

S. 147845

# INTRODUCCIÓN A LA FÍSICA BIOLÓGICA

3

*Leopoldo García-Colín Scherer*

*Leonardo Dagdug*

*Michel Picquart*

*Edgar Vázquez*

*Coordinadores*



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



EL COLEGIO NACIONAL  
México, 2010

QH505  
I57

Introducción a la física biológica / Leopoldo García-Colín Scherer, Leonardo Dagdug, Michel Picquart, Edgar Vázquez, coordinadores -- México : El Colegio Nacional, 2010  
3 v.  
ISBN: 978-607-7630-77-7  
I. Biofísica. I. García-Colín Scherer, Leopoldo. ed. II. Dagdug, Leonardo, ed. III. Picquart, Michel, ed. IV. Vázquez, Edgar, ed.

QH 505  
I5.97  
V.3

W 281807

Coordinación Editorial: Rosa Campos de la Rosa

Primera edición: 2010

D. R. © 2010. EL COLEGIO NACIONAL  
Luis González Obregón núm. 23, Centro Histórico  
C. P. 06020, México, D. F.  
Teléfonos 57 89 43 30, 57 02 18 78; Fax 57 02 17 79

ISBN: 978-607-7630-77-7

Impreso y hecho en México  
*Printed and made in Mexico*

Correo electrónico: [colnal@mail.internet.com.mx](mailto:colnal@mail.internet.com.mx)  
Página: <http://www.colegionacional.org.mx>



COORDINACIÓN DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

## CONTENIDO

Prólogo .....	ix
CAPÍTULO 17	
Regulación de la expresión genética durante el desarrollo y la diferenciación celular	
Mario Zurita .....	825
CAPÍTULO 18	
Morfogénesis	
Rafael A. Barrio, Damián Hernández Herrán .....	847
CAPÍTULO 19	
Corazón: aspectos de su funcionamiento y propiedades físicas	
Oscar Infante .....	889
CAPÍTULO 20	
Análisis fractal de fluctuaciones cardíacas	
Juan Carlos Echeverría Arjonilla, José Álvarez Ramírez, Ramón González Camarena, Miguel Ángel Peña Castillo, Eduardo Rodríguez Flores .....	943
CAPÍTULO 21	
Aspectos físicos y análisis cuantitativo del sonido respiratorio	
Sonia Charleston Villalobos, Tomás Aljama Corrales, Ramón González Camarena .....	973
CAPÍTULO 22	
Redes complejas en sistemas biológicos	
Octavio Miramontes Vidal .....	1075



CAPÍTULO 23

Biomateriales

Juan Morales Corona, Roberto Olayo ..... 1097

CAPÍTULO 24

Técnicas experimentales en física biológica

Michel Picquart ..... 1163

## PRÓLOGO

Ahora que se ha empezado a estudiar con seriedad a la naturaleza nos damos cuenta de la amplitud de las preguntas, de la distancia a recoger para tratar de contestarlas. El gran peligro para la humanidad no es el desarrollo del conocimiento, es la ignorancia.

François Jacob

Probablemente la primera evidencia que se tiene de la relación entre la física y la biología inició con los experimentos del italiano Luigi Galvani cuando, en 1780, ideó y construyó una máquina electrostática formada por dos placas de metales y fluidos extraídos de una rana. Más adelante él y su ayudante Giovanni Aldini demostraron que, aplicando una pequeña corriente eléctrica a la médula espinal de una rana descerebrada, se producían contracciones musculares en los miembros de la misma. Estas descargas podían lograr que las ancas, incluso separadas del cuerpo, se contrajeran de la misma forma que cuando el animal estaba vivo. A partir de ese momento, los sistemas biológicos se han estudiado con mucho interés desde el punto de vista físico.

A mediados del siglo XIX surgieron dos grandes teorías sobre la evolución de los sistemas naturales en el tiempo. Por una parte la teoría cinética de los gases (creada por Ludwig Boltzmann) contempla una naturaleza en constante degradación hacia la muerte, en forma de desorden.

Esta visión de la evolución de los sistemas naturales, inspirada por la segunda ley de la termodinámica, contrasta considerablemente con la segunda teoría basada en el paradigma asociado con los sistemas biológicos, crecientemente complejos, especializados y organizados a lo largo del tiempo, como lo describe Charles Darwin.

