentación, y a la formación de agregados. Lo cual coincide con los resultados encontrados para  $CC$ ,  $m_{CC}$  y  $CC_{FTF}$ .

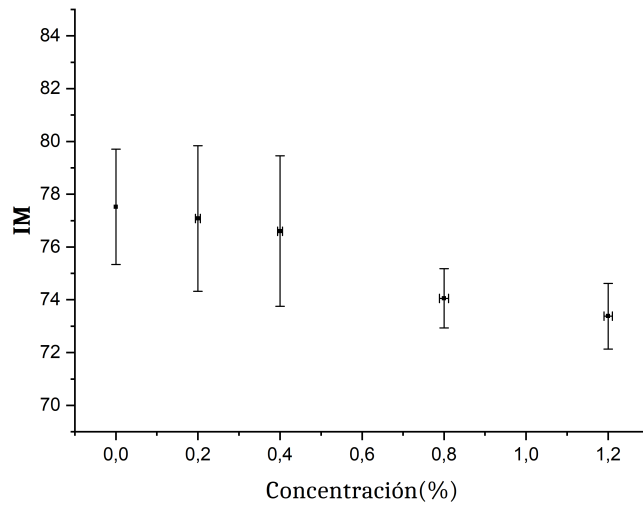


Figura 3.8:  $IM$  para las muestras de GR para las distintas concentraciones de dextrán.

### 3.2.4. Tamaño de grano de speckle

En esta subsección se presentan los resultados obtenidos del cálculo del tamaño del grano de speckle  $d_{sp}$  para las distintas concentraciones de dextrán. Debido a la rápida variación de  $d_{sp}$  respecto a 2 frames consecutivos, para analizar su evolución temporal se empleó la función *csaps* de *Matlab*, la cual filtra el ruido de las mediciones, un ejemplo de esto se puede observar en la Fig. 3.9.

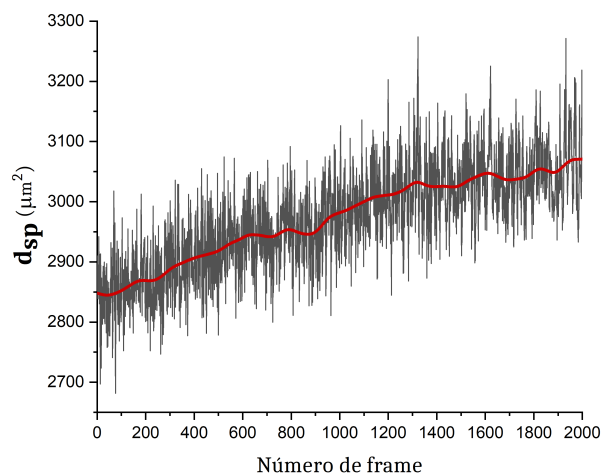


Figura 3.9: Ejemplo de la evolución temporal de  $d_{sp}$  para una muestra con dextrán al  $0,4 \frac{g}{dl}$  (gris) y ajuste por medio de la función *csaps* de *Matlab* (rojo).

A los valores de  $d_{sp}$  obtenidos luego del filtrado se los aproximó con una función lineal. La Fig. 3.10 muestra la evolución de  $d_{sp}$  para cada muestra y su respectiva aproximación lineal, cuyas pendientes se encuentran en la Tabla 3.8. Para la curva correspondiente a la muestra de control se observa una pendiente negativa, pero en nuestro caso se la puede considerar nula. Por otro lado, para las curvas correspondiente al resto de las muestras se observa que sus pendientes son positivas, lo cual puede atribuirse al aumento del tamaño de las partículas dispersoras a medida que crece el número de frames, es decir a la formación de agregados de mayor tamaño disminuyendo así el número de elementos dispersores.

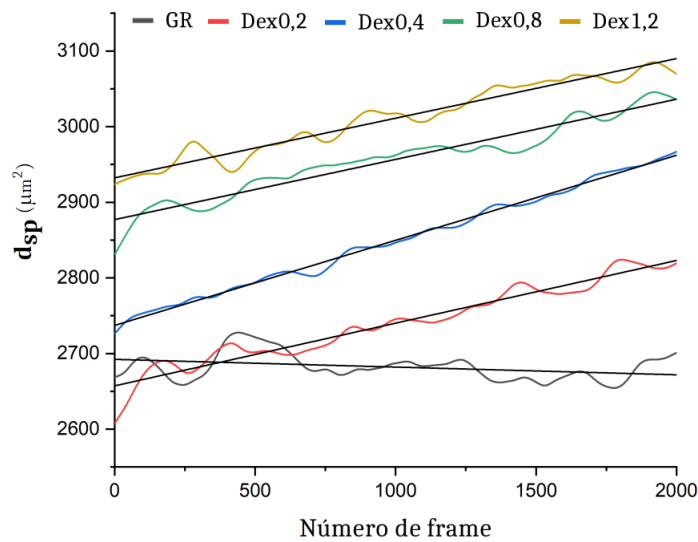


Figura 3.10: Evolución temporal de  $d_{sp}$  para muestras con y sin dextrán, y sus correspondientes ajustes. Para graficar los valores de dextrán al  $1,2 \frac{g}{dl}$  se sumó una constante para apreciar la diferencia con los valores de dextrán al  $0,8 \frac{g}{dl}$ .

