



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

**CARACTERIZACIÓN DE
FLUCTUACIONES DE LA
MEMBRANA CELULAR DE
GLÓBULOS ROJOS FETALES Y
ADULTOS, Y LA RELACIÓN ENTRE
SUS PARÁMETROS
MICROREOLÓGICOS**

Por: Nicolás Bravo Valdivia

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la
Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magíster en
Ciencias con Mención en Física

Agosto 2023

Concepción, Chile

Profesor Guía: Juan Pablo Staforelli

© 2023, Nicolás Bravo Valdivia

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

A Isidora y mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesor guía, el profesor Dr. Juan Pablo Staforelli, por brindarme la oportunidad de trabajar con él, así como la confianza y apoyo a lo largo de este proceso.

Quiero agradecer además a Isidora, quien a sido un constante apoyo emocional en estos últimos años marcado por dificultades.

Agradecer así mismo a mis padres, amistades y personas que estuvieron durante todo mi proceso universitario que me marcaron como persona y son los responsables en parte de quien hoy soy.

Quiero agradecer a mi tío Pablo por apoyarme durante los primeros años de este proceso, además, a mis abuelos que me brindaron apoyo y sincero cariño durante el periodo de pandemia.

Quiero agradecer a mi persona por no derrumbarse en momentos difíciles, marcado por dudas que caracterizaron el periodo de pandemia y todos los problemas generados post-pandemia.

Finalmente vuelvo a agradecer al profesor Dr. Juan Pablo Staforelli, así como agradezco a todos los profesores que me brindaron su apoyo y consejos durante momentos para lograr finalizar de la mejor manera mi proceso de tesis.

Resumen

En este trabajo, se investigó la fluctuación de la membrana de los glóbulos rojos fetales humanos afectados por la diabetes gestacional utilizando la espectroscopia dual de fluctuación de membrana de resolución temporal (D-TRMFS). Esta técnica es una versión modificada del método de pinzas ópticas dobles que ha sido adaptado para medir simultáneamente las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos (RBCs) en puntos distantes de la membrana. Mediante mediciones directas del parpadeo de la membrana, se obtuvieron parámetros microreológicos. Los resultados revelaron diferencias significativas en el grupo de pacientes con diabetes gestacional en comparación con los valores de referencia de fetos sanos y adultos. Estas diferencias se observaron principalmente en el módulo de flexión, mientras que el módulo de tensión no pareció verse afectado. Se propusieron mecanismos metabólicos como explicación de estos resultados, incluyendo la posible interferencia con otras patologías asociadas a la diabetes gestacional. Estos hallazgos proporcionan una nueva perspectiva sobre la influencia de la diabetes gestacional en las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos fetales, lo que podría tener implicaciones importantes en el diagnóstico y tratamiento de esta condición médica.

Keywords – Pinzas Ópticas, Diabetes Gestacional, Espectroscopía, TRMFS, Glóbulos Rojos, Fluctuación de Membrana, Parámetros Microreológicos

Abstract

In this study, the membrane fluctuation of human fetal red blood cells (RBCs) affected by gestational diabetes was investigated using Dual-Time Resolved Membrane Fluctuation Spectroscopy (D-TRMFS). This technique is a modified version of the dual optical tweezers method, adapted to simultaneously measure the mechanical properties of RBCs at distant points on the membrane. By directly measuring membrane flickering, micro-rheological parameters were obtained.

The results revealed significant differences in the group of patients with gestational diabetes compared to the reference values of healthy fetuses and adults. These differences were mainly observed in the flexion modulus, while the tension modulus seemed unaffected. Metabolic mechanisms were proposed as an explanation for these findings, including possible interference with other pathologies associated with gestational diabetes. These findings provide a new perspective on the influence of gestational diabetes on the mechanical properties of fetal red blood cells, which could have important implications in the diagnosis and treatment of this medical condition.

Keywords – Optical Tweezers, Gestional Mellitus Diabetes, Spectroscopy, TRMFS, Red Blood Cells, Membrane Fluctuation, Microrheology parameters

Propuesta de Investigación

A continuación se presenta la hipótesis, el objetivo general y objetivos específicos para el presente trabajo.

Hipótesis

Hay estudios que afirman que altas concentraciones de glucosa en la sangre afectan en las propiedades viscoelásticas de los glóbulos rojos, recreando así una situación de diabetes mellitus[1]. Además la diabetes mellitus gestacional está a menudo relacionada a patologías que presentan los hijos de pacientes que la presentan, como lo es la obesidad infantil y sobrepeso[2]. Aunque las investigaciones relacionan estas dos patologías entre madres e hijos, coloca una incógnita. ¿La diabetes Mellitus gestacional impacta en los parámetros microreológicos de los glóbulos rojos neonatales?

Objetivo General

Buscar una validación entre datos medidos de fluctuación de membrana en glóbulos rojos neonatales y el modelo de descripción de fluctuación de membrana en glóbulos rojos adultos desarrollados.

Objetivos Específicos

- Medir fluctuaciones de membrana de glóbulos rojos neonatales con una configuración de pinzas ópticas de baja potencia.
- Analizar las densidades de espectro de potencia para obtener los distintos parámetros microreológicos.
- Relacionar las fluctuaciones de membrana, y modos de elasticidad entre las condiciones de los pacientes.

Índice general

AGRADECIMIENTOS	I
Resumen	II
Abstract	III
Propuesta de Investigación	IV
Hipótesis	IV
Objetivos Generales	IV
Objetivos Específicos	IV
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1. Teoría de Atrapamiento Óptico	3
2.1.1. Régimen de óptica de Geométrica	3
2.1.2. Régimen de Rayleigh	4
2.2. Glóbulos Rojos	6
2.2.1. Teoría de Fluctuación de Membrana	8
2.2.2. Patologías	9
2.2.2.1. Diabetes Mellitus	10
2.2.2.2. Anemia falciforme	10
2.3. Diabetes Gestacional	10
3. Metodología	12
3.1. Diseño experimental	12
3.1.1. Elementos Ópticos Utilizados	13
3.1.2. Esquema Óptico del Experimento	15
3.2. Muestras Biológicas	16
3.2.1. Solución Salina Amortiguada por Fosfato	16
3.2.2. Muestras Biológicas Adultas	17
3.2.3. Muestras Biológicas Fetales	18
3.3. Tratamiento de datos	20
3.3.1. Obtención de señales	20
3.3.2. Tratamiento y obtención de parámetros microreológicos	21

3.3.3. Tratamiento estadísticos	22
4. Resultados	24
4.1. Resultados de parámetros por grupo de estudios	24
4.1.1. Amplitud	24
4.1.2. Tensión	26
4.1.3. Flexión	27
4.2. Resultados de parámetros entre pacientes con la misma condición	28
4.2.1. Pacientes sanos	28
4.2.1.1. Amplitud	28
4.2.1.2. Tensión	30
4.2.1.3. Flexión	31
4.2.2. Pacientes con diabetes gestacional	32
4.2.2.1. Amplitud	32
4.2.2.2. Tensión	33
4.2.2.3. Flexión	35
4.3. Resultados de grupos diabético gestacional con distintas condiciones	36
4.3.1. Amplitud	37
4.3.2. Tensión	38
4.3.3. Flexión	39
5. Discusión	41
5.1. Discusión de resultados de paciente	43
5.2. Discusión de resultados de grupos diabético gestacional distinguidos	44
6. Conclusión	46
Referencias	47

Índice de figuras

2.1.1.Representación esquemática de las fuerzas generadas por una pinza óptica en una esfera dieléctrica. La muestra fuerza total resultante (roja) que afecta a la esfera dieléctrica cuando está presente en la pinza óptica.	4
2.2.1.Esquemización de los modos de elasticidad. El módulo de expansión A representa la expansión y contracción de la membrana celular, el módulo de cizalle B representa la aplicación de dos fuerzas contrarias y el módulo de flexión C representa la flexión de la membrana.	7
3.1.1.Montaje experimental presentado en artículo investigativo [3] para medición de fluctuación de membrana utilizando montaje de pinzas ópticas doble utilizado a baja potencia evitando efectos de atrapamiento.Fuente:[3]	12
3.2.1.Plano de muestra visualizada en ordenador por microscopía a una escala de x60, corresponde a una muestra de alta concentración de glóbulos rojos.	17
3.2.2.Plano de muestra visualizada en ordenador por microscopía a una escala de x60, corresponde a una muestra fetal donde se puede observar la rapidez con la que se desplazan los glóbulos fetales en un periodo de tiempo de 5 segundos.	19
3.3.1.Gráfico que representa el sondeo de la membrana celular de un glóbulo rojo (Azul) y su respectiva zona lineal (Amarillo).	20
4.1.1.Cómo se puede observar en las Figuras 4.1.1a y 4.1.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones. . .	25
4.1.2.Cómo se puede observar en las Figuras 4.1.2a y 4.1.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones. . .	26
4.1.3.Cómo se puede observar en las Figuras 4.1.3a y 4.1.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones. . .	27

4.2.1. Como se puede observar en las Figuras 4.2.1a y 4.2.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	29
4.2.2. Como se puede observar en las Figuras 4.2.2a y 4.2.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	30
4.2.3. Como se puede observar en las Figuras 4.2.3a y 4.2.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	31
4.2.4. Como se puede observar en las Figuras 4.2.4a y 4.2.4b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	33
4.2.5. Como se puede observar en las Figuras 4.2.5a y 4.2.5b, se presentan los valores de tensión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	34
4.2.6. Como se puede observar en las Figuras 4.2.6a y 4.2.6b, se presentan los valores de flexión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.	35
4.3.1. Como se puede observar en las Figuras 4.3.1a y 4.3.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.	37
4.3.2. Como se puede observar en las Figuras 4.3.2a y 4.3.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.	38
4.3.3. Como se puede observar en las Figuras 4.3.3a y 4.3.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.	39

Capítulo 1

Introducción

La diabetes gestacional es un tipo de diabetes que se desarrolla o se detecta por primera vez durante el embarazo, caracterizada por niveles altos de azúcar en la sangre [4]. Esta condición, que generalmente ocurre alrededor de la semana 24 del embarazo, tiende a resolverse después del parto, pero puede estar asociada con complicaciones tanto para el feto como para la madre, como macrosomía fetal, hipoglucemia neonatal y un mayor riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares [5]. El diagnóstico de la diabetes gestacional se realiza mediante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT), aunque aún existe una falta de comprensión completa sobre los mecanismos fisiopatológicos a nivel celular. En este contexto, la función de los glóbulos rojos o eritrocitos, que transportan oxígeno y nutrientes a los órganos y tejidos en desarrollo, juega un papel crucial tanto para la salud del feto como de la madre durante el embarazo [6]. Dada la hiperglucemia e hiperinsulinemia plasmática fetal asociada a la diabetes gestacional, surge la hipótesis de que esta condición puede tener impactos significativos en la función y propiedades de los glóbulos rojos fetales.

Para mejorar la comprensión del comportamiento de los glóbulos rojos en un entorno con niveles anormales de glucosa, los investigadores han recurrido a la técnica dual-TRMFS como un enfoque prometedor [3]. En este estudio, presentamos el primer enfoque microreológico a nivel de una sola célula utilizando esta técnica en células fetales. La medición dual se logra mediante dos haces de un láser con polarización ortogonal, posicionados diametralmente en la membrana, a baja potencia óptica, sin ejercer fuerza óptica sobre la membrana, con una

resolución comparable e incluso superior a otras técnicas ópticas. Este método se basa en la espectroscopía de fluctuación térmica con resolución temporal (TRMFS) propuesta por Betz [7] y en las pinzas ópticas de doble haz de láser propuestas por Moffitt y Bustamante [8] para la detección diferencial. La técnica dual-TRMFS permite medir las amplitudes de fluctuación generadas por el parpadeo térmico y el metabolismo celular, proporcionando información detallada sobre la dinámica estructural del glóbulo rojo más allá de un solo punto en la membrana. Al utilizar un modelo de membrana celular conocido [9], se pueden obtener las propiedades dinámicas, como la tensión y el módulo de flexión. A través de esta instrumentación, se obtiene información valiosa sobre cómo la diabetes gestacional afecta las propiedades de la membrana de los glóbulos rojos fetales y cómo estos cambios pueden influir en el desarrollo fetal. Estos resultados podrían mejorar nuestra comprensión de la diabetes gestacional y su impacto en la salud materna y fetal, y potencialmente conducir al desarrollo de nuevos enfoques de diagnósticos o terapéuticos.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Teoría de Atrapamiento Óptico

Los primeros experimentos que reportaron presión radiativa actuando sobre objetos macroscópicos debido a una fuente de luz térmica datan de principios del siglo XX de la mano de Nichols y Hull [10] y Levedew [11].

Pero no fue hasta 1970 con la aparición de los láser que se desarrollaron ramas de tecnología capaces de manipular objetos pequeños, aquí es donde se utiliza por primera vez pinzas ópticas utilizando un haz de láser bien enfocado para poder manipular partículas microscópicas en un punto focal donde concentra una alta intensidad [12].