Además la fenomenología de muchos sistemas naturales muestra que existen estructuras coherentes fuera del equilibrio termodinámico como las células de convección, las reacciones químicas autocatalíticas y la vida misma. Los sistemas vivos exhiben un alejamiento del desorden y en equilibrio, lo que se traduce en estructuras altamente organizadas que utilizan grandes cantidades de energía para mantenerse.

Boltzmann reconoció la contradicción aparente entre la muerte térmica del universo y la existencia de sistemas vivos que crecen, adquieren complejidad y evolucionan. Postuló que el gradiente de energía solar impulsa la vida y todos sus procesos (Boltzmann, L., *The second law of thermodynamics*, 1886, reimpreso en *Ludwig Boltzmann, theoretical physics and philosophical problems*, B. McGuinness y D. Reidel, editores, Nueva York, 1974).

Las ideas de Boltzmann y posteriormente las de Max Delbrück, fueron las principales fuentes intelectuales de motivación de *¿Qué es la vida?*, el libro de Erwin Schrödinger en el que intentó agrupar los procesos fundamentales de la biología, la física y la química. Schrödinger observó que ciertos sistemas, en particular los vivos, parecían desafiar la segunda ley de la termodinámica clásica. Sin embargo, reconoció que los sistemas vivos no son cajas cerradas adiabáticas, sino sistemas abiertos capaces de interactuar por medio de materia y energía con su entorno. También recalcó que un organismo se mantiene vivo en su estado altamente organizado a base

de importar energía externa de alta calidad y degradarla para sostener su compleja estructura y organización. Este trabajo se convirtió en uno de los libros más influyentes en la historia de la ciencia y jugó un papel primordial entre los fundadores de la biología molecular. *¿Qué es la vida?* hizo época no porque ofreciese un enfoque útil para la comprensión del fenómeno en sí, sino porque inspiró nuevas líneas de pensamiento, entre ellas la física biológica.

La creación de la biología molecular es atribuida a físicos que formaron vías experimentales radicalmente nuevas. Nació de decisiones individuales tomadas por un pequeño número de científicos entre el final de los años treinta y principios de los cincuenta del siglo xx. Los campos de trabajo de estos investigadores eran muy diversos: biología, física, medicina, microbiología, química, cristalografía, etcétera. En el centro del estudio del mundo viviente se encontraban las preguntas planteadas por la genética; podríamos decir que inventaron una nueva biología. La historia de la biología molecular puede servir de modelo para entender cómo se estructura una investigación original, independientemente de las aplicaciones eventuales que de ella se desprendan.

Primero fue Max Delbrück, físico teórico de la escuela de Gotinga quien, inspirado por el principio de complementariedad de Niels Bohr, decidió investigar los detalles moleculares de la herencia. Posteriormente Linus Pauling, físico de la escuela de Arnold Sommerfeld, persiguió una comprensión más profunda de la naturaleza de las proteínas, enfocándose en elucidar los ejecutores microscópicos de las células vivas o las moléculas del fenotipo. En este proceso descubrió elementos estructurales esenciales, tendiendo así un puente entre la química y la biología, idea que influyó en Francis Crick

y James Watson para llevarlos a descubrir la estructura de doble hélice del ADN en 1953 y, como consecuencia Crick, dedujo el modo en el que la información genética podía almacenarse y transferirse de generación en generación, enunciando el denominado "dogma central de la biología molecular": ADN → ARN → proteína, que hoy es incluido en los flujos de la información genética de los seres vivos.

En esa misma década Max Perutz, quien se encontraba trabajando en el Laboratorio Cavendish bajo la dirección de Lawrence Bragg aplicando la técnica de difracción de rayos X a una proteína, encontró la estructura de la hemoglobina, todo un reto experimental para la época. De esta forma y muchos años después de haber iniciado su proeza explicó por primera vez, junto con John Kendrew, el diseño detallado de una máquina biomolecular. Es importante mencionar que tanto Kendrew y Perutz como Watson y Crick recibieron el Premio Nobel en el mismo año (aunque en áreas diferentes) por dilucidar las moléculas del fenotipo y genotipo, respectivamente.