**Tabla 3.8:** Índices de agregación calculados para cada muestra de GR control, concentraciones de dextrán a  $0,2 \frac{g}{dl}$ ,  $0,4 \frac{g}{dl}$ ,  $0,8 \frac{g}{dl}$  y  $1,2 \frac{g}{dl}$ .

Muestras	Pendiente de la aproximación lineal ( $\frac{\mu m^2}{frame}$ )
GR	$-0,0102 \pm 0,0006$
Dex0,2	$0,0829 \pm 0,0004$
Dex0,4	$0,1125 \pm 0,0002$
Dex0,8	$0,0796 \pm 0,0005$
Dex1,2	$0,0788 \pm 0,0004$

# Capítulo 4

## Discusiones y conclusiones

### 4.1. Discusiones

En el capítulo anterior se presentaron los resultados de las técnicas BSL y TL, con un breve análisis de los mismos. A continuación, se comparan los resultados obtenidos mediante el método TL con los calculados para la Intensidad Media  $\langle I \rangle$  empleando la técnica BSL. En este caso, se determinó que los parámetros  $T_f$  y  $T_f^{bsl}$  disminuyen sus valores con respecto al incremento de dextrán, lo cual está asociado a la formación de los primeros *rouleaux*. Además, esta disminución coincide con el aumento del  $m_{CC}$ , el incremento de los valores iniciales de  $CC_{FTF}$ , y el aumento en su parámetro  $h_1$  respecto a un aumento en la concentración de dextrán. Este hecho se asocia al crecimiento de la velocidad de formación de nuevos agregados, lo que implica que aumenta el tamaño de los dispersores, con la consecuente disminución de su velocidad browniana. El aumento del tamaño de los agregados junto con la disminución de la cantidad de GR dispersos genera un decrecimiento en la dinámica del fenómeno de agregación eritrocitaria.

Por otro lado, para el tiempo característico  $T_s$  se observa un decrecimiento de su valor hasta llegar a valores similares para las concentraciones de dextrán  $0,8 \frac{dl}{g}$  y  $1,2 \frac{dl}{g}$ . A este comportamiento se lo puede comparar con el comportamiento del parámetro  $h_2$  calculado para el  $CC_{FTF}$ , el cual en vez de disminuir aumenta con respecto al incremento de dextrán y se mantiene constante para las mismas concentraciones. Podemos asociar este comportamiento del parámetro  $h_2$  con la agregación tridimensional lenta, ya que en la

Fig. 3.6 para la concentración de dextrán  $0,2\frac{dl}{g}$ ,  $h_2$  es casi nulo, y no se observa un cambio en la concavidad. Esto es de esperarse debido a que la concentración de dextrán es muy baja para la formación de agregados tridimensionales y para la muestra de GR, cuyo  $h_2$  es negativo y casi nulo, observándose un decrecimiento del  $CC_{FTF}$ . Por otra parte, para las concentraciones restantes, la formación rápida de *rouleax* se mantiene predominante hasta aproximadamente el frame 1100, donde se observa este cambio en la concavidad que se asocia a la agregación tridimensional.

El aumento del parámetro  $t_{\frac{1}{2}}$  indica una disminución en la velocidad de formación de nuevos agregados, encontrándose un comportamiento similar para el  $T_{\frac{1}{2}}^{bsl}$  y el incremento del parámetro  $h_2$  calculado para el  $CC_{FTF}$ . Particularmente, para las concentraciones de dextrán  $0,8\frac{dl}{g}$  y  $1,2\frac{dl}{g}$ , se observa una disminución en el crecimiento del parámetro  $t_{\frac{1}{2}}$ .

Para los valores del  $M_{index}$ , asociado al grado de acumulación de agregados, se observa un aumento a medida que se incrementa la concentración de dextrán. Paralelamente se observa para el  $M_{index}^{400}$  una desaceleración en el crecimiento las concentraciones de dextrán  $0,8\frac{dl}{g}$  y  $1,2\frac{dl}{g}$ , obteniéndose una relación similar para el  $M_{index}^{bsl}$ . Este hecho puede asociarse a la disminución de GR disponibles para formar nuevos agregados, y a que el número de enlaces formados por la moléculas de dextrán podría acercarse al límite posible para estas concentraciones. Para el parámetro  $\Delta Amp$ , se observan resultados similares a los obtenidos para  $M_{index}$ , con la diferencia que este parámetro pone de manifiesto la disminución en el crecimiento de los  $\Delta Amp$  para las concentraciones de dextrán  $0,8\frac{dl}{g}$  y  $1,2\frac{dl}{g}$ , para los tiempos  $60s$ ,  $120s$  y  $400s$ .

También, se observa que para la técnica de BSL, hay consistencia en los resultados obtenidos para los coeficientes relacionados a la dinámica de variación del speckle obtenido, es decir  $m_{CC}$ ,  $CC_{FTF}$  y  $IM$ .