Esto permitió a estudios biológicos y biofísicos el poder manipular microorganismos y orgánulos de una forma poco invasiva, además de dar acceso a mediciones de fuerzas y la dinámica de los movimientos biológicos[13].

2.1.1. Régimen de óptica de Geométrica

Este régimen es válido para partículas mucho más grande que la longitud de onda del láser. El haz de láser se ve afectado cuando incide dentro de una partícula lo cual genera un proceso de absorción y dispersión de los haces de luz, y debido a la dispersión, el haz del láser sufre un cambio en su momento que por la segunda ley de Newton tiene asociado una fuerza, la cual corresponde a una fuerza de dispersión. Por otro lado, por conservación del momento lineal y la tercera ley

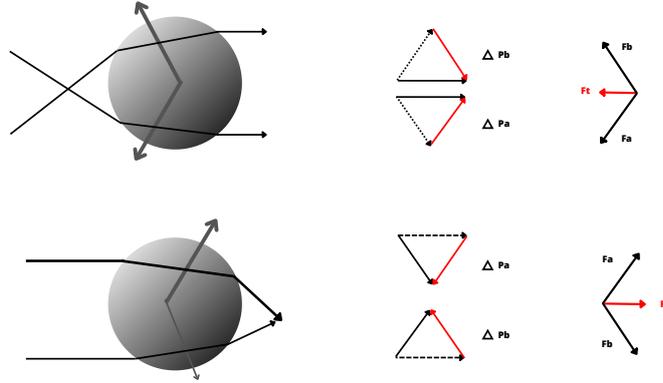


Figura 2.1.1: Representación esquemática de las fuerzas generadas por una pinza óptica en una esfera dieléctrica. La muestra fuerza total resultante (roja) que afecta a la esfera dieléctrica cuando está presente en la pinza óptica.

de Newton la partícula sufre el mismo cambio de momento que la luz, pero en dirección contraria la cual genera una fuerza gradiente hacia dentro.

Con la fuerza de gradiente y fuerza de dispersión que se compensan entre ellas, y en la situación en que estas dos fuerzas se contrarresten totalmente, se genera una trampa óptica estable para una partícula esférica.

2.1.2. Régimen de Rayleigh

El régimen de Rayleigh comienza con la suposición de que las partículas se pueden aproximar a pequeños dipolos dentro de campos homogéneos, bajo esta suposición la ley de fuerza de Lorentz nos da un acercamiento a lo que sucede en un dipolo que se ve afectado por un campo electromagnético:

$$\vec{F} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \times \vec{B} \quad (2.1.1)$$

Donde \vec{E} describe el campo eléctrico, \vec{B} describe el campo magnético y \vec{p} es el momento dipolar inducido. El campo electromagnético induce el momento dipolar, el cual se puede expresar como

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (2.1.2)$$

Donde la polarización de una partícula en relación a su medio es

$$\alpha = 4\pi n_m^2 \epsilon_0 a^3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \quad (2.1.3)$$

donde m es el índice de refracción relativo, n_e es el índice de refracción del dipolo esférico y n_m es el índice de refracción del medio, además ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío y a es el radio del dipolo.

Se introduce la siguiente identidad vectorial

$$(\vec{A} \cdot \nabla) \vec{A} = \nabla \left(\frac{A^2}{2} \right) - \vec{A} \times (\nabla \times \vec{A}) \quad (2.1.4)$$

Con esta identidad y la expresión del momento dipolar inducido \vec{p} , la fuerza de Lorentz se puede expresar como

$$\vec{F} = (\alpha \vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \alpha \vec{E}}{\partial t} \times \vec{B} \quad (2.1.5)$$

$$= \alpha \nabla \left(\frac{E^2}{2} \right) - \alpha \vec{E} \times (\nabla \times \vec{E}) + \alpha \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \times \vec{B} \quad (2.1.6)$$

Sabiendo que la Ley de Faraday se expresa como

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.1.7)$$

Nuestra ecuación se puede escribir como

$$\vec{F} = \alpha \nabla \left(\frac{E^2}{2} \right) - \alpha \vec{E} \times \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) + \alpha \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \times \vec{B} \quad (2.1.8)$$

Introducimos otra identidad vectorial

$$\frac{\partial}{\partial t} (\vec{A} \times \vec{B}) = \vec{A} \times \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} + \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \times \vec{B} \quad (2.1.9)$$

Para reducir la fuerza de Lorentz a

$$\vec{F} = \alpha \left[\frac{1}{2} \nabla (E^2) + \frac{\partial}{\partial t} (\vec{E} \times \vec{B}) \right] \quad (2.1.10)$$

$$= \alpha \left[\frac{1}{2} \nabla (E^2) + \mu \frac{\partial \vec{S}}{\partial t} \right] \quad (2.1.11)$$

Considerando que el dipolo esférico está siendo afectado por un haz de láser de onda continua, no existe variación en la potencia a lo largo del tiempo, con lo que el promedio temporal de la fuerza se reduce a

$$\langle \vec{F} \rangle = \frac{\alpha}{2} \langle \nabla (E^2) \rangle \quad (2.1.12)$$

Esta expresión corresponde a la fuerza de gradiente [14]

$$\vec{F}_g = \frac{\alpha}{2n_m \epsilon_0 c} \nabla I \quad (2.1.13)$$

Donde I es la intensidad del láser. Por otro lado, la fuerza de dispersión a la que es afectado el dipolo [15] bajo un láser de intensidad I_0 es

$$F_s = \frac{I_0 n_m}{c} \frac{128 \pi^5 r^6}{3 \lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (2.1.14)$$

Y para obtener una trampa óptica estable, necesitamos que se cumpla la siguiente condición

$$R = \frac{F_g}{F_s} \geq 1 \quad (2.1.15)$$

2.2. Glóbulos Rojos

Los glóbulos rojos son células de mucha importancia en nuestro cuerpo, éstas se encargan de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los músculos, órganos y otras células. En este proceso de transporte los glóbulos rojos se deforman para poder pasar a través de vasos sanguíneos, venas y capilares [16]. La propiedad mecánica de deformabilidad de ellos está determinada por su geometría, la estructura de la membrana celular y su viscoelasticidad [17].

Estos tienen forma de disco bicóncavo y no poseen núcleo celular u organelos. Además tienen en promedio un grosor entre $2\text{-}3\mu\text{m}$, un diámetro entre $6\text{-}8\mu\text{m}$ y una superficie aproximada de $136\mu\text{m}^2$ [18]. La deformabilidad de los glóbulos rojos está también determinada por la estructura de la membrana celular, que en glóbulos rojos humanos se compone de tres capas: una capa externa, una bicapa de fosfolípidos y un citoesqueleto de espectrina que determinan la flexibilidad, una característica importante de los materiales.

Además, la deformación de los glóbulos rojos también se ven afectada por distintos parámetros microreológicas de la sangre como los parámetros de viscoelasticidad de esta. Dentro de los parámetros de viscoelasticidad existen 3 distintos modos de elasticidad fundamentales esquematizados en la figura 2.2.1: Expansión, Cizalle y Flexión[19].

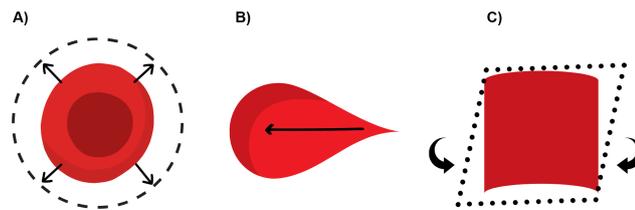


Figura 2.2.1: Esquematización de los modos de elasticidad. El módulo de expansión A representa la expansión y contracción de la membrana celular, el módulo de cizalle B representa la aplicación de dos fuerzas contrarias y el módulo de flexión C representa la flexión de la membrana.

El módulo de expansión o compresión σ representa la energía elástica producida por una dilatación o compresión de la membrana y está influenciado principalmente por la bicapa.

El módulo de cizalle ν representa la energía elástica producida al extenderse la superficie de la membrana y está influenciada principalmente por la red de espectrina.

El módulo de flexión κ es determinado por la energía necesaria para deformar la curvatura original de la célula, y está influenciado por la composición química de la bicapa.

2.2.1. Teoría de Fluctuación de Membrana

Las membranas son parte importante en las células debido a que estas separan el interior de las células con el medio exterior en las que se encuentran, permitiendo además la interacción con el medio. Estas membranas interactúan con el medio a través de excitaciones y fluctuaciones térmicas, de esta interacción es posible derivar en el entendimiento mecánico de las membranas. En el entendimiento de las fluctuaciones de membrana Helfrich fue muy importante quien reconoció que, las fluctuaciones de la membrana conllevaban un gasto energético mediado por la rigidez de la membrana que se opone cambios en la flexión[9], y posteriormente debido a la consideración de la composición de la membrana, se identificó que la membrana tiene tres modos de vibración: Tensión, Flexión y Cizalle[20]. Cada uno de estos modos de vibración tienen orígenes e implicancias en el funcionamiento de la membrana celular, como la composición química de la membrana y la red de espectrina.

Dentro del modelo de fluctuación de membrana[7] tenemos la energía de fluctuación que está descrita por el hamiltoniano de Helfrich que cuantifica la energía necesaria para doblar y estirar la bicapa lipídica:

$$F = \int dA \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla h)^2 \right] \quad (2.2.1)$$

Donde h es la extensión de la membrana desde su posición de equilibrio. Usando el teorema de equipartición, la función de correlación de las fluctuaciones son:

$$\langle h_q h'_q \rangle = \frac{K_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} (2\pi)^2 \delta(q + q') \quad (2.2.2)$$

Donde K_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, q y q' son los modos de vibración de la membrana. Fluctuaciones de longitud q tienen una frecuencia de relajación de $\omega_q = (\kappa q^4 + \sigma q^2)/4\eta q$ para una membrana impermeable, donde η es la viscosidad promedio de los fluidos separados por la membrana. Esto da como resultado la siguiente función de correlación temporal:

$$\langle h_q(t) h'_q(0) \rangle = (2\pi)^2 \delta(q + q') \langle h_q h'_q \rangle \exp(-\omega_q t) \quad (2.2.3)$$

Tomando la transformada de Fourier e integrando sobre todos los modos q , obtenemos la densidad de espectro de frecuencia (Siglas en inglés, PSD) para una membrana plana:

$$PSD = \int \frac{d^2}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \langle h_q(t) h_{-q}(0) \rangle \exp(i\omega_q t) dt \quad (2.2.4)$$

$$= \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} q dq \langle h_q h_q \rangle \frac{\omega_q}{\omega_q^2 + \omega^2} \quad (2.2.5)$$

$$= \frac{4\eta K_B T}{\pi} \int \frac{dq}{(\kappa q^3 + \sigma q) + (4\eta\omega)^2} \quad (2.2.6)$$

Esta integral sobre q no se puede expresar de forma analítica, pero se pueden obtener aproximaciones para altas frecuencias y para bajas frecuencias. De esta manera, para aproximaciones $\omega \rightarrow 0$, la PSD se reduce a:

$$PSD \underset{\omega \rightarrow \infty}{=} \frac{K_B T}{6\pi (2\eta^2 \kappa)^{1/3} \omega^{5/3}} = \frac{K_B T}{6\pi (2\eta^2 \kappa)^{1/3} (2\pi f)^{5/3}} \quad (2.2.7)$$

Y para aproximaciones de $\omega \rightarrow \infty$, la PSD se reduce a:

$$PSD \underset{\omega \rightarrow 0}{=} \frac{K_B T}{2\sigma\omega} = \frac{K_B T}{2\sigma (2\pi f)} \quad (2.2.8)$$

Usando estas aproximaciones, podemos analizar de manera separada las fluctuaciones de membrana para estos dos casos.

2.2.2. Patologías

Como la deformabilidad de los glóbulos rojos está directamente relacionada a la composición y propiedades de la membrana, existen varias enfermedades que afectan esta composición. Además la deformabilidad de los glóbulos se ve afectada por los cambios en la viscosidad de la sangre, viscosidad que a su vez es afectada por diferentes situaciones dentro del torrente sanguíneo, sin ir más lejos la existencia de agregaciones en la macrocirculación con baja velocidad de cizallamiento, aumenta la viscosidad de la sangre. Mientras que la deformabilidad de los glóbulos rojos necesaria en la microcirculación también afecta la macrocirculación, ya que una disminución en la deformabilidad aumenta también la viscosidad de la sangre.

Estos aumentos en la viscosidad de la sangre llevan a un aumento en la resistencia vascular que disminuye el flujo de sangre.

2.2.2.1. Diabetes Mellitus

La diabetes tiene una alta presencia en la sociedad, según datos del 2021 del banco mundial alrededor del 9.8 % de la población mundial adulta entre 20 y 79 años[21] tiene diabetes mellitus, estos datos hacen de la diabetes un tema preocupante debido a la prevalencia de esta en la sociedad actual. La diabetes mellitus tiene graves consecuencias en el cuerpo humano y afecta de forma significativa en la deformabilidad de los glóbulos rojos[22]

2.2.2.2. Anemia falciforme

La anemia falciforme es una enfermedad hereditaria que afecta a la producción de hemoglobina en el cuerpo, dando como resultado la maduración de glóbulos rojos falciformes, los cuales pueden carecer de la biconcava particular de los glóbulos rojos. En la anemia falciforme pueden madurar glóbulos rojos en formas estiradas o en forma de medias lunas, además de disminuir de forma significativa la deformabilidad de los glóbulos rojos[23].