En la actualidad tenemos un amplio conocimiento del diseño molecular de las células, incluyendo los detalles de los procesos moleculares que se encuentran en la base de las funciones celulares o del metabolismo. Por una parte, tenemos idea de las repercusiones que producen tanto las perturbaciones, como las averías de tales funciones, lo que se expresa en los más diversos síndromes clínicos; y por otra, el modo en que algunos organismos como virus, bacterias, protozoarios y hongos parásitos modifican el ciclo vital de otros organismos. De hecho, hemos podido ir aún más lejos en el entendimiento de la regularización de estos procesos vitales, hasta el punto de alterar permanentemente su programa genético y construir clones, híbridos, transgénicos, etcétera.

Uno de los ejemplos más claros del éxito de la fusión entre la física y la bioquímica lo proporciona la industria farmacéutica moderna en la que se explota el conocimiento detallado de la biología molecular y de los procesos de difusión, en sistemas confinados para el diseño y liberación controlada de drogas.

En los últimos veinte años en México la física biológica ha tomado un auge de dimensiones impredecibles. Es debido al gran interés en el estudio de esta disciplina de vanguardia que se consideró necesaria la edición de un libro de texto en español. La tarea se simplificó al existir investigadores de altísimo nivel dispuestos a contribuir con su conocimiento para realizarlo. Afortunadamente estos elementos se conjuntaron adecuadamente en tiempo y forma para dar lugar a esta obra.

El contenido de los tres tomos que la comprenden pretende abarcar un amplio espectro de los temas de física biológica que se desarrollan en diversas instituciones de nuestro país. Los temas van desde la termodinámica de sistemas biológicos hasta la evolución, pasando por las máquinas moleculares, el análisis no lineal de series de tiempo, la cristalografía, el código genético, la estructura y función del ADN y de las proteínas. También se incluye información sobre las interacciones entre las biomoléculas, la difusión, etcétera. Los coordinadores estamos seguros que este texto será de gran utilidad para cualquier lector interesado en alguna de sus ramas o de la biofísica en general. Esperamos que estos tres tomos contribuyan a consolidar los cimientos del desarrollo de las biociencias en México. La variedad y profundidad de los capítulos constituyen una clara muestra del grado de experiencia de los investigadores participantes en los diversos temas y son la justificación de su publicación.

Los coordinadores y autores participantes en este proyecto agradecen profundamente a Aline y Cristina Ortiz-Herrera su ayuda en la formación, redacción, edición, dibujo y diseño, tanto del texto, como de las ilustraciones de esta obra. Asimismo expresamos nuestro agradecimiento a El Colegio Nacional por el apoyo brindado para hacer posible su publicación.

LOS COORDINADORES

*México, D. F., Mayo de 2010*

**CAPÍTULO 17**  
**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA**  
**DURANTE EL DESARROLLO**  
**Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR**

MARIO ZURITA\*

*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular  
Instituto de Biotecnología, UNAM*

**1. INTRODUCCIÓN**

Una de las preguntas más apasionantes que se han formulado los biólogos del desarrollo y los biólogos moleculares es cómo a partir de un cigoto (huevo fecundado), se desarrolla un proceso de división y diferenciación celular a partir de la expresión diferencial de genes, que permite la generación de diferentes tipos celulares. Para empezar y visualizar la magnitud del proceso, debemos partir de que después de la fecundación, los pronúcleos materno y paterno dan origen a una célula diploide (en general, dos pares de cada uno de los cromosomas somáticos y dos pares de cromosomas sexuales), que contienen la información genética necesaria para dar origen a los diferentes procesos de diferenciación celular y morfogénesis de un nuevo individuo. Es decir, a partir del mismo genoma se van a producir diferentes eventos de regulación que van a hacer que en un tipo celular se expresen unos

\* marioz@ibt.unam.mx

genes y en otro tipo celular se expresen otros, pero siempre manteniendo en cada tipo celular la misma información almacenada en el DNA.

En este capítulo nos enfocaremos en la regulación de la expresión genética durante el desarrollo en algunos modelos animales, que es donde se conoce mejor este proceso.