## 4.2. Conclusiones

En el desarrollo de esta tesina se estudió la técnica de BSL como una herramienta de análisis de la dinámica eritrocitaria. Con este objetivo se abordó el aprendizaje de los distintos modelos de agregación de GR, y los fenómenos que intervienen en la misma. También, se interiorizó en la manipulación de material biológico, sus cuidados, y los protocolos de bioseguridad para el empleo de la sangre humana.

Para la evaluación de los resultados de la técnica de BSL, se utilizó la ampliamente conocida técnica TL y se incursionó en la interpretación de sus parámetros en la dinámica eritrocitaria. Se estudiaron parámetros como la Amp que indica la medida de agregados para sus tiempos correspondientes, el  $M_{index}$  que nos permite obtener el grado de acumulación de agregados, y el  $t_{\frac{1}{2}}$  que brinda una medida característica del tiempo transcurrido para lograr la agregación acumulada.

Para la aplicación de la técnica BSL, se utilizaron parámetros como la Intensidad Media  $\langle I \rangle$ , el Coeficiente de Correlación  $CC$ , el Momento de Inercia  $IM$ , y el tamaño de grano  $d_{sp}$ . Para esto se aprendió el tratamiento y procesamiento de las imágenes obtenidas de speckle en MatLab, y la manipulación del software, para reducir el empleo de recursos computacionales.

Del empleo de esta técnica, se propone para  $\langle I \rangle$  el empleo de los parámetros  $M_{index}$  y  $t_{\frac{1}{2}}$  para la caracterización de la agregación eritrocitaria, debido a que sus resultados son similares a los obtenidos empleando la técnica TL. Para  $CC$ , se propone el calculo de frames consecutivos  $CC_{FTF}$  debido a la información que nos pueden brindar sus parámetros,  $h_1$  se puede asociar a la velocidad de agregación y  $h_2$  puede ser asociado a la formación de agregados de mayor tamaño.

En conclusión, se han podido cumplir los objetivos planteados en el marco de esta tesina, pudiendo abordar el aprendizaje de las técnicas ópticas BSL y TL para la caracterización de la dinámica de la agregación eritrocitaria. Particularmente, se observa que la técnica BSL es adecuada para esta caracterización. Debido a su alta sensibilidad permite la obtención de nuevos parámetros que brindan información para realizar un aná-

lisis cualitativo más detallado con respecto a la dinámica de los procesos de agregación eritrocitaria, pudiendo llegar a relacionar cualitativamente los parámetros de Intensidad Media  $\langle I \rangle$ ,  $CC$ ,  $CC_{FTF}$  y  $IM$  a la formación de nuevos agregados y la distinción de la agregabilidad de las muestras.

# Apéndice A

## Complemento de la estadística de la distribución de speckle

### Estadística de primer orden

La intensidad en un punto del espacio está determinada por la suma coherente de las ondas elementales emitidas por la superficie dispersora. De esta manera, en un dado punto  $P$  de observación el campo complejo  $E$  en este punto está determinado por [Goodman, 1975; Kreis, 1996]:

$$E(P) = \sum_n \frac{E'_{0n}}{r_n} \exp [i(kr_n + \psi'_n)] , \quad (\text{A.1})$$

siendo  $E'_{0n}$  la amplitud de cada onda elemental,  $r_n$  la distancia desde el punto de emisión de ondas elementales al punto de observación, y  $\psi'_n$  la fase inicial de la onda elemental. Si se representa a cada onda en el plano complejo con un fasor el campo resultante está dado por el fasor suma. Esta suma es análoga a la resolución del problema de paseo aleatorio en dos dimensiones de la teoría de probabilidad, como se ve en la Fig. A.1.

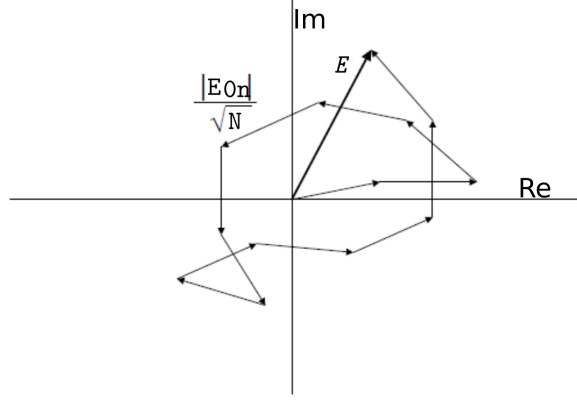


Figura A.1: Paseo aleatorio en el plano complejo.