2.3. Diabetes Gestacional

La diabetes gestacional es una enfermedad que puede aparecer durante el embarazo en madres que no padecen ningún tipo de diabetes[4].

Esta puede aparecer a lo largo de todo el embarazo pero con mayor probabilidad entre el segundo y tercer trimestre[24].

La diabetes gestacional tiene varios factores de riesgo que han sido asociados a su aparición. Dentro de estos factores se encuentra el sobrepeso u obesidad, una edad avanzada de la madre gestante y antecedentes familiares de resistencia a la insulina o diabetes.

Si bien la diabetes gestacional suele desaparecer luego del parto, esta aumenta el riesgo de padecer varios trastornos tanto de la madre como del hijo. Las madres después del embarazo e hijos tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2, además de aumentar el riesgo de

obesidad en los niños[5].

Durante el embarazo, los glóbulos rojos maternos transportan oxígeno y nutrientes hasta la placenta en un sistema circulatorio Útero-placentario, desde aquí el sistema circulatorio fetal-placentaria permite transportar glóbulos rojos fetales pobre en oxígeno y nutrientes para poder llevar a cabo el intercambio de oxígeno y nutrientes[6].

Debido a la influencia de la diabetes, en la madre se ven afectados los parámetros mecánicos de los glóbulos rojos y debido a la conexión materno-fetal a través de la placenta pueden existir además cambios dentro de los parámetros mecánicos de los glóbulos rojos fetales.

3.1.1. Elementos Ópticos Utilizados

Láser

El láser utilizado en este estudio es el Ventus HP de 5000 mW, con una longitud de onda de $\lambda = 1064$ nm, proporcionado por Quantum Laser. Este láser infrarrojo es empleado para medir las muestras sin afectar su integridad. Se opera a una potencia de 1W (40 % de su potencia máxima) para asegurar su estabilidad.

Lámina de media onda

Se utilizan láminas de media onda, también conocidas como láminas retardadoras, para desfasar las componentes perpendiculares de polarización. En este esquema óptico, se emplean las AHWP05M-980 de Thorlabs Inc., denominadas HWP.

Cubo Polarizador

Los cubos polarizadores o divisores de haz polarizadores se utilizan para separar la luz incidente en haces reflejados y transmitidos. En este estudio, se emplean los cubos CCM1-PBS253 de Thorlabs Inc., identificados como PBS.

Lente Convergente

Las lentes convergentes se utilizan para converger los rayos de luz hacia un punto focal a una distancia focal específica. En este esquema óptico, se emplean distintos lentes con variaciones en su distancia focal, identificados simplemente como L.

Piezoeléctrico

Los piezoeléctricos son componentes eléctricos que se deforman y doblan mecánicamente al aplicarles diferencias de voltaje. En este esquema óptico, se utilizan los KC1-T-PZ de Thorlabs Inc., denotados como PZM.

Filtro de densidad neutra

Un filtro de densidad neutra se usa para disminuir la intensidad de la luz sin alterar otras características. En este estudio, se denota como NDF.

Espejo dicroico

Los espejos dicroicos reflejan luz con una longitud de onda específica. En este esquema, identificamos como DF.

Lente objetivo

Los lentes objetivos forman una imagen primaria, determinando la calidad y nivel de zoom. En este esquema, se denota como OL1.

Lente colimador

Un lente colimador se utiliza para limitar la dirección de la luz y obtener un haz de luz homogéneo. En este esquema, se denota como OL2.

Fuente de iluminación azul

Una fuente de luz azul de baja intensidad que no genera interferencia con los haces infrarrojos del láser. Junto al sistema iluminador, proporciona una iluminación de Köhler, entregando una luz desenfocada y uniforme a la muestra. En este esquema, se denota como LED LAMP.

Lente de tubo

Las lentes de tubo se utilizan como lentes secundarios junto a los lentes objetivos para minimizar aberraciones en la imagen. En este esquema, se denota como TL.

Cámara CMOS

La cámara CMOS tiene como objetivo capturar la imagen de la muestra y visualizarla en tiempo real en un computador. En este esquema, se denota como CMOS.

Fotodetector de cuatro cuadrantes

Un fotodetector de cuatro cuadrantes es un elemento óptico que detecta las señales de un haz a partir de cuatro fotodiodos colocados en forma de cuadrantes idénticos en distintas posiciones. Cuando un haz de luz incide en el fotodetector, cada cuadrante detecta una fotocorriente (Q1, Q2, Q3 y Q4).

Las coordenadas normalizadas (X, Y) que ubican el láser en el sensor están determinadas por las ecuaciones siguientes:

$$X = \frac{(Q2 + Q3) - (Q1 + Q4)}{(Q1 + Q2 + Q3 + Q4)} = \frac{X_{Diff}}{SUM} \quad (3.1.1)$$

$$Y = \frac{(Q1 + Q2) - (Q3 + Q4)}{(Q1 + Q2 + Q3 + Q4)} = \frac{Y_{Diff}}{SUM} \quad (3.1.2)$$

La salida de información se presenta en tres componentes: 1) Eje X $(Q2 + Q3) - (Q1 + Q4)$, 2) Eje Y $(Q1 + Q2) - (Q3 + Q4)$ y 3) Suma $(Q1 + Q2 + Q3 + Q4)$. En este esquema óptico, se utiliza un fotodetector PDQ80A de Thorlabs Inc., denominado QPD.

3.1.2. Esquema Óptico del Experimento

El esquema óptico del experimento está montado sobre una mesa óptica suspendida para minimizar el ruido mecánico. Cada dispositivo relacionado con el proceso de captura de información está conectado a una fuente UPS para evitar ruidos eléctricos provenientes de bajas de voltaje. A continuación, se describe el esquema óptico paso a paso:

El láser (Ventus HP, 5000 mW, $\lambda = 1064$ nm, Quantum Laser) atraviesa un sistema formado por láminas de media onda y cubos polarizadores (HWP1-PBS1-HWP2) que polarizan y dividen el láser para utilizar una parte de él, asegurando así la intensidad del láser.

El láser pasa por un sistema telescópico compuesto por las lentes L1 y L2 de distancias focales 50 mm y 200 mm, respectivamente, con el objetivo de aumentar el perfil del láser.

Los sistemas formados por los cubos polarizadores y piezoeléctricos (PBS2-PZM1-PBS3) y (PBS2-PZM2-PBS3) se encargan de separar los haces vertical y horizontal, permitiendo así el control de la posición de cada haz.

Después de pasar por el segundo sistema telescópico formado por las lentes L3 y L4 de distancias focales 200 mm y 75 mm, respectivamente, el perfil del láser se reduce antes de entrar al plano de la muestra. Entre estos lentes se encuentra un filtro

de densidad neutra (ND) que, junto con el primer sistema (HWP1-PBS-HWP2), disminuye la intensidad del láser a 1 mW.

El láser atraviesa el plano de la muestra, pasando por las componentes (DF1-OL1-OL2), para finalmente separar los haces vertical y horizontal con el cubo polarizador PBS4. Luego, los haces pasan por las lentes L6 y L5, respectivamente.

Las lentes L6 y L5, junto con el plano focal trasero del lente colimador OL2, forman un plano conjugado que lleva los haces a sus respectivos fotodetectores.

Adicionalmente, la muestra es iluminada a través de una fuente de luz azul de baja intensidad (LED LAMP), que es colimada por la lente OL2. Esto proporciona una iluminación de Köhler que es captada por la cámara CMOS para ser emitida en tiempo real por computadora.

3.2. Muestras Biológicas

En esta sección, se presentan los detalles sobre la obtención, preparación y manejo de las muestras biológicas utilizadas en el estudio. Las muestras biológicas son de vital importancia, ya que representan el punto de partida para realizar las mediciones y análisis del presente estudio.

3.2.1. Solución Salina Amortiguada por Fosfato

La solución salina amortiguada por fosfato (PBS, Phosphate-buffered saline) es una solución amortiguadora de pH comúnmente utilizada en investigaciones en el área de biología y bioquímica.

Esta solución presenta características similares a los líquidos presentes en el cuerpo de los mamíferos fuera de las células, lo que la hace un vehículo celular ideal sin alterar sus funciones normales.

La composición típica de la solución PBS incluye cloruro de sodio (NaCl), fosfato disódico (Na_2HPO_4) y, en algunas formulaciones, fosfato monopotásico (KH_2PO_4)[25].

Su uso es fundamental en este estudio debido a la gran cantidad de glóbulos rojos presentes en la sangre, lo que dificulta la aplicación directa de la técnica Dual-TRMFS.

Por lo tanto, es crucial disolver las muestras sanguíneas en esta solución para reducir el conteo de glóbulos rojos y permitir la medición individual de cada glóbulo rojo de manera aislada.

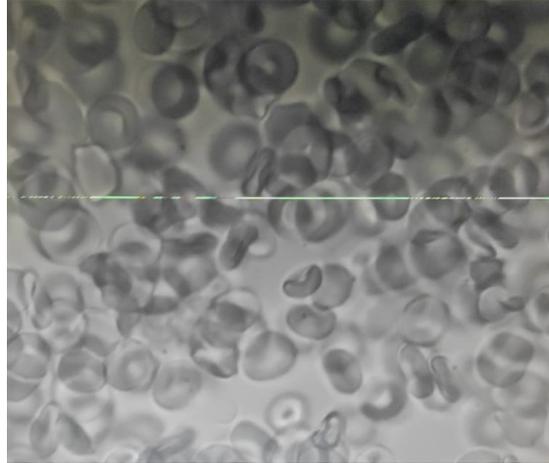


Figura 3.2.1: Plano de muestra visualizada en ordenador por microscopía a una escala de $\times 60$, corresponde a una muestra de alta concentración de glóbulos rojos.

Esta adaptación de la técnica permitirá obtener datos precisos y confiables sobre las fluctuaciones de membrana y, en última instancia, facilitará el análisis y la interpretación de los resultados.

3.2.2. Muestras Biológicas Adultas

Las muestras biológicas adultas se obtuvieron a partir de sangre adulta y se prepararon mediante una dilución en solución PBS en proporciones específicas. Inicialmente, se mezclaron $10\mu L$ de sangre con $990\mu L$ de solución PBS en un tubo eppendorf para obtener una primera disolución homogénea.

A partir de esta disolución inicial se prepararon tres muestras distintas mediante diluciones secuenciales en tubos eppendorf, cada una de estas muestra tienen objetivos distintos de investigación y en esta investigación se utilizó la disolución con menor concentración de glóbulos rojos. Las muestras se obtuvieron mezclando $400\mu L$ de la disolución inicial con $600\mu L$ de solución PBS para la primera muestra, $300\mu L$ de la disolución inicial con $700\mu L$ de solución PBS para la segunda muestra, y finalmente $200\mu L$ de la disolución inicial con $800\mu L$ de solución PBS para la tercera muestra. Estas muestras se conservaron en un horno de laboratorio a $37^{\circ}C$ para garantizar condiciones adecuadas de temperatura.

Posteriormente, se colocó un trozo de cinta de doble faz con un pequeño orificio en un portaobjetos. Luego, se depositó una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente $5\mu L$) en el centro del orificio utilizando una micropipeta. Con cuidado, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se selló utilizando la cinta de doble faz, de manera que la muestra se extendiera uniformemente a lo largo del portaobjetos. A continuación, se permitió que la muestra se decantara para que los glóbulos rojos se adhirieran al portaobjetos.

Previo a la preparación de las muestras, se desinfectó el mesón de trabajo y se mantuvo cerrada cualquier entrada de aire para evitar la presencia de contaminantes. Estas precauciones son fundamentales para garantizar la integridad de las muestras y la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Una vez que la muestra ha decantado y se han realizado todos los procedimientos de preparación, se coloca el porta muestras en el montaje experimental para iniciar las mediciones.

3.2.3. Muestras Biológicas Fetales

Las muestras biológicas fetales se obtuvieron a través del laboratorio de investigación materno-fetal (LIMaF), en el contexto de un proyecto de investigación dedicado a caracterizar muestras fetales. Estas muestras fueron donadas de manera voluntaria y con previo consentimiento informado, cumpliendo rigurosamente con las normas de bioética y bioseguridad.