## 2. LA MAQUINARIA BASAL DE TRANSCRIPCIÓN EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTES

Antes de entrar de lleno a los procesos moleculares que regulan la expresión de genes durante el desarrollo y la diferenciación celular, tenemos que dar una mirada a lo que sabemos de cómo se expresan los genes en la célula eucariote. En los eucariotes (desde la levadura hasta los mamíferos) existen tres tipos de RNA polimerasas que se encargan de expresar diferentes tipos de genes. La RNA polimerasa I transcribe los genes que codifican para el RNA ribosomal 18S, 5.8S y 28S. Estos genes son constitutivos y su mecanismo de regulación está sometido al ciclo celular y al estado metabólico en que se encuentre la célula. Por otro lado la RNA polimerasa III transcribe los genes que codifican para RNAs de transferencia y el RNA ribosomal 5S y también son expresados de manera constitutiva. Por otro lado la RNA polimerasa II transcribe los genes que codifican para RNA mensajeros (que codifican para proteínas) y algunos RNAs precursores de microRNAs y RNAs involucrados en el procesamiento de RNA. Recientemente se descubrió un tipo diferente de RNA polimerasa en plantas, nombrada como RNA polimerasa IV, la cual transcribe precursores de miRNAs. Dada la naturaleza de los genes que transcribe, la RNA pol II está sujeta a mecanismos de regulación altamente complejos que,

casi podríamos decir, son exclusivos de cada gen en particular. Para entender cómo está regulada la expresión de genes que codifican para mRNAs, tenemos que describir cuáles son los mecanismos fundamentales que se requieren para que ésta ocurra.

Las investigaciones para la identificación y caracterización de los componentes requeridos para la transcripción por la RNA pol II ha generado una visión detallada de cómo ocurre este proceso, aunque aún está lejos de terminar. A continuación se describe de manera general la función de algunos de los factores más relevantes que participan en la transcripción mediada por la RNA pol II.

En eucariotes muchos factores están involucrados en la transcripción por RNA pol II. La síntesis del mRNA involucra el ensamblaje de complejos multiproteicos responsable de la formación del complejo de pre-inicio (CPI). Los principales factores involucrados en la formación del CPI son TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH, la RNA pol II y el complejo mediador (figura 1). Estos factores son requeridos para iniciar la transcripción al menos a partir de promotores que contiene la caja TATA alrededor de -30 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción [1]. Un resumen de los componentes del CPI y la composición de sus diferentes subunidades se presenta en la tabla 1. La función de cada uno de los componentes del CPI ha sido determinada en experimentos *in vitro* en los que el mismo se ha reconstituido. TFIIA funciona para estabilizar la unión al promotor de TFIID y también puede actuar como activador o como co-represor, dependiendo del promotor. TFIIB ayuda para determinar el sitio de inicio de la transcripción, estabiliza la interacción de la TATA-binding-protein (TBP) con el DNA y también ayuda al reclutamiento de TFIIE. TFIID contiene a la TBP y al menos 12 proteínas que se unen a la TBP (TAFs de la

### Complejo de pre-inicio de la transcripción

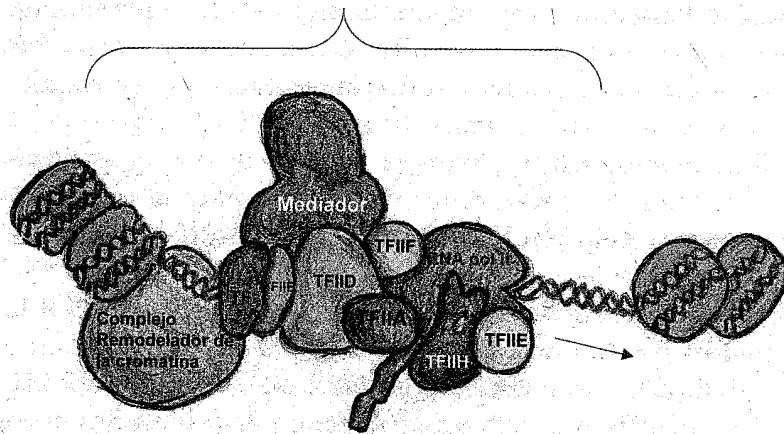


Figura. 1. Representación del complejo de pre-inicio de la transcripción por RNA polimerasa II.