Al tomar un punto de observación lo suficientemente alejado para asumir que estamos sumando fasores de módulos similares pero con distintas fases, el campo de cada onda elemental  $E_n$  está descrito por:

$$E_n = \frac{1}{\sqrt{N}} |E'_{0n}| \exp [i\psi'_n] , \quad (\text{A.2})$$

asumiendo que la amplitud y fase de cada componente elemental del campo son estadísticamente independientes entre sí y que no tienen dependencia con los demás componentes elementales del campo. Además se asume que la fase tiene una distribución uniforme en  $[\pi, -\pi]$ , lo que significa que la superficie es rugosa en comparación con la longitud de onda. Considerando la hipótesis adicional de que el número total de centros de dispersión  $N$  es muy grande, asegurando así la validez del teorema del límite central, Goodman ha demostrado que las partes reales e imaginarias del campo resultante son asintóticamente gaussianas [Goodman, 1976]. Por lo que la función de densidad de probabilidad  $\varrho_{\Re, \Im}$  resulta:

$$\varrho_{\Re, \Im}(E_{\Re}, E_{\Im}) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp \left[ -\frac{E_{\Re}^2 + E_{\Im}^2}{2\sigma^2} \right] , \quad (\text{A.3})$$

donde  $E_{\Re}$  y  $E_{\Im}$  son las componentes real e imaginaria del campo  $E$  respectivamente y la varianza  $\sigma^2$  se define como:

$$\sigma^2 = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} \langle |E'_{0n}|^2 \rangle . \quad (\text{A.4})$$

Teniendo en cuenta la Ec.A.3, y que la intensidad lumínica  $I$  y la fase  $\psi$  del campo resultante se correlacionan con las partes reales e imaginarias de la siguiente manera

$$\begin{aligned} E_{\Re} &= \sqrt{I} \cos(\psi), \\ E_{\Im} &= \sqrt{I} \sen(\psi). \end{aligned} \tag{A.5}$$

Las funciones de probabilidad de la intensidad  $\varrho_I$  y de la fase  $\varrho_\psi$  resultan:

$$\varrho_I(I) = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma^2} \exp\left[-\frac{I}{2\sigma^2}\right] & \text{si } I > 0 \\ 0 & \text{en cualquier otro caso,} \end{cases} \tag{A.6}$$

$$\varrho_\psi(\psi) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi} & \text{si } \psi \in [-\pi, \pi] \\ 0 & \text{en cualquier otro caso.} \end{cases}$$

Consecuentemente, la distribución de speckle obedece a una ley de probabilidad exponencial negativa mientras que su fase tiene una distribución uniforme.

El momento n-ésimo de la intensidad es :

$$\langle I^n \rangle = n!(2\sigma^2)^n = n! \langle I \rangle^n, \tag{A.7}$$

de donde se puede deducir que  $\langle I \rangle = 2\sigma^2$ . Luego se pueden reformular las distribuciones marginales como:

$$\begin{aligned} \varrho_I(I) &= \frac{1}{\langle I \rangle} \exp\left[-\frac{I}{\langle I \rangle}\right] & \text{si } I > 0, \\ \varrho_\psi(\psi) &= \frac{1}{2\pi} & \text{si } \psi \in [-\pi, \pi]. \end{aligned} \tag{A.8}$$

La función densidad de probabilidad acumulada  $\Theta(I)$  indica la probabilidad de hallar un valor de intensidad mayor que  $I$ , la cual resulta:

$$\Theta(I) = \int_I^\infty \varrho_I(I') dI' = \exp\left[-\frac{I}{\langle I \rangle}\right]. \tag{A.9}$$

La desviación estándar de la intensidad  $\sigma_I$  resulta:

$$\sigma_I = \sqrt{\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle} = \sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2} = \langle I \rangle . \quad (\text{A.10})$$

Definiendo el contraste  $\nu$  como [Goodman, 1975]:

$$\nu = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} , \quad (\text{A.11})$$

se observa que el contraste para un speckle completamente desarrollado siempre es uno.

### Estadística de segundo orden

El desarrollo estadístico anterior no permite deducir las propiedades relativas a las relaciones entre puntos vecinos. Para esto es necesario calcular las densidades de probabilidad conjuntas entre dos puntos diferentes.

La función de autocorrelación  $R_I$  de la intensidad  $I(x, y)$  se define [Lehmann, 2001]:

$$R_I(x, y, x + \Delta x, y + \Delta y) = \langle I(x, y)I(x + \Delta x, y + \Delta y) \rangle . \quad (\text{A.12})$$

Si se toma un par de puntos  $P_1$  y  $P_2$  que sean idénticos, esto significa  $\Delta x = 0$ ,  $\Delta y = 0$  y usando la Ec.A.7, obtenemos:

$$R_I(x, y, x, y) = \langle I(x, y)^2 \rangle = 2 \langle I(x, y) \rangle . \quad (\text{A.13})$$

Entonces, la distancia entre dos puntos que minimice a  $R_I$ , indicará el tamaño promedio del grano de speckle, ya que ambos puntos tendrán intensidades y fases independientes.

Empleando la expresión de la autocorrelación del campo complejo  $E$ , es posible obtener la siguiente expresión para  $R_I$  [Goodman, 1975; Lehmann, 2001]:

$$R_I(x, y, x, y) = \langle I \rangle^2 [1 + |\mu_A(\Delta x, \Delta y, z)|^2] , \quad (\text{A.14})$$

siendo  $z$  la distancia desde la superficie dispersora al plano de observación y  $\mu_A$  el *factor*

de coherencia complejo que depende de la forma de la distribución de intensidades sobre el área dispersora.