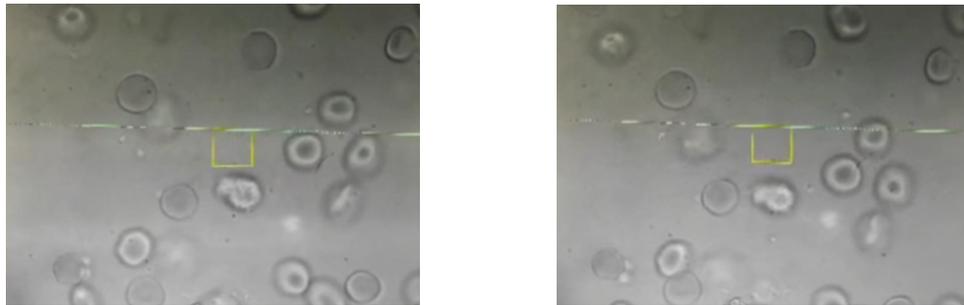
Una vez llegadas las placentas al laboratorio LIMaF, se extrajeron $10\mu L$ de sangre del sistema circulatorio fetal-placentario para garantizar la especificidad de las muestras como fetales. Esta sangre se preparó en un tubo eppendorf añadiendo $990\mu L$ de solución PBS, y posteriormente se selló el tubo eppendorf con papel parafilm para preservar la integridad de la muestra.

Las muestras fueron transportadas con especial cuidado para evitar pérdida de temperatura y exposición a la luz solar, lo cual podría degradar las muestras biológicas. Una vez en el laboratorio de pinzas ópticas y microscopía, se crearon tres muestras distintas en tubos eppendorf: la primera con $400\mu L$ de muestra y $600\mu L$ de solución PBS, la segunda con $300\mu L$ de muestra y $700\mu L$ de solución PBS, y la tercera con $200\mu L$ de muestra y $800\mu L$ de solución PBS. Estas muestras se conservaron en un horno de laboratorio a $37^{\circ}C$ para mantener las condiciones

adecuadas de temperatura.

Luego, se procedió a colocar un trozo de cinta de doble faz con un pequeño orificio en un portaobjetos. Se depositó una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente $10\mu L$) en el centro del orificio utilizando una micropipeta. Con cuidado, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se selló utilizando la cinta de doble faz, asegurándose de que la muestra se extendiera uniformemente a lo largo del portaobjetos. Después, se permitió que la muestra se decantara para que los glóbulos rojos se adhirieran al portaobjetos.

Durante este proceso, se enfrentaron dificultades debido a que la sangre fetal tiene una viscosidad menor[26] que la sangre adulta, lo que resultaba en el desplazamiento de los glóbulos rojos una vez colocados en el montaje experimental y, en algunos casos, interfería con las mediciones de fluctuación. Para solucionar esto, se incorporó parte de la muestra sobre la cinta de doble faz y se aumentó la cantidad de muestra sobre el portaobjetos, minimizando así la cantidad de aire encapsulado dentro del cubreobjetos. Además, las muestras fueron selladas alrededor con un adhesivo instantáneo sin base de acetona para minimizar la perfusión de la muestra hacia afuera y mantener la integridad de la muestra durante las mediciones.



(a) Plano de muestra en tiempo inicial (b) Plano de muestra 5 segundos después

Figura 3.2.2: Plano de muestra visualizada en ordenador por microscopía a una escala de $\times 60$, corresponde a una muestra fetal donde se puede observar la rapidez con la que se desplazan los glóbulos fetales en un periodo de tiempo de 5 segundos.

Con estas modificaciones y precauciones, se logró superar los desafíos iniciales y se obtuvieron muestras biológicas fetales que aseguraron la integridad de las mediciones a lo largo del análisis.

3.3. Tratamiento de datos

En esta sección se describe el proceso de tratamiento de los datos obtenidos en este estudio. Los datos crudos adquiridos durante las mediciones experimentales fueron sometidos a diversos procedimientos para obtener resultados significativos y confiables. El tratamiento de datos se dividió en tres etapas principales: la obtención de señales, el tratamiento y obtención de parámetros microreológicos, y el análisis estadístico.

3.3.1. Obtención de señales

El esquema experimental se maneja a través del software LabVIEW, donde un programa optimizado para este estudio se encarga de la manipulación de los piezoeléctricos presentes en el montaje experimental.

Inicialmente, se colocan ambos haces del láser en dos puntos opuestos de la membrana celular del glóbulo rojo a medir. A través de LabVIEW, se obtienen datos de señales de interferencia de los haces del láser mientras estos se mueven hacia el centro del glóbulo rojo, sondeando así las paredes bicóncavas de la membrana celular. Estas mediciones se realizan recopilando 20,000 datos a una frecuencia de muestreo de 20,000 Hz.

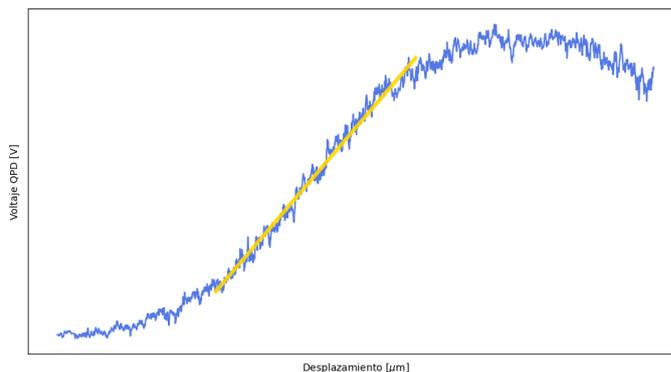


Figura 3.3.1: Gráfico que representa el sondeo de la membrana celular de un glóbulo rojo (Azul) y su respectiva zona lineal (Amarillo).

El propósito de estas mediciones es encontrar la denominada 'zona lineal' de la membrana, donde las señales de fluctuación son óptimas. Una vez identificada la zona lineal, se colocan los haces del láser en los puntos medios de esta región para optimizar las señales de fluctuación de membrana.

Posteriormente, se utiliza un programa desarrollado en MATLAB para graficar y encontrar los puntos medios de las zonas lineales de ambos haces. Con esta información, se procede a medir las señales de fluctuación de membrana, recopilando en promedio 20 archivos de 200,000 datos a una frecuencia de muestreo de 20,000 Hz.

Este proceso de obtención de señales es fundamental para garantizar la precisión y confiabilidad de los datos recolectados durante las mediciones experimentales.

3.3.2. Tratamiento y obtención de parámetros microreológicos

Los archivos de datos proporcionados por los fotodetectores se encuentran en unidades de medida de mV. Para realizar la conversión a unidades de longitud (nm), se utilizó un programa en lenguaje Python que utiliza la ecuación de pendiente:

$$\Delta d = m\Delta V = m \frac{X_{diff}}{Sum} \quad (3.3.1)$$

Este programa calcula la pendiente de la zona lineal entre dos puntos seleccionados por el usuario y aplica la transformación a nm para todos los datos de cada archivo de fluctuación.

Además, se implementó otro programa en Python para la obtención de los parámetros microreológicos a través del tratamiento de la densidad de espectro de potencia (PSD) de los datos. Las ecuaciones de flexión 2.2.7 y tensión 2.2.8 se ajustan a las PSD de los datos para obtener los valores de flexión y tensión de los glóbulos rojos en cada uno de los 20 archivos de cada glóbulo. Estos valores de PSD, amplitud, tensión y flexión se promedian para obtener los valores promediados de cada glóbulo rojo.

El proceso de obtención de parámetros microreológicos se realiza para cada uno de los 20 archivos, y se examina cada gráfico de PSD con sus respectivos ajustes para asegurar la precisión de los resultados. En caso de detectar ruido o señales que afecten el tratamiento de datos, se toman las medidas necesarias para corregirlos y garantizar la fiabilidad de los parámetros obtenidos. Este análisis individual de cada glóbulo rojo permite obtener resultados precisos y confiables de los parámetros microreológicos de las muestras biológicas.

3.3.3. Tratamiento estadísticos

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se utilizó el software Prism GraphPad, el cual es una herramienta de bioestadística básica, ajuste de curvas y creación de gráficos científicos. Los datos se organizaron y graficaron en gráficos de violín con media.

Se trabajó con tres grupos de investigación:

- Grupo 'Adulto': Consiste en mediciones de 98 glóbulos rojos de 3 adultos sanos distintos, y tiene como objetivo ser un grupo de control.
- Grupo 'Sano': Consiste en mediciones de 60 glóbulos rojos fetales extraídos de placentas de madres sanas.
- Grupo 'Diabético': Consiste en mediciones de 140 glóbulos rojos fetales extraídos de placentas de madres con diabetes gestacional.

A partir de estos grupos, se presentan gráficos de violín con media para los parámetros microreológicos de Amplitud de fluctuaciones[nm], Tensión[σ] y Flexión[κ] de los dos haces (S_V y S_H) que conforman el esquema óptico.

Además de los gráficos, se incluyen los valores medios y la desviación estándar del error con un intervalo de confianza del 95 %, así como los valores de probabilidad P de cada medición. Estos valores P fueron obtenidos mediante un test ANOVA de una vía y un test Turkey.

Para garantizar la fiabilidad de los datos, se realizaron correcciones eliminando datos atípicos (outliers) que podrían haber surgido debido a fallas o ruidos presentes en las mediciones. Esta corrección se realizó utilizando el método ROUT con un coeficiente $Q = 1\%$, lo que corresponde a las colas de una distribución gaussiana donde $\alpha = Q = 0,01$.

Finalmente, se proporcionan las interpretaciones de los valores P en función de su rango. Valores P mayores a 0,05 indican que no hay diferencias significativas entre los grupos (*ns*). Valores P entre 0,05 y 0,01 indican una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95 % (*), mientras que valores P entre 0,01 y 0,001 indican una diferencia significativa con un nivel de confianza del 99 % (**). Valores P entre 0,001 y 0,0001 indican una diferencia significativa con un nivel de confianza del 99,9 % (***), y finalmente, valores P inferiores a 0,0001 indican una diferencia

significativa con un nivel de confianza superior al 99,9% (****). Estos valores P permiten evaluar la significancia de las diferencias entre los grupos en función de los parámetros microreológicos medidos.

Capítulo 4

Resultados

En esta sección, se presentarán los resultado y análisis de los parámetros microreológicos obtenidos para cada grupo de estudio, así como la relación entre estos grupos. Se realizará un análisis de los parámetros mecánicos dentro de los grupos 'Sanos' y 'Diabético Gestacional' para comprender las diferencias y similitudes entre los pacientes. Además, se analizarán los valores de probabilidad P comparando los distintos grupos de estudio. El objetivo de este análisis es proporcionar una visión integral de las propiedades microreológicas en los grupos de estudio

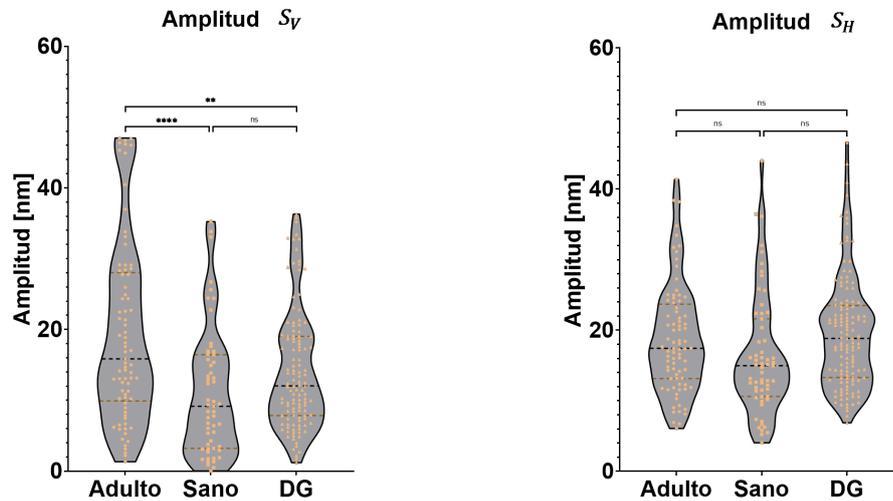
4.1. Resultados de parámetros por grupo de estudios

En un comienzo, se hace evidente analizar si existe alguna relación entre los parámetros microreológicos entre los grupos objetivos. Para ello, se compararán y contrastarán los resultados obtenidos en los grupos de estudio 'Adultos', 'Sanos' y 'Diabético Gestacional'. A continuación, se presentarán los gráficos y análisis correspondientes para cada uno de los parámetros microreológicos evaluados.

4.1.1. Amplitud

Los valores de la media para el grupo 'Adulto' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $19,43 \pm 1 \text{ nm}$ y $18,80 \pm 0,9 \text{ nm}$ respectivamente. Para el grupo 'Sano', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $11,04 \pm 1 \text{ nm}$ y $16,40 \pm 1$

nm. Por último, el valor de la media para el grupo 'Diabético Gestacional' fue de $14,21 \pm 0,8 \text{ nm}$ para el láser S_V y $19,64 \pm 0,7 \text{ nm}$ para el láser S_H .