abreviación del inglés *TBP-associated factors*), aunque en células humanas han sido descritas alrededor de 20 TAFs. Estos factores se unen de manera colectiva al DNA cerca del sitio de inicio de la transcripción y actúan como plataforma para la incorporación de the TFIIA y TFIIB. Algunas TAF's pueden ser encontradas en complejos diferentes a TFIID al igual que la TBP que puede estar presente en complejos involucrados en la transcripción por RNA pol I y RNA pol III como S11 y TFIIB respectivamente. Además TFIID puede funcionar como co-activador transcripcional y presenta diversas actividades enzimáticas como cinasa, acetil-transferasa de histonas y ubiquitin ligasa. Todas estas actividades son necesarias en algún punto en los diferentes promotores para la iniciación de la transcripción. Por otro lado el factor TFIIE estabiliza el complejo abierto, recluta al factor TFIIH y facilita la formación de un complejo de pre-inicio que permite la liberación del promotor por la RNA pol II para iniciar la síntesis de RNA

[1, 2]. TFIIF funciona en concierto con factores basales para reclutar a la RNA pol II y también es importante en la formación del complejo abierto. TFIIF participa con TFIIB en la determinación del sitio de inicio de la transcripción y facilita la elongación de la RNA pol II. TFIIH es un complejo multifuncional que también participa en la reparación del DNA y en el control del ciclo celular. Durante la transcripción, TFIIH facilita la formación del complejo abierto por la acción de dos helicasas dependientes de ATP y la subunidad Cdk7 fosforila el dominio carboxilo terminal de la subunidad grande de la RNA pol II, permitiendo a la polimerasa escapar del promotor. En la tabla I también se enumeran los diferentes factores basales de transcripción y su función para el inicio de la transcripción por RNA pol II.

### 3. LA HERENCIA MATERNA

Un evento fundamental en el comienzo de la regulación de la expresión genética en el comienzo del desarrollo de varios organismos es la herencia materna. Durante el proceso de oogenesis, tanto en *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, peces, anfibios, aves y en casi todos los mamíferos, se expresa una serie de genes cuyos productos serán utilizados en el embrión temprano, esenciales para el inicio del desarrollo. Estos genes son conocidos como genes maternos. En otras palabras, durante la formación del oocyto se expresan genes cuya función está encaminada a iniciar el desarrollo de la siguiente generación. Pueden pasar días, semanas, meses o incluso años (en algunos anfibios) antes de que ocurra la fecundación y el comienzo de un nuevo organismo. El organismo en el que se conoce mejor el cómo la herencia materna juega un papel

Tabla 1

Factor	Número de subunidades	Funciones
TFIIA	3	Estabiliza al complejo TATA-TBP co-activador y anti-represor.
TIIB	1	Se une a la TBP; Selecciona el sitio de inicio de la transcripción; Se une a la RNA polimerasa.
TFIID	TBP + TAFs (alrededor de 15 subunidades)	Factor de unión al promotor; Reconoce elementos en el promotor; tiene actividad de acetil transferasa y ubiquitin F ligasa.
TFIIE	2	Formación del complejo de iniciación; Interacciona con TFIIF. Facilita el escape de la RNA pol II del promotor.
TFIIF	10	Permite el escape de la RNA pol II del promotor y la elongación; tiene actividad de kinasa, ubiquitin ligasa, ATP-asa, helicasa.
RNA polimerasa II	12	Iniciación de la transcripción, elongación y terminación.
Mediador	12 - 24	Modulador negativo y positivo. Transluce señales de diferentes factores transcripcionales al complejo de pre-inicio.

fundamental es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que como vamos a ver en este capítulo, es el modelo mejor estudiado a nivel de biología del desarrollo.