Considerando el caso de speckle objetivo formado por un área  $\ell_0 \times \ell_0$  iluminada uniformemente,  $R_I$  resulta [Goodman, 1975; Kreis, 1996]:

$$R_I(x, y, x, y) = \langle I \rangle^2 \left[ 1 + \text{sinc}^2 \left( \frac{\ell_0 \Delta x}{\lambda z} \right) \text{sinc}^2 \left( \frac{\ell_0 \Delta y}{\lambda z} \right) \right], \quad (\text{A.15})$$

con  $\text{sinc}(m) = \frac{\text{sen}(\pi m)}{\pi m}$ .

El tamaño de grano obtenido para el primer mínimo de  $R_I$  es:

$$d_{sp} = \Delta x_{sp} = \frac{\lambda z}{l_0}, \quad (\text{A.16})$$

que es igual al resultado obtenido en la Ec.1.6.



# Apéndice B

## Modelos de la agregación eritrocitaria

### B.1. Modelo de doble capa difusa y el potencial zeta

( $\zeta$ )

Como se mencionó en la Sec. 1.2.3, el modelo de doble capa se utiliza para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se forma en las proximidades de un GR debido a su carga negativa, y además se utiliza para explicar el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas. En este modelo se consideran dos capas iónicas separadas por una interfaz [Pollack et al., 1965], conocida como capa de Stern, según se muestra en la Fig. 1.7. Las hipótesis de partida para modelizar esta doble capa en cualquier modelo de complejidad creciente son:

- Asumir la mayor simetría posible del GR con el fin de facilitar un resultado cualitativo y cuantitativo.
- Considerar que el medio de suspensión es homogéneo e isotrópico desde el punto de vista eléctrico, cuya permitividad dieléctrica es  $\epsilon$ .
- Tener en cuenta sólo las contribuciones de las cargas libres (iones y electrones) al campo eléctrico, ignorando la contribución de dipolos moleculares.
- Considerar que los iones se distribuyen de manera homogénea en el medio no afectado por la capa difusa.

Los *rouleaux* se forman entre las caras de mayor diámetro. Al haber una relación entre el diámetro del GR y la distancia máxima de la doble capa del orden de 190 veces mayor, cuando los GR se agrupan para la agregación se lo puede considerar como el acercamiento de dos planos paralelos [Russel et al., 1992].

En consecuencia, para describir la capa rígida, se lo tratará como un capacitor plano de espesor  $d$ . Para este caso, resolviendo la ecuación de Laplace  $\nabla^2\phi = 0$  en la capa rígida y si se asume simetría cilíndrica para el potencial  $\phi$  se obtiene:

$$\phi(x) = \left( \phi_s + (\zeta - \phi_s) \frac{x}{d} \right), \quad (\text{B.1})$$

para  $0 < x \leq d$ , se elige el origen de coordenadas en la superficie del GR por conveniencia. El potencial en la superficie del GR es  $\phi_s$  [Glasstone, 1964].

Por otro lado, la resolución de la ecuación de Laplace en la capa difusa resulta  $\nabla^2\phi = \frac{\rho}{\epsilon}$ . La densidad de carga  $\rho$  está dada por la concentración de diferentes tipos de iones con carga  $Z_i F$ , donde  $F$  es la constante de Faraday ( $F = 96,485 \frac{C}{mol}$ ) y  $Z_i$  es la carga de un ion. Resultando, la densidad de carga:

$$\rho(x) = \sum Z_i F C_i(x), \quad (\text{B.2})$$

donde  $C_i(x)$  es la concentración neta de iones y contraiones. Dada la agitación térmica, se supone que la concentración relativa de cargas respecto a la parte del líquido no afectada por la doble capa difusa es una distribución de Boltzman:

$$\frac{C_i(x)}{C_i^0} = \exp \left[ -Z_i F \rho(x) \frac{1}{RT} \right]. \quad (\text{B.3})$$

Obteniendo así:

$$\nabla^2\phi = -\frac{F}{\epsilon} \sum Z_i F C_i^0 \exp \left[ -Z_i F \rho \frac{1}{RT} \right]. \quad (\text{B.4})$$

La Ec. B.4 es una ecuación diferencial generalmente resoluble en forma numérica, pero que presenta solución exacta para geometría plana. Luego,

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{F}{\epsilon} \sum Z_i F C_i^0 \exp \left[ -Z_i F \rho \frac{1}{RT} \right]. \quad (\text{B.5})$$

Al aplicar las condiciones de contorno,  $\phi(d) = \xi$  y  $\lim_{x \rightarrow \infty} \phi(x) = 0$ , y bajo la consideración de campo débil ( $ZF\phi \ll RT$ ), obtenemos:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{\phi(x)}{x_D}, \quad (\text{B.6})$$

donde  $x_D = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{2F^2 L}}$  es la distancia de Debye-Hückel y  $L = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 C_i$  es la fuerza iónica [Moelwyn-Hughes, 1961]. De esta forma, se obtiene una expresión para el potencial de la capa difusa:

$$\phi(x) = \zeta \exp\left[\frac{x-d}{x_D}\right], \quad (\text{B.7})$$

siendo el potencial  $\zeta$ :

$$\zeta = \frac{\sigma x_D}{\epsilon}. \quad (\text{B.8})$$

Entonces, la densidad superficial de cargas en el radio efectivo será:

$$\sigma = \left(\frac{d\phi}{dx}\right)_{x=d} = \frac{\epsilon \zeta}{x_D}. \quad (\text{B.9})$$