(a) Amplitud medida con láser vertical (b) Amplitud medida con láser horizontal

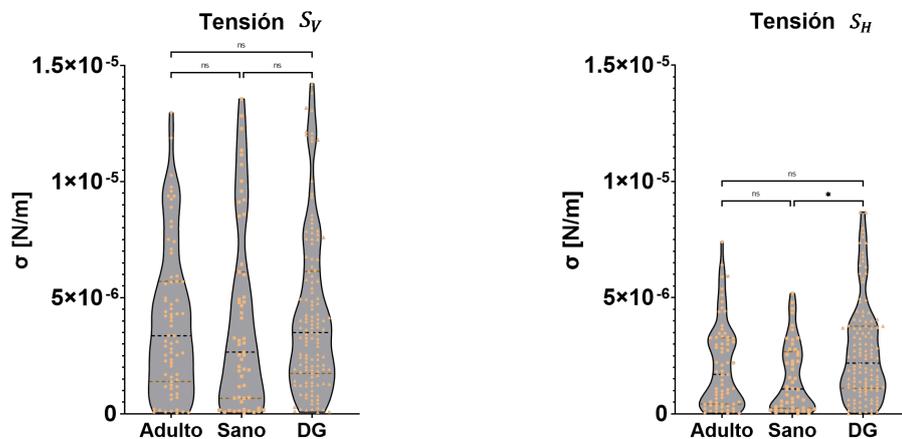
Figura 4.1.1: Como se puede observar en las Figuras 4.1.1a y 4.1.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_V mostró un valor bajo de $P < 0,0001$, lo que implica que hay una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, la comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor de $P = 0,0027$, lo que sugiere que hay una diferencia pequeña entre los grupos. Además, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' reveló un valor de $P = 0,2725$, indicando que no hay una diferencia significativa entre estos grupos.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,4014$, lo que indica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Asimismo, la comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' resultó en un valor de $P = 0,9475$, lo que sugiere que tampoco hay una diferencia significativa entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor de $P = 0,0752$, lo que implica que tampoco hay una diferencia significativa entre estos grupos.

4.1.2. Tensión

Los valores de la media para el grupo 'Adulto' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(4,027 \pm 0,4)10^{-6} N/m$ y $(2,095 \pm 0,2)10^{-6} N/m$ respectivamente. Para el grupo 'Sano', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(4,008 \pm 0,5)10^{-6} N/m$ y $(1,578 \pm 0,2)10^{-6} N/m$. Por último, el valor de la media para el grupo 'Diabético Gestacional' fue de $(4,271 \pm 0,3)10^{-6} N/m$ para el láser S_V y $(2,697 \pm 0,2)10^{-6} N/m$ para el láser S_H .



(a) Tensión medida con láser vertical (b) Tensión medida con láser horizontal

Figura 4.1.2: Como se puede observar en las Figuras 4.1.2a y 4.1.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

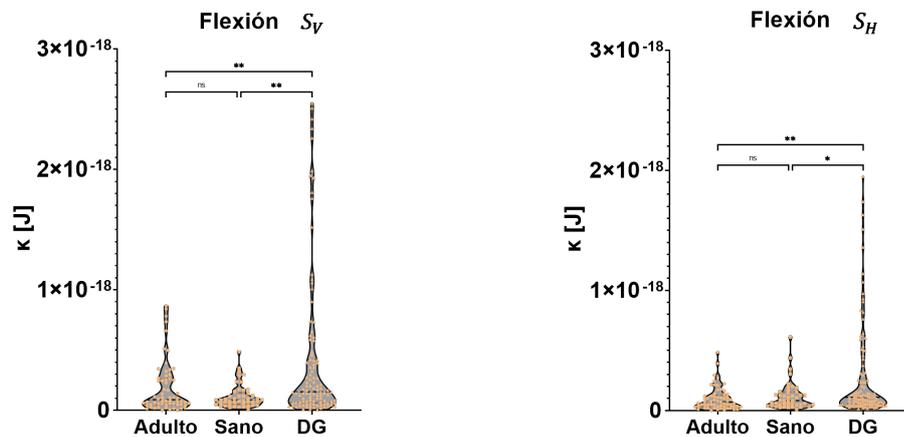
El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P > 0,9999$. La comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor alto de $P = 0,9899$. Además, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' reveló un valor de $P = 0,9903$. Todos estos valores indican que no hay una diferencia significativa entre los grupos existentes para el láser S_V .

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_H mostró un valor alto de $P = 0,6780$, lo que indica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Asimismo, la comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' resultó en un valor alto de $P = 0,3185$, lo que sugiere que tampoco hay una diferencia significativa entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre

el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor de $P = 0,0143$, lo que implica que hay una diferencia mínima entre estos grupos.

4.1.3. Flexión

Los valores de la media para el grupo 'Adulto' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(1,863 \pm 0,3)10^{-19} J$ y $(0,977 \pm 0,1)10^{-19} J$ respectivamente. Para el grupo 'Sano', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(1,157 \pm 0,2)10^{-19} J$ y $(1,196 \pm 0,2)10^{-19} J$. Por último, el valor de la media para el grupo 'Diabético Gestacional' fue de $(4,349 \pm 0,6)10^{-19} J$ para el láser S_V y $(2,841 \pm 0,4)10^{-19} J$ para el láser S_H .



(a) Flexión medida con láser vertical (b) Flexión medida con láser horizontal

Figura 4.1.3: Como se puede observar en las Figuras 4.1.3a y 4.1.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para ambos grupos de estudio utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,9371$, lo que implica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, la comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor relativamente bajo de $P = 0,0085$, lo que sugiere que hay una diferencia entre los grupos. Además, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' reveló un valor bajo de $P = 0,0013$, indicando que hay una diferencia significativa entre estos grupos.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Sano' en relación al láser S_H mostró un valor

alto de $P = 0,9961$, lo que indica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Por otro lado, la comparación entre el grupo 'Adulto' y el grupo 'Diabético Gestacional' resultó en un valor bajo de $P = 0,0014$, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'Diabético Gestacional' arrojó un valor de $P = 0,0213$, lo que implica que hay una pequeña diferencia entre estos grupos.

4.2. Resultados de parámetros entre pacientes con la misma condición

Debido a que pueden existir diferencias entre las condiciones de los pacientes dentro de un mismo grupo debido a características específicas, resulta importante realizar un análisis más detallado del comportamiento de los parámetros microreológicos entre los distintos individuos que se incluyeron en los grupos 'Sano' y 'Diabético Gestacional'. Este análisis nos permitirá identificar posibles variaciones significativas en los resultados obtenidos y comprender mejor la heterogeneidad en los resultados de los pacientes dentro de cada grupo.

4.2.1. Pacientes sanos

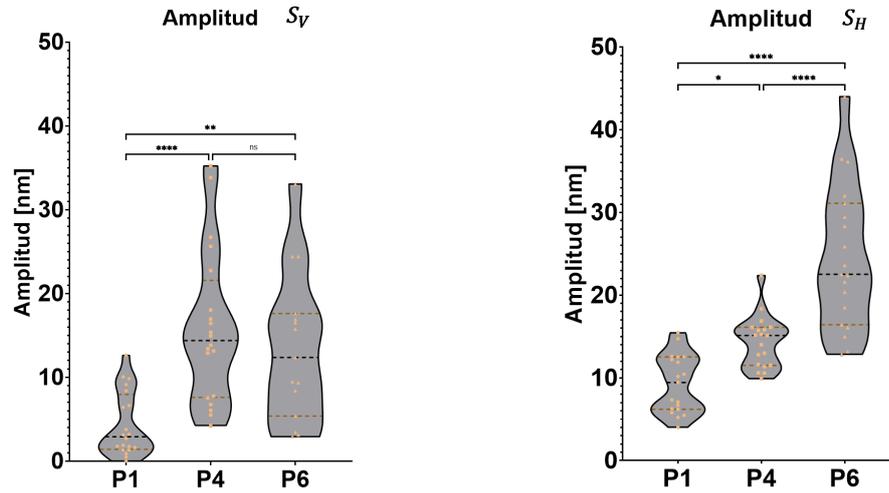
En esta subsección, se presentarán los gráficos y resultados detallados para los diferentes pacientes que conforman el grupo de estudio 'Sano'. Cada gráfico corresponderá al análisis de los parámetros de cada paciente dentro de este grupo, lo que nos permitirá observar las variaciones en los parámetros microreológicos entre ellos. Este análisis de los resultados nos permitirá identificar cualquier patrón interesante o tendencia común dentro del grupo 'Sano'.

El análisis de los pacientes 'Sano' es crucial para establecer una referencia en el comportamiento microreológico en individuos sin diagnóstico de diabetes gestacional. Estos hallazgos proporcionarán una base sólida para comparar y contrastar los resultados obtenidos en el grupo 'Diabético Gestacional'.

4.2.1.1. Amplitud

Los valores de la media para el paciente 'P1' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $4,35 \pm 0,8 \text{ nm}$ y $9,27 \pm 0,8 \text{ nm}$ respectivamente. Para el paciente 'P4', los valores

de la media para ambos haces de láser fueron de $15,86 \pm 2 \text{ nm}$ y $14,33 \pm 0,7 \text{ nm}$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P6' fue de $13,55 \pm 2 \text{ nm}$ para el láser S_V y $24,52 \pm 2 \text{ nm}$ para el láser S_H .



(a) Amplitud medida por láser vertical (b) Amplitud medida por láser horizontal

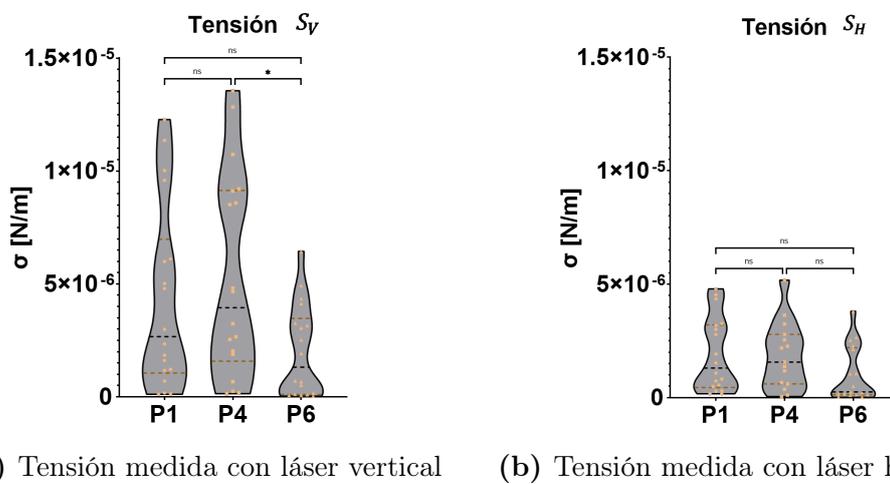
Figura 4.2.1: Como se puede observar en las Figuras 4.2.1a y 4.2.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_V mostró un valor bajo de $P < 0001$, lo que implica que hay una diferencia significativa entre los pacientes. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor de $P = 0,0021$, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los pacientes. Por otro lado, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor de $P = 0,6432$, indicando que no hay una diferencia significativa entre los pacientes.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,0227$, lo que indica que hay una pequeña diferencia entre los pacientes. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor bajo de $P < 0,0001$, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los pacientes. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor de $P < 0,0001$, indicando que hay una diferencia significativa entre los pacientes.

4.2.1.2. Tensión

Los valores de la media para el paciente 'P1' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(4,303 \pm 1)10^{-6} N/m$ y $(1,887 \pm 0,4)10^{-6} N/m$ respectivamente. Para el paciente 'P4', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(5,312 \pm 1)10^{-6} N/m$ y $(1,850 \pm 0,4)10^{-6} N/m$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P6' fue de $(2,010 \pm 0,5)10^{-6} N/m$ para el láser S_V y $(1,011 \pm 0,3)10^{-6} N/m$ para el láser S_H .



(a) Tensión medida con láser vertical (b) Tensión medida con láser horizontal

Figura 4.2.2: Como se puede observar en las Figuras 4.2.2a y 4.2.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

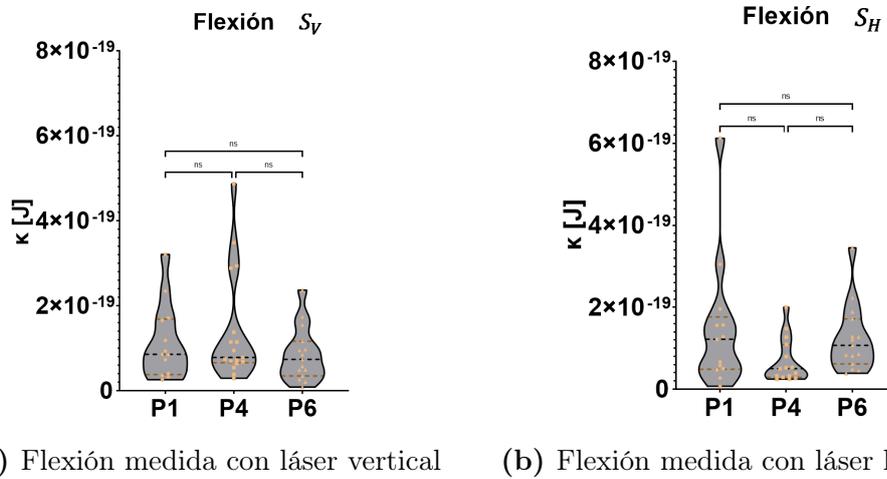
El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,6947$, lo que implica que no hay una diferencia significativa entre los pacientes. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor alto de $P = 0,1621$, lo que sugiere que no hay una diferencia significativa entre los pacientes. Por otro lado, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor de $P = 0,0268^*$, indicando que hay una pequeña diferencia entre los pacientes.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_H mostró un valor alto de $P = 0,9971$. De la misma manera, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor alto de $P = 1828$. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor alto de $P = 0,2391$. Los valores de probabilidad indicados anteriormente reflejan que no existe ninguna diferencia significativa entre los valores de tensión

de los pacientes.