En la mosca, la oogenesis se da de tal manera que la célula que va a dar origen al huevo, está conectada por una serie de células nodrizas por medio de puentes citoplasmáticos, formando un sinsicio. En estas células nodrizas se expresa una serie de genes cuyos productos, ya sea como RNA o como proteína son transportados a la célula que se diferenciará a ser el oocyto. Las proteínas y los RNA's son almacenados en esta célula y una vez que ha ocurrido la fecundación y el huevo es ovopositado las proteínas se ponen en acción en diferentes momentos del desarrollo temprano. La traducción de diversos RNA mensajeros de origen materno, se efectúa también en diferentes momentos del desarrollo temprano y sus productos proteicos son también utilizados de manera específica. Todo esto se da de una forma altamente coordinada y regulada por los mismos productos génicos de origen materno. En algunos casos, como en la mosca de la fruta, en el nemátodo *C. elegans* y en anfibios, la distribución de algunos transcritos y proteínas es diferente a lo largo de la célula inicial de la que se generará el embrión. Por ejemplo, en el embrión temprano de *Drosophila* algunos transcritos se acumulan en la región más anterior y otros en la parte posterior del embrión que, en este momento, es una gran célula con un solo núcleo diploide. Durante las primeras dos horas de desarrollo, el embrión de la mosca sufre 14 divisiones nucleares sin que haya división celular. Esto hace que el embrión sea también un sinsicio en el que muchos núcleos comparten un gran citoplasma. Durante este proceso, los RNA mensajeros localizados en diferentes regiones, son traducidos y las proteínas se difunden



por este gran citoplasma, a partir del sitio donde se tradujeron formando gradientes a lo largo del embrión [2, 3]. De manera sorprendente, los mRNAs localizados en la parte anterior del embrión, codifican para proteínas que determinan las características anteriores del organismo. Así mismo, los RNAs y/o proteínas localizados en la parte posterior, determinan la formación de las estructuras posteriores del organismo y de la línea germinal. Algo equivalente ocurre con la determinación dorsal y ventral [3]. Todos estos RNAs y proteínas de origen materno, desencadenan una cascada de regulación que determina la expresión de otros genes para iniciar el establecimiento de los diferentes tipos celulares y tejidos que eventualmente formarán a una nueva mosca (ver más adelante). En general la mayoría de los genes maternos codifican para factores transcripcionales que de manera directa regulan la expresión de otros genes, que también son factores transcripcionales que regulan a más genes.

#### 4. DEL SILENCIAMIENTO A LA ACTIVACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN CIGÓTICA EN EL EMBRIÓN TEMPRANO

Durante la oogenénesis ocurre una importante transición a nivel de la expresión genética. La cromatina activa en transcripción cambia a un estado de cromatina silenciada o reprimida que impide la expresión de prácticamente todo el genoma durante la meiosis. Esto implica que la cromatina es modificada y que los factores de activación de la transcripción son excluidos de los compactos cromosomas meióticos. Este evento es aún más dramático en la espermatogénesis. Sólo después de la fertilización a diferentes estadios en el desarrollo, dependiendo de la

especie, la transcripción es activada de nuevo, pero ahora en células no diferenciadas y totipotenciales. Por ejemplo en el ratón la transcripción es activada en el estadio de dos pronúcleos y en *Drosophila* después de la treceava división mitótica.

Los factores maternos depositados en el huevo del embrión en animales comprenden todos los factores necesarios, incluidos proteínas y RNAs que permiten la transición de un genoma silencioso a un genoma activo en transcripción. Por ejemplo en el huevo de *Drosophila* se puede encontrar aproximadamente el 50% de los transcritos codificados en el genoma de la mosca y en el caso de mamíferos, alrededor del 40% [3, 4].

En *Drosophila*, después de la fusión de los dos pronúcleos, el embrión tiene 13 divisiones nucleares sincrónicas sin que ocurra división celular. Esto hace que se forme un sinsicio en el que los núcleos comparten un gran citoplasma. Durante las primeras 8 divisiones, sólo las fases S y M del ciclo celular están presentes en el embrión, no ocurre transcripción. Después del ciclo replicativo 8 hay una pequeña extensión del ciclo y se produce la primera oleada de transcripción cigótica, momento en que los primeros genes que van a determinar la organización la efectúan por regiones del embrión, al mismo tiempo que los primeros genes que determinarán el sexo empiezan también a expresarse. Después de la división mitótica 13, cuando los núcleos se encuentran en la periferia del embrión, la membrana celular crece alrededor de ellos y los envuelve formando las primeras células. Es en este momento en que la segunda oleada de transcripción somática ocurre y se mantiene durante todo el desarrollo de la mosca (figura 2).

En el nemátodo *C. elegans*, la activación de la expresión cigótica inicia en el estadio de 4 células, aunque el embrión