## B.2. Ecuaciones complementarias Depletion

### Dependencia de las variables con respecto a la concentración de masa de polímero

El término de la presión osmótica  $\Pi$  que se observa en la Ec. 1.12 se obtiene de la ecuación virial considerando hasta el segundo coeficiente  $B_2$ , tal que:

$$\Pi = \frac{RT}{M_2} c_2^b + B_2 (c_2^b)^2 = -\frac{\mu_1 - \mu_1^0}{\nu_1}, \quad (\text{B.10})$$

donde  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta,  $M_2$  es el peso molecular del polímero,  $c_2^b$  es la concentración de masa del polímero,  $\mu_1$  es el potencial químico del solvente en la solución del polímero,  $\mu_1^0$  es el potencial químico del solvente en solución libre y  $\nu_1$  es el volumen molecular del solvente.

Para superficies que no absorben a las cadenas de polímeros, el espesor de la capa de agotamiento  $\Lambda$ , que se observa en la Ec. 1.12 considerando el equilibrio entre la energía elástica libre y las fuerzas osmóticas, resulta:

$$\Lambda = -\frac{\Pi}{2D} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{\Pi}{D}\right)^2 + 4\Lambda_0^2}, \quad (\text{B.11})$$

donde  $\Lambda_0$  es el espesor de la capa de agotamiento para la concentración de polímero que fuga, que equivale a 1,4 veces el radio de giro del polímero según Vincent [Vincent, 1990],

teniendo en cuenta su capacidad de compresión cerca de las interfaces.  $D$  es función de la concentración de masa del polímero  $c_2^b$  y se expresa como:

$$D = \frac{2KT}{\Lambda_0^2} \left( \frac{c_2^b N_a}{M_2} \right)^{\frac{2}{3}}, \quad (\text{B.12})$$

en la cual  $K$  es la constante de Boltzmann y  $N_a$  es el número de Avogadro. Al aproximar la profundidad de penetración de manera exponencial, dependiendo de la concentración de masa del polímero, resulta:

$$p = \delta_{gl} \left( 1 - \exp \left[ \frac{c_2^b}{c_2^p} \right] \right), \quad (\text{B.13})$$

donde  $c_2^p$  es la constante de penetración del polímero en solución y  $\delta_{gl}$  se considera independiente de  $c_2^b$ . Al realizar esta simplificación no se tienen en cuenta influencias locales del glicocalix, ni efectos de la presión osmótica de la masa del polímero sobre las macromoléculas [Jones y Vincent, 1989; Vincent et al., 1986].

Para calcular la energía electrostática de interacción intercelular, se lo considera un proceso de carga isotérmico, obteniendo la energía electrostática libre de la siguiente forma:

$$E = \frac{1}{2} \int_0^d \int_0^\rho \psi(\rho, x) d\rho dx, \quad (\text{B.14})$$

donde  $\psi$  es el potencial electrostático entre células, que depende de la densidad de carga  $\rho$ . Al ser pequeña la longitud de Debye-Hückel, en comparación con el espesor del glicocalix  $\delta_{gl}$  y la distancia célula-célula  $d$ , se puede simplificar el problema aproximando el potencial electrostático entre células como una superposición de los correspondientes a células individuales. Con lo cual la energía electrostática de interacción resulta:

$$\omega_E = \text{DH} \begin{cases} \sinh\left(\frac{\delta_{gl}}{x_D}\right) \left( \exp\left[\frac{\delta_{gl}-d}{x_D}\right] - \exp\left[-\frac{\delta_{gl}}{x_D}\right] \right) & d \geq 2\delta_{gl} \\ \frac{2\delta_{gl}-d}{x_D} - \left( \exp\left[-\frac{\delta_{gl}}{x_D}\right] + 1 \right) \sinh\left(\frac{\delta_{gl}-d}{x_D}\right) - \sinh\left(\frac{\delta_{gl}}{x_D}\right) \exp\left[-\frac{d}{x_D}\right] & d < 2\delta_{gl}, \end{cases} \quad (\text{B.15})$$

con  $\text{DH} = \frac{\sigma^2 x_D^3}{\delta_{gl}^2 \epsilon \epsilon_0}$ , siendo  $\epsilon$  la permitividad eléctrica del solvente,  $\epsilon_0$  la permitividad eléctrica del vacío,  $\sigma$  la densidad de carga superficial y  $x_D$  la longitud de Debye-Hückel obtenida en la Sec. B.1.