4.2.1.3. Flexión

Los valores de la media para el paciente 'P1' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(1,145 \pm 0,2)10^{-19} J$ y $(1,487 \pm 0,4)10^{-19} J$ respectivamente. Para el paciente 'P4', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(1,432 \pm 0,3)10^{-19} J$ y $(0,687 \pm 0,1)10^{-19} J$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P6' fue de $(0,856 \pm 0,2)10^{-19} J$ para el láser S_V y $(1,239 \pm 0,2)10^{-19} J$ para el láser S_H .



(a) Flexión medida con láser vertical (b) Flexión medida con láser horizontal

Figura 4.2.3: Como se puede observar en las Figuras 4.2.3a y 4.2.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Sano' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,7181$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor alto de $P = 0,7285$. Además, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor alto de $P = 0,2468$. Los valores de probabilidad indicados anteriormente reflejan que no existe ninguna diferencia significativa entre los valores de flexión de los pacientes.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P1' y 'P4' en relación al láser S_H mostró un valor alto de $P = 0,1254$. De la misma manera, la comparación entre los pacientes 'P4' y 'P6' arrojó un valor alto de $P = 8098$. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P1' y 'P6' reveló un valor alto de $P = 0,3348$. Los valores de probabilidad indicados anteriormente reflejan que no existe ninguna diferencia significativa entre los valores de flexión de los pacientes.

4.2.2. Pacientes con diabetes gestacional

En esta subsección, se presentarán los gráficos y resultados detallados para los diferentes pacientes que conforman el grupo de estudio 'Diabético Gestacional'. Cada gráfico corresponderá al análisis de los parámetros de cada paciente dentro de este grupo, lo que nos permitirá observar las variaciones en los parámetros microreológicos entre ellos. Este análisis de los resultados nos permitirá identificar cualquier patrón interesante o tendencia común dentro del grupo 'Diabético Gestacional'.

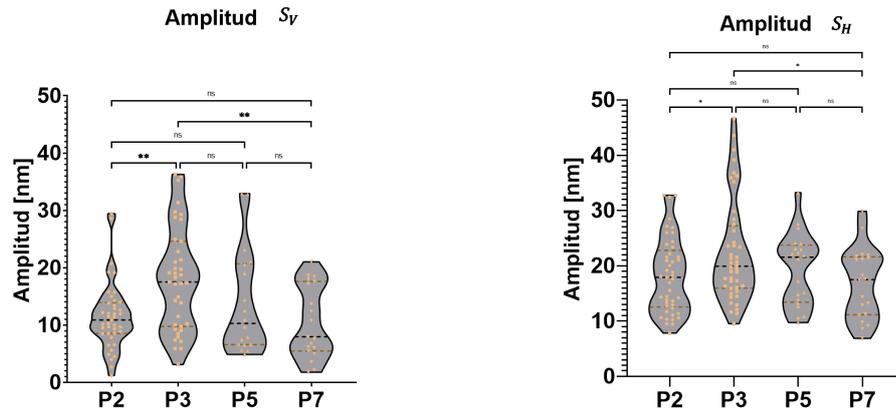
Al igual que en el análisis de los pacientes del grupo 'Sano', este estudio de los pacientes con diabetes gestacional es importante para comprender las características microreológicas específicas asociadas con esta condición médica. La comparación entre los resultados obtenidos en el grupo 'Sano' y 'Diabético Gestacional' nos permitirá identificar cualquier diferencia entre estas dos patologías y establecer posibles relaciones entre ellas.

El análisis del grupo 'Diabético Gestacional' también puede revelar posibles subgrupos con características microreológicas específicas y en conjunto con el análisis del grupo 'Sano' nos entregará una visión más amplia de los parámetros microreológicos en el contexto de la diabetes gestacional.

4.2.2.1. Amplitud

Los valores de la media para el paciente 'P2' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $11,56 \pm 0,9 \text{ nm}$ y $18,21 \pm 1 \text{ nm}$ respectivamente. Para el paciente 'P3', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $18,02 \pm 1 \text{ nm}$ y $22,49 \pm 1 \text{ nm}$. De la misma manera, los valores medidos para el paciente 'P5' por ambos haces fueron de $13,78 \pm 2 \text{ nm}$ y $19,38 \pm 1 \text{ nm}$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P7' fue de $10,55 \pm 1 \text{ nm}$ para el láser S_V y $16,83 \pm 1 \text{ nm}$ para el láser S_H .

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_V mostró un valor de $P = 0,0015$. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor alto de $P = 0,7359$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,9651$. Además, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor alto de $P = 0,2160$. Por el contrario, la comparación entre los pacientes



(a) Amplitud medida con láser vertical (b) Amplitud medida con láser horizontal

Figura 4.2.4: Como se puede observar en las Figuras 4.2.4a y 4.2.4b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

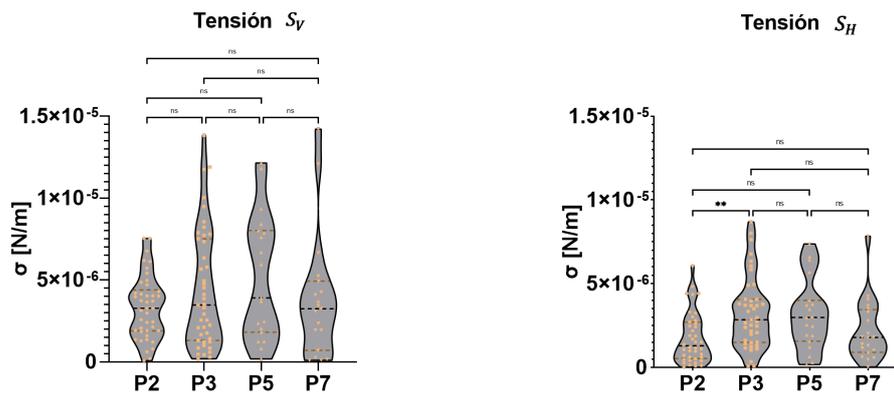
'P3' y 'P7' reveló un valor de $P = 0,0039$. Por último, la comparación entre los pacientes 'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,5785$. Los valores de probabilidad indican que existe una diferencia entre el paciente 'P3' y los pacientes 'P2' y 'P7', excluyendo estos valores, el resto de valores de probabilidad arrojó una diferencia no significativa entre el resto de pacientes del grupo.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,0467$. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor alto de $P = 0,9414$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,9084$. Además, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor alto de $P = 0,4396$. De igual manera, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,0355$. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,7193$. Los valores de probabilidad solo arrojan una pequeña diferencia entre los pacientes 'P2' y 'P3', por el contrario, el resto de valores de probabilidad indican una diferencia no significativa entre el resto de pacientes

4.2.2.2. Tensión

Los valores de la media para el paciente 'P2' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(3,332 \pm 0,3)10^{-6} N/m$ y $(1,769 \pm 0,2)10^{-6} N/m$ respectivamente. Para

el paciente 'P3', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(4,419 \pm 0,6)10^{-6} N/m$ y $(3,268 \pm 0,3)10^{-6} N/m$. De la misma manera, los valores medidos para el paciente 'P5' por ambos haces fueron de $(5,135 \pm 0,9)10^{-6} N/m$ y $(3,146 \pm 0,5)10^{-6} N/m$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P7' fue de $(3,810 \pm 0,9)10^{-6} N/m$ para el láser S_V y $(2,212 \pm 0,4)10^{-6} N/m$ para el láser S_H .



(a) Tensión medida con láser vertical (b) Tensión medida con láser horizontal

Figura 4.2.5: Como se puede observar en las Figuras 4.2.5a y 4.2.5b, se presentan los valores de tensión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

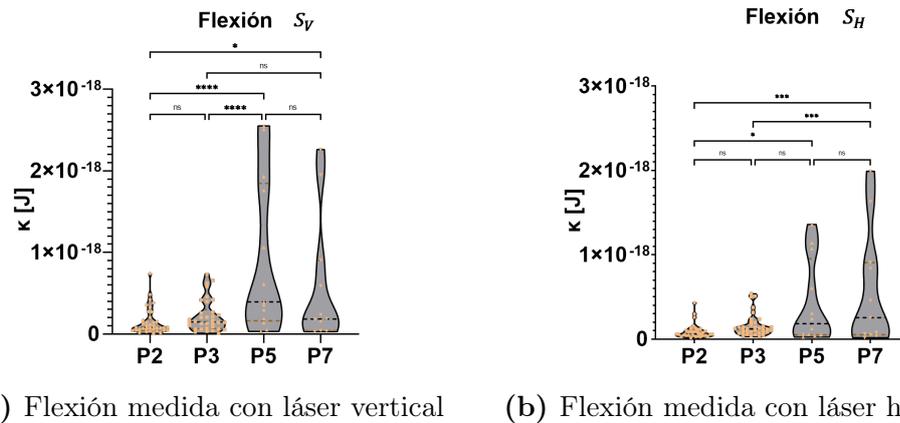
El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,4031$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor alto de $P = 0,1811$. De igual manera, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,9492$. Además, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor alto de $P = 0,8493$. También, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,9006$. Por último, la comparación entre los pacientes 'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,5809$. Estos valores de probabilidad indican que no existe diferencia significativa entre los pacientes del grupo.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,0032$. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor alto de $P = 0,0516$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,8314$. De igual manera, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor alto de $P = 0,9956$. Además, la comparación entre

los pacientes 'P3' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,1817$. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,4221$. Los valores de probabilidad indican que existe una diferencia entre los pacientes 'P2' y 'P3', por otra parte, los valores indican que no existe diferencia significativa entre los pacientes del grupo.

4.2.2.3. Flexión

Los valores de la media para el paciente 'P2' medidos por el láser S_V y S_H fueron de $(1,488 \pm 0,3)10^{-19} J$ y $(0,921 \pm 0,2)10^{-19} J$ respectivamente. Para el paciente 'P3', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(2,224 \pm 0,3)10^{-19} J$ y $(1,585 \pm 0,2)10^{-19} J$. De la misma manera, los valores medidos para el paciente 'P5' por ambos haces fueron de $(9,129 \pm 3)10^{-19} J$ y $(4,224 \pm 1)10^{-19} J$. Por último, el valor de la media para el paciente 'P7' fue de $(5,958 \pm 2)10^{-19} J$ para el láser S_V y $(5,745 \pm 2)10^{-19} J$ para el láser S_H .



(a) Flexión medida con láser vertical (b) Flexión medida con láser horizontal

Figura 4.2.6: Como se puede observar en las Figuras 4.2.6a y 4.2.6b, se presentan los valores de flexión obtenidos para los distintos pacientes que conforman el grupo 'Diabético Gestacional' utilizando los dos haces de láser con diferentes polarizaciones.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,9067$. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor bajo de $P < 0,0001$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor de $P = 0,0285$. Además, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor bajo de $P < 0,0001$. Por otro lado, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,0959$. Por último, la comparación entre los pacientes

'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,3378$. Los valores de probabilidad indican una diferencia significativa entre los pacientes 'P2' y 'P5' además de los pacientes 'P3' y 'P5', también arrojó una diferencia entre los pacientes 'P2' y 'P5', y por el contrario, no existe una diferencia significativa entre el resto de pacientes del grupo.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre los pacientes 'P2' y 'P3' en relación al láser S_H mostró un valor alto de $P = 0,8079$. Sin embargo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P5' arrojó un valor de $P = 0,0108$. Asimismo, la comparación entre los pacientes 'P2' y 'P7' reveló un valor bajo de $P = 0,0001$. Por otro lado, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P5' reveló un valor de $P = 0,0565$. Además, la comparación entre los pacientes 'P3' y 'P7' reveló un valor de $P = 0,0010$. Finalmente, la comparación entre los pacientes 'P5' y 'P7' reveló un valor alto de $P = 0,6390$. Los valores de probabilidad indican que existe una diferencia significativa entre los pacientes 'P2' y 'P7', también existe una diferencia entre los pacientes 'P2' y 'P5' además de los pacientes 'P3' y 'P7', por el contrario, el resto de pacientes no presentan una diferencia significativa entre ellos.