# Bibliografía

- Ansari, M. Z. y Nirala, A. K. Biospeckle assessment of torn plant leaf tissue and automated computation of leaf vein density (lvd). *The European Physical Journal Applied Physics*, 70(2):21201–1–9, 2015. doi:10.1051/epjap/2015150013.
- Arizaga, R., Trivi, M., y Rabal, H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. *Optics & Laser Technology*, 31(2):163 – 169, 1999. doi:10.1016/S0030-3992(99)00033-X.
- Asakura, S. y Oosawa, F. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33(126):183–192, 1958. doi:10.1002/pol.1958.1203312618.
- Asakura, T. Dynamic properties of bio-speckles and their application to blood flow measurements. *Anritsu News*, 8:4–9, 1988.
- Baskurt, O. K. y Meiselman, H. J. Red blood cell aggregability. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 43:353–354, 2009.
- Berk, D. A. y Hochmuth, R. M. Lateral mobility of integral proteins in red blood cell tethers. *Biophysical Journal*, 61(1):9–18, 1992.
- Braga, R. A., González-Peña, R. J., Viana, D. C., y Rivera, F. P. Dynamic laser speckle analyzed considering inhomogeneities in the biological sample. *Journal of Biomedical Optics*, 22(4):1 – 10, 2017. doi:10.1117/1.JBO.22.4.045010.
- Briers, J. D. The statistics of fluctuating speckle patterns produced by a mixture of moving and stationary scatterers. *Optical and Quantum Electronics*, 10:364, 1978.

- Brinkman, R., Zijlstra, W. G., y Jansonius, N. J. Quantitative evaluation of the rate of rouleaux formation of erythrocytes by measuring light reflection ("syllectometry"). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C. Biological and medical sciences*, 66:236–248, 1966.
- Buxbaum, K., Evans, E., y Brooks, D. E. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. *Biochemistry*, 21(13):3235–3239, 1982. doi: 10.1021/bi00256a032.
- Cardoso, R. y Braga, R. Enhancement of the robustness on dynamic speckle laser numerical analysis. *Optics and Lasers in Engineering*, 63:19–24, 2014. doi: 10.1016/j.optlaseng.2014.06.004.
- Chien, S. y Sung, L. A. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 7:71–91, 1987.
- Cokelet, G. R. y Goldsmith, H. L. Decreased hydrodynamic resistance in the two phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. *Circulation Research*, 68:1–17, 1991.
- Dacie, J. V. y Lewis, M. Intervalos de referencia y valores normales. En *Hematología Practica*, pág. 11. Elsevier España, 2012.
- De Paepe, K., Lagarde, J., Gall, Y., y et al. Microrelief of the skin using a light transmission method. *Archives of Dermatological Research*, (292):267–273, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.03.023>.
- D'Arrigo, M. *Incidencia en la relación estructura-función del sistema de grupo sanguíneo MN y del Receptor CD44 en la adhesión eritrocitaria*. Tesis Doctoral, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR, Rosario, Argentina, 2000.
- Fantoni, R., Giacometti, A., y Santos, A. Bridging and depletion mechanisms in colloid-colloid effective interactions: A reentrant phase diagram. *The Journal of Chemical Physics*, 142(22):224905, 2015. doi:10.1063/1.4922263.

- Federico, A., Kaufmann, G. H., Galizzi, G. E., Rabal, H., Trivi, M., y Arizaga, R. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes. *Optics Communications*, 260(2):493–499, 2006. doi:10.1016/j.optcom.2005.11.047.
- Flormann, D., Schirra, K., Podgorski, T., y Wagner, C. On the rheology of red blood cell suspensions with different amounts of dextran: separating the effect of aggregation and increase in viscosity of the suspending phase. *Rheologica Acta*, 55(6):477–483, 2016. doi:10.1007/s00397-015-0882-7.
- Glasstone, S. *Tratado de química física*. Aguilar, 1964.
- Goodman, J. W. *Laser Speckle and Related Phenomena*, cap. 2: Statistical Properties of Laser Speckle Patterns, págs. 9–75. Springer-Verlag, 1975.
- Goodman, J. W. Some fundamental properties of speckle. *Journal of the Optical Society of America*, 66:1145, 1976.
- Gramhame, D. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Reviews*, 41(3):441–501, 1947.
- Helle L. Nielsen, Steen D. Kristensen, S. S. T. y et al. Aspirin response evaluated by the verifynow aspirin system and light transmission aggregometry. *Thrombosis Research*, (123(2)):500–510, 2000. doi:https://doi.org/10.1007/s004030000166.
- Jones, A. y Vincent, B. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles 2. modifications to theory and further studies. *Colloids and Surfaces*, 42(1):113 – 138, 1989. doi:10.1016/0166-6622(89)80081-2.
- Jones, R. y Wykes, K. *Holographic and Speckle Interferometry*. Cambridge Studies in Modern Optics. Cambridge University Press, Second Edition, 1989.
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., y Loscalzo, J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill Education, 18th Edition, 2011.

- Kreis, T. *Holographic Interferometry: Principles and Methods*. Akademie Verlag Series in Optical Metrology. Akademie Verlag, Berlin, 1996.
- Lehmann, M. *Digital Speckle Pattern Interferometry and Related Techniques*. Jhon Wiley Sons, West Sussex England, 2001.
- Londero, C., D'Arrigo, M., y Riquelme, B. Optimización del medio de suspensión para la observación de glóbulos rojos humanos frescos con microscopios ópticos. *Acta Microscopica*, 25(3):151–156, 2016.
- Moelwyn-Hughes, E. *Physical chemistry*. Pergamon Press, 1961.
- Moreira, J. *Desenvolvimento de uma ferramenta computacional de livre acesso para o procesamiento de imagens do speckle laser dinâmico*. Tesis Doctoral, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 2013.
- N'Dri, N. A., Shyy, W., y Tran-Son-Tay, R. Computational modeling of cell adhesion and movement using a continuum-kinetics approach. *Biophysical Journal*, 85(4):2273–2286, 2003. doi:10.1016/S0006-3495(03)74652-9.
- Neu, B., Meiselman, H. J., y Sowemimo-Coker, S. O. Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes. *Biophysical Journal*, 85:75–84, 2003.
- Neu, B., Wenby, R., y J., M. H. Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 95:3059–3065, 2008.
- OriginLab. <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/BiDoseResp-FitFunc>.
- Oulamara, A., Tribillon, G., y Duvernoy, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, 36(2):165–179, 1989. doi:10.1016/S0030-3992(99)00033-X.
- Piederrière, Y., Boulvert, F., Cariou, J., Jeune, B. L., Guern, Y., y Brun, G. L. Back-scattered speckle size as a function of polarization: influence of particle-size and -concentration. *Optics Express*, 13(13):5030–5039, 2005. doi:10.1364/OPEX.13.005030.

- Piederrière, Y., Cariou, J., Guern, Y., Jeune, B. L., Brun, G. L., y Lotrian, J. Scattering through fluids: speckle size measurement and monte carlo simulations close to and into the multiple scattering. *Optics Express*, 12(1):176–188, 2004. doi:http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-12-1-176.
- Pollack, W., Hager, H. J., Reckel, R., Toren, D. A., y Singher, H. O. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. *Transfusion*, 5(2):158–183, 1965.
- Putra, A., Chung, K.-H., y et al. Effect of hydrothermal treatment on light transmission of translucent zirconias. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, (118(3)):422–429, 2017. doi:https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.10.024.
- Rabal, H. y Braga, R. *Dynamic Laser Speckle and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. doi:10.1201/9781420060164.
- Ruhenstroth-Bauer, G. *Biophysical mechanisms in vascular homeostasis and intravascular thrombosis*, cap. The electric charge of blood cells, pág. 42. Appleton-Century-Crofts, New York, 1965.
- Russel, W., Saville, D., y Schowalter, W. *Colloidal Dispersions*. Cambridge University Press, 1992.
- Schmid-Schönbein, H., Volger, E., y Klose, H. Microrheology and light transmission of blood. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, (333):140–155, 1972.
- Seaman, G. V. Electrokinetic behavior of red cells. En *The red blood cell*, págs. 1135–1229. Elsevier, 1975.
- Skalak, R. y Zhu, C. Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheology*, 27:309–325, 1990.
- Stratton, F., Rawlinson, V. I., Gunson, H. H., y Phillip, P. K. The role of zeta potential in rh agglutination. *Vox Sanguinis*, 24(3):273–279, 1973.

- Toderi, M. *Estudio y evaluación de técnicas ópticas para la caracterización y modelización de interacciones entre componentes sanguíneos*. Tesis Doctoral, Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR), Rosario, Argentina, 2020.
- Toderi, M. A., Castellini, H. V., y Riquelme, B. D. Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip. *Journal of Biomedical Optics*, 22(1)(017003), 2017. doi:doi:10.1117/1.JBO.22.1.017003.
- Toderi, M. A., Riquelme, B. D., y Galizzi, G. E. An experimental approach to study the red blood cell dynamics in a capillary tube by biospeckle laser. *Optics and Lasers in Engineering*, 127(105943):0143–8166, 2020. doi:https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2019.105943.
- Van Oss, C. y Absolom, D. Zeta potentials, van der waals forces and hemagglutination. *Vox Sanguinis*, 44(3):183–190, 1983. doi:10.1111/j.1423-0410.1983.tb01883.x.
- Vincent, B. The calculation of depletion layer thickness as a function of bulk polymer concentration. *Colloids and Surfaces*, 50:241 – 249, 1990. doi:10.1016/0166-6622(90)80267-8.
- Vincent, B., Edwards, J., Emmett, S., y Jones, A. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles (“soft spheres”). *Colloids and Surfaces*, 18(2):261 – 281, 1986. doi:10.1016/0166-6622(86)80317-1.
- Wagner, C., Steffen, P., y Svetina, S. Aggregation of red blood cells: From rouleaux to clot formation. *Comptes Rendus Physique*, 14(6):459 – 469, 2013. doi:10.1016/j.crhy.2013.04.004.
- White, S. M., George, S. C., y Choi, B. Automated computation of functional vascular density using laser speckle imaging in a rodent window chamber model. *Microvascular Research*, 82(1):92 – 95, 2011. doi:doi.org/10.1016/j.mvr.2011.03.006.
- Yeom, E. y Lee, S. J. Microfluidic-based speckle analysis for sensitive measurement of erythrocyte aggregation: A comparison of four methods for detection of elevated eryth-

rocyte aggregation in diabetic rat blood. *Biomicrofluidics*, 9(2):024110–024110, 2015. doi:10.1063/1.4917023.

Zhu, C. A thermodynamic and biomechanical theory of cell adhesion part i: General formulation. *Journal of Theoretical Biology*, 150(1):27 – 50, 1991. doi:10.1016/S0022-5193(05)80473-4.