4.3. Resultados de grupos diabético gestacional con distintas condiciones

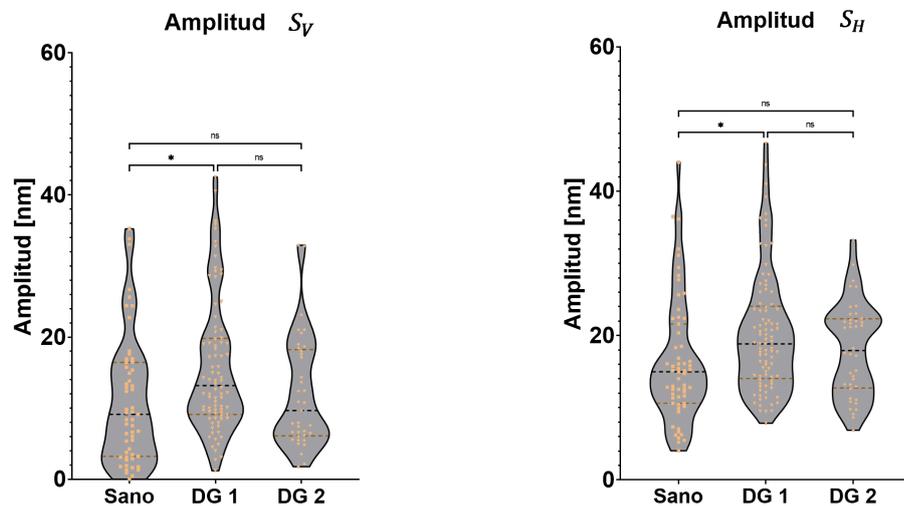
Dada la similitud entre los parámetros microreológicos de los pacientes sanos y la diferencia observada entre los pacientes 'P2' y 'P3' con respecto a los pacientes 'P5' y 'P7', se ha realizado un análisis comparativo entre los pacientes del grupo 'Sano' y los grupos 'DG1' conformado por los pacientes 'P2' y 'P3', y 'DG2' conformado por los pacientes 'P5' y 'P7'. El objetivo de este análisis es explorar las diferencias y similitudes microreológicas entre los grupos diabético gestacional con distintas condiciones.

En esta subsección, se presentarán los gráficos y análisis correspondientes a cada grupo mencionado. Se compararán los parámetros microreológicos de los pacientes 'Sano' con los pacientes de los grupos 'DG1' y 'DG2', lo que nos permitirá identificar posibles variaciones significativas en las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos entre estos grupos diabético gestacional. Además, el análisis comparativo entre estos grupos diabético gestacional nos permitirá evaluar si existen características

microreológicas particulares asociadas a ciertos subgrupos dentro de la condición de diabetes gestacional.

4.3.1. Amplitud

Los valores de la media para el grupo 'Sano' reportados anteriormente para el láser S_V y S_H fueron de $11,04 \pm 1 \text{ nm}$ y $16,40 \pm 1 \text{ nm}$ respectivamente. Para el grupo 'DG 1', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $15,79 \pm 1 \text{ nm}$ y $20,33 \pm 0,9 \text{ nm}$. Por último, el valor de la media para el grupo 'DG 2' fue de $14,21 \pm 1 \text{ nm}$ para el láser S_V y $18,11 \pm 1 \text{ nm}$ para el láser S_H .



(a) Amplitud medida por láser vertical (b) Amplitud medida por láser horizontal

Figura 4.3.1: Como se puede observar en las Figuras 4.3.1a y 4.3.1b, se presentan los valores de amplitud obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.

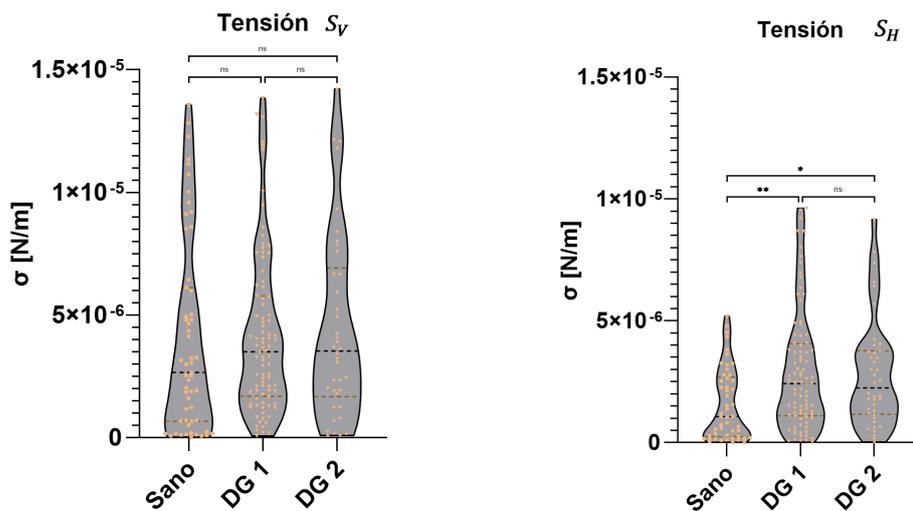
El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_V mostró un valor de $P = 0,0426$, lo que implica que hay una diferencia entre los grupos. Sin embargo, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor alto de $P = 0,9855$, lo que sugiere que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Además, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' reveló un valor alto de $P = 0,3177$, indicando que no hay una diferencia significativa entre estos grupos.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,0290$, lo que indica que hay una diferencia entre los grupos. Sin embargo,

la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' resultó en un valor alto de $P = 0,8344$, lo que sugiere que no hay una diferencia significativa entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor alto de $P = 0,5866$, lo que implica que tampoco hay una diferencia significativa entre estos grupos.

4.3.2. Tensión

Los valores de la media para el grupo 'Sano' reportados anteriormente para el láser S_V y S_H fueron de $(4,008 \pm 0,5)10^{-6} N/m$ y $(1,578 \pm 0,2)10^{-6} N/m$ respectivamente. Para el grupo 'DG 1', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(4,185 \pm 0,4)10^{-6} N/m$ y $(2,944 \pm 0,3)10^{-6} N/m$. Por último, el valor de la media para el grupo 'DG 2' fue de $(4,472 \pm 0,6)10^{-6} N/m$ para el láser S_V y $(2,829 \pm 0,4)10^{-6} N/m$ para el láser S_H .



(a) Tensión medida por láser vertical (b) Tensión medida por láser horizontal

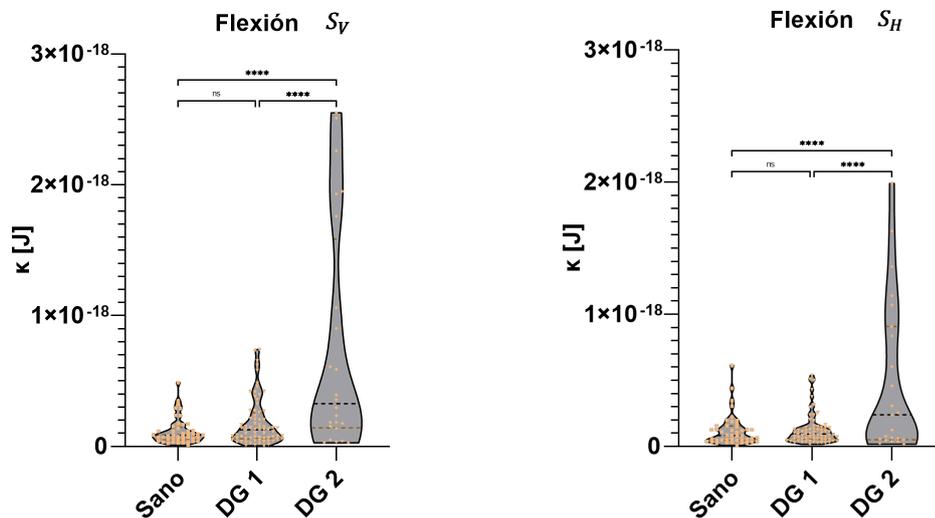
Figura 4.3.2: Como se puede observar en las Figuras 4.3.2a y 4.3.2b, se presentan los valores de tensión obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,9984$. Asimismo, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor alto de $P = 0,9702$. Además, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' reveló un valor alto de $P = 0,9933$. Estos valores de probabilidad indican que no existe una diferencia significativa entre los grupos.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_H mostró un valor de $P = 0,0027^{**}$, lo que indica que hay una diferencia entre los grupos. Asimismo, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' resultó en un valor de $P = 0,0427$, lo que sugiere que hay una diferencia entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor alto de $P = 0,9985$, lo que implica que no hay una diferencia significativa entre estos grupos.

4.3.3. Flexión

Los valores de la media para el grupo 'Sano' reportados anteriormente para el láser S_V y S_H fueron de $(1,157 \pm 0,2)10^{-19}J$ y $(1,196 \pm 0,2)10^{-19}J$ respectivamente. Para el grupo 'DG 1', los valores de la media para ambos haces de láser fueron de $(1,841 \pm 0,2)10^{-19}J$ y $(1,268 \pm 0,1)10^{-19}J$. Por último, el valor de la media para el grupo 'DG 2' fue de $(7,676 \pm 2)10^{-19}J$ para el láser S_V y $(4,951 \pm 1)10^{-19}J$ para el láser S_H .



(a) Flexión medida por láser vertical (b) Flexión medida por láser horizontal

Figura 4.3.3: Como se puede observar en las Figuras 4.3.3a y 4.3.3b, se presentan los valores de flexión obtenidos para ambos láser del estudio para los nuevos grupos analizados.

El análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_V mostró un valor alto de $P = 0,9381$,

lo que implica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor bajo de $P < 0,0001$, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los grupos. Además, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' reveló un valor bajo de $P < 0,0001$, indicando que hay una diferencia significativa entre estos grupos.

Por otro lado, el análisis de valores de probabilidad P para las comparaciones entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 1' en relación al láser S_H mostró un valor alto de $P > 0,9999$, lo que indica que no hay una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, la comparación entre el grupo 'Sano' y el grupo 'DG 2' resultó en un valor bajo de $P < 0,0001$, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre estos grupos. Finalmente, la comparación entre el grupo 'DG 1' y el grupo 'DG 2' arrojó un valor bajo de $P < 0,0001$, lo que implica que hay una diferencia significativa entre estos grupos.

Capítulo 5

Discusión

El comportamiento que presentaron los glóbulos rojos fetales es interesante en varios sentidos. En un comienzo las amplitudes de fluctuaciones muestran algunas diferencias que se hacen un poco más evidentes cuando observamos los valores y gráficos 4.1.1a de este para la señal S_V donde se puede llegar a notar una disminución en las amplitudes de glóbulos rojos fetales en comparación al grupo de control adulto, disminución que es más pequeña con respecto a los glóbulos rojos fetales de madres con diabetes gestacional. Al observar las amplitudes 4.1.1b de la señal S_H , si bien los valores de probabilidad no arrojan una diferencia significativa, se puede observar que la amplitud que disminuye es la proveniente de glóbulos rojos fetal de madres sanas. Con los dos puntos anteriores se puede indicar que la amplitud de los glóbulos rojos fetales de madres con diabetes gestacional tienen un mayor parecido a la amplitud del grupo de control adulto mientras que las amplitudes de los glóbulos rojos de madres sanas tiende a disminuir con respecto a los otros dos grupos.

El primer parámetro microreológico que observamos es el parámetro de tensión, los que observando los valores y gráficos 4.1.2a podemos identificar gracias a los valores de probabilidad que no existe mayor diferencia entre los grupos de estudio. De la misma manera, podemos observar el gráficos 4.1.2b que gracias a los valores de probabilidad que existe una diferencia significativa pequeña cuando comparamos estos parámetros entre los grupos fetales. Tomando estos dos puntos en consideración nos permite indicar que no existen mayores diferencias de este parámetro para los distintos grupos de estudio, sin embargo es interesante observar

que el comportamiento de los valores medios entre los grupos se asemeja un poco a como se comportan los valores medios de los gráficos de amplitud de ambas señales.

El último parámetro que podemos observar es el parámetro microreológico de flexión, del cual podemos observar de los valores y gráfico 4.1.3a de la señal S_V que esta vez si existe una diferencia más notoria entre los distintos grupos de estudio, y gracias a los valores de probabilidad podemos tener respaldo de estos, sobre todo al momento de enfocarnos en el grupo de glóbulos rojos fetales de madres con diabetes gestacional el cual presenta un aumento en comparación de los grupos de control adulto y fetales de madres sanas. Este mismo comportamiento lo podemos encontrar en los valores de flexión en el gráfico 4.1.3b la señal S_H donde existe una diferencia en el grupo fetal de madres con diabetes gestacional.

El comportamiento de los estos parámetros microreológicos nos lleva a que no existe mayor diferencia entre sus valores entre los grupos Adulto y el grupo fetal de madres sanas, sin embargo existe un aumento en el parámetro del grupo fetal de madres con diabetes gestacional. Estudios sobre la viscosidad de la sangre en neonatos [26] concluyeron que existe una disminución en la viscosidad de la sangre neonatal y con ello un aumento en la deformabilidad de los glóbulos rojos neonatales. Debemos recordar que la deformabilidad de los glóbulos rojos se ve afectada por tres parámetros mecánicos distintos los cuales tienen orígenes distintos entre ellos: Tensión, Flexión y Cizalle. Por otro lado, la tanto la técnica original de espectroscopía TRMFS [7] como la técnica mejorada dual-TRMFS [3] solo nos dan acceso a los parámetros de tensión y flexión. Esto nos lleva a que debido al no cambio de los parámetros de tensión y flexión del grupo fetal en comparación al grupo de control adulto, junto con el aumento de deformabilidad de los glóbulos neonatales, deba existir un cambio en el parámetro de cizalle presente variaciones, lo que nos lleva a la red de espectrina del glóbulo debido a que es la principal responsable del módulo mecánica de cizalle. Por último la variación del parámetro de flexión para el grupo fetal de madres con diabetes gestacional implica un cambio en la composición química de la bicapa de los glóbulos rojos, debido a que esta es el principal determinante para el módulo mecánico de flexión.

5.1. Discusión de resultados de paciente

Además de la primera parte del estudio se analizaron los valores de parámetros de los distintos pacientes que conforman los grupos de estudio fetales.

Comenzando con los pacientes fetales de madres sanas, observando los valores y gráfico 4.2.1a podemos notar cambios en las amplitudes de los distintos pacientes fetales sanos, a su vez el comportamiento del gráfico 4.2.1b nos presenta un escenario similar de cambios en las amplitudes de los glóbulos rojos de los pacientes. Estas diferencias podrían atribuirse a los diferentes intervalos de tiempo entre la recolección de muestras fetales y las mediciones de fluctuación de membrana, esto debido a que no existe referencias ni hitos de mediciones de glóbulos rojos fetales en espectroscopía con la técnica original TRMFS o mejorada Dual-TRMFS. Estos nos llevó a que las mediciones posteriores se realizaran en lapsus de tiempo lo mínimo posible para no afectar la calidad de las mediciones, lo que se puede apreciar en el comportamiento de las amplitudes de los pacientes P4 y P6 en comparación al paciente P1. Cabe destacar que esto implica una necesidad de mejorar la logística de las mediciones, esto debido a que las muestras fetales al ser extraídas de la placenta de las madres conlleva a que el flujo de muestras no pueda planearse con anterioridad, haciendo de las llegadas de muestra un problema a la hora de minimizar las mediciones de fluctuación de membrana.

Observando los parámetros de tensión de los pacientes y sus gráficos 4.2.2 se puede notar que no existe mayor diferencia entre los valores de tensión entre los pacientes, salvo la pequeña diferencia significativa existente entre los pacientes P1 y P6 del gráfico 4.2.2a para la señal S_V . Lo anterior se puede respaldar con los valores de probabilidad. Por último, analizando los valores y gráficos 4.2.3 del parámetro de flexión para ambas señales S_V y S_H nos podemos fijar que no existe diferencia significativa entre los pacientes.

Este comportamiento de los parámetros microreológicos entre pacientes del grupo fetal de madres sanas es coherente debido a que mantienen un comportamiento similar bajo las mismas condiciones.

Comenzando el análisis de los parámetros para los pacientes del grupo fetal de madres con diabetes gestacional, los gráficos de amplitud 4.2.4 de los distintos pacientes para ambas señales S_V y S_H nos presentan solo un cambio significativo

en las amplitudes del paciente P3. Mientras que el parámetro de tensión muestra en los gráficos 4.2.5 de ambas señales un comportamiento similar entre las tensiones de los pacientes.

Es en el parámetro de flexión donde se pueden observar cambios más evidentes, los valores y gráfico 4.2.6a nos presentan una variación en el comportamiento de los pacientes P5 y P7 con respecto a los pacientes P2 y P3. Un comportamiento similar se puede observar en el gráfico 4.2.6b en el comportamiento de los mismos pacientes. Este comportamiento es coherente considerando que dentro del grupo fetal de madres con diabetes gestacional, pueden existir distintas afecciones y patologías distintas sumadas a la diabetes gestacional, como lo vendría siendo la macrosomía o la obesidad.

5.2. Discusión de resultados de grupos diabético gestacional distinguidos

Debido a la discusión sobre los parámetros microreológicos de los pacientes de los grupos de estudio fetales se decidió crear dos subgrupos a partir del grupo fetal de madres con diabetes gestacional, denominados DG 1 y DG 2, y compararlos con el grupo fetal de madres sanas. Comenzando por las amplitudes, podemos notar en los valores y gráficos 4.3.1 para ambas señales S_V y S_H que existe una pequeña diferencia significativa entre los grupos sano y DG 1, además de que el comportamiento en estas dos señales es que el grupo DG 1 tenga un leve aumento con respecto a los otros dos grupos.

En el parámetro de tensión podemos observar por un lado que los valores y gráfico 4.3.2a que no existe ningún cambio significativo entre los grupos, sin embargo, se puede observar en los valores y gráfico 4.3.2b que existe un leve aumento de este parámetro para los grupos DG 1 y DG 2 en comparación al grupo sano. Esto sigue un comportamiento coherente al análisis que se hizo en un comienzo de los parámetros de tensión para los grupos iniciales de estudio.

Por último, el parámetro de flexión muestra una clara diferencia al observar los valores y gráficos 4.1.3 para ambas señales S_V y S_H , donde el grupo DG 2 se diferencia significativa con respecto a los grupos sano y DG 1. Cabe notar que esto nos lleva a simplificar el primer análisis de los parámetros de flexión para los

grupos iniciales debido a que el comportamiento del grupo DG 1 no se diferencia del grupo sano, esto implica que la diferencia existente en este parámetro viene influenciado por los pacientes que conforman el grupo DG 2. Esto último nos lleva al análisis de las condiciones de los pacientes del grupo DG 2, en específico, los pacientes de este grupo resultaron en neonatos macrosómicos, condición que está caracterizada por un alto índice de tamaño y peso de los neonatos. Debido a esta separación de los pacientes del grupo DG, los subgrupos DG 1 y DG 2 están conformados por una cantidad demasiado pequeña de pacientes y glóbulos rojos medidos, debido a esto el análisis de estos subgrupos se hacen demasiado pequeñas para concluir, sin embargo despierta un evidente cuestionamiento sobre otras condiciones relacionadas con la diabetes gestacional como lo es el caso de la macrosomía.

Capítulo 6

Conclusión

En este estudio se investigó la microreología de glóbulos rojos fetales y de adultos, centrándonos en los parámetros de tensión y flexión. Los resultados revelaron que no hubo cambios significativos en estos parámetros entre los glóbulos rojos fetales y adultos, lo que sugiere que la deformación de los glóbulos rojos fetales no se originó en estos parámetros microreológicos.

La prevalencia de diabetes gestacional en el embarazo destaca la importancia de examinar su efecto sobre los fetos. Se observó que la condición de macrosomía, ligada a la diabetes gestacional, tuvo un gran impacto en el parámetro microreológico de flexión de los glóbulos rojos. Por tanto, es esencial ampliar la investigación sobre el impacto de la macrosomía y otras condiciones relacionadas con la diabetes gestacional en estos parámetros.

Todas las mediciones se realizaron en soluciones de PBS en condiciones uniformes. Estos resultados sugieren la necesidad de estudios adicionales sobre la importancia del medio en el que se encuentran los glóbulos rojos, incluida la posibilidad de que puedan recuperar sus características al ser trasladados entre distintos medios.

Finalmente, el descubrimiento de diferencias claras en neonatos nacidos con macrosomía proporciona una comprensión más profunda de esta condición y su relación con el funcionamiento de la membrana celular, que se ve claramente alterado.

Bibliografía

- [1] Wang Y. Yang P. Yan Z. Liu Z. Ma Q. Zhang Z. Wang Y. & Su Y. The Relationship between Erythrocytes and Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2021:1–9, 2021. doi: 10.1155/2021/6656062.
- [2] Kim S. Y. England J. L. Sharma J. A. & Njoroge T. Gestational Diabetes Mellitus and Risk of Childhood Overweight and Obesity in Offspring: A Systematic Review. *Experimental Diabetes Research*, 2011:1–9, 2011. doi: 10.1155/2011/541308.
- [3] Tapia J. A. Vera N. Aguilar J. González M. M. Sánchez S. A. Coelho P. Saavedra C. & Staforelli J. P. Correlated flickering of erythrocytes membrane observed with dual time resolved membrane fluctuation spectroscopy under different D-glucose concentrations. *Scientific Reports*, 11, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-82018-5.
- [4] Robert Modzelewski, Magdalena Maria Stefanowicz-Rutkowska, Wojciech Matuszewski, and Elżbieta Maria Bandurska-Stankiewicz. Gestational diabetes mellitus—recent literature review. *Journal of Clinical Medicine*, 11 (19):5736, 2022. doi: 10.3390/jcm11195736.
- [5] Jasmine Plows, Joanna Stanley, Philip Baker, Clare Reynolds, and Mark Vickers. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11):3342, 2018. doi: 10.3390/ijms19113342.
- [6] Yuping Wang and Shuang Zhao. *Placental Blood Circulation*, chapter 2, pages 3–12. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [7] Betz T. & Sykes C. Time resolved membrane fluctuation. *Soft Matter*, 8: 5317–5326, 2012. doi: 10.1039/c2sm00001f.
- [8] Jeffrey R. Moffitt, Yann R. Chemla, David Izhaky, and Carlos Bustamante. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24):9006–9011, 2006. doi: 10.1073/pnas.0603342103.
- [9] M. Mutz and W. Helfrich. Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the fourier analysis of contour sections. *Journal de Physique*, 51(10):991–1001, 1990. doi: 10.1051/jphys:019900051010099100.
- [10] E. F. Nichols and G. F. Hull. A preliminary communication on the pressure

- of heat and light radiation. *Phys. Rev. (Series I)*, 13:307–320, Nov 1901. doi: 10.1103/PhysRevSeriesI.13.307. URL <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevSeriesI.13.307>.
- [11] Peter Lebedew. Untersuchungen über die druckkräfte des liches. *Annalen der Physik*, 311(11):433–458, 1901. doi: 10.1002/andp.19013111102.
- [12] Timo A. Nieminen, Nathaniel du Preez-Wilkinson, Alexander B. Stilgoe, Vincent L.Y. Loke, Ann A.M. Bui, and Halina Rubinsztein-Dunlop. Optical tweezers: Theory and modelling. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 146:59–80, 2014. ISSN 0022-4073. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2014.04.003>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022407314001587>. Electromagnetic and Light Scattering by Nonspherical Particles XIV.
- [13] Giuseppe Pesce, Philip H. Jones, Onofrio M. Maragò, and Giovanni Volpe. Optical tweezers: Theory and practice. *The European Physical Journal Plus*, 135(12), 2020. doi: 10.1140/epjp/s13360-020-00843-5.
- [14] Yasuhiro Harada and Toshimitsu Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere in the rayleigh scattering regime. *Optics Communications*, 124(5):529–541, 1996. ISSN 0030-4018. doi: [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(95\)00753-9](https://doi.org/10.1016/0030-4018(95)00753-9). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0030401895007539>.
- [15] Yasuhiro Harada and Toshimitsu Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere in the rayleigh scattering regime. *Optics Communications*, 124(5):529–541, 1996. ISSN 0030-4018. doi: [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(95\)00753-9](https://doi.org/10.1016/0030-4018(95)00753-9). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0030401895007539>.
- [16] Pretini V. Koenen M. H. Kaestner L. Fens M. H. A. M. Schiffelers R. M. Bartels M. & Van Wijk R. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*, 10, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.00945.
- [17] Simmonds M. J. Meiselman H. J. & Baskurt O. K. Blood rheology and aging. *Journal of Geriatric Cardiology*, 2013. doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.03.010.
- [18] Kenneth Kaushansky. *Williams hematology*. McGraw-Hill, New York, 2010. ISBN 9780071621441.
- [19] Kim Y. Kim K. & Park Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances. *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*, 2012. doi: 10.5772/50698.
- [20] Saša Svetina and B Zeks. Bilayer couple hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis. *Biomed. Biochim. Acta*, 42(86): 1983, 1983.
- [21] 2023. URL <https://datos.bancomundial.org/indicador/SH.STA.DIAB.ZS?end=2021&start=2000&view=chart>.

- [22] Mohamad S. AlSalhi, Sandhanasamy Devanesan, Khalid E. AlZahrani, Mashael AlShebly, Fatima Al-Qahtani, Karim Farhat, and Vadivel Masilamani. Impact of diabetes mellitus on human erythrocytes: Atomic force microscopy and spectral investigations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11):2368, 2018. doi: 10.3390/ijerph15112368.
- [23] Elie Nader, Sarah Skinner, Marc Romana, Romain Fort, Nathalie Lemonne, Nicolas Guillot, Alexandra Gauthier, Sophie Antoine-Jonville, Céline Renoux, Marie-Dominique Hardy-Dessources, and et al. Blood rheology: Key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise. *Frontiers in Physiology*, 10, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.01329.
- [24] 2022. URL <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/gestational-diabetes/symptoms-causes/syc-20355339>.
- [25] Laboratorio de Genomica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP. Preparación de phosphate buffered saline (pbs), Apr 2008. URL http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_PBS_SPA.pdf.
- [26] Kuss N. Bauknecht E. Felbinger C. Gehm J. Gehm L. Pöschl J. & Ruef P. Determination of whole blood and plasma viscosity in term neonates by flow curve analysis with the LS300 viscometer. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 63(1):3–14, 2016. doi: 10.3233/ch-152008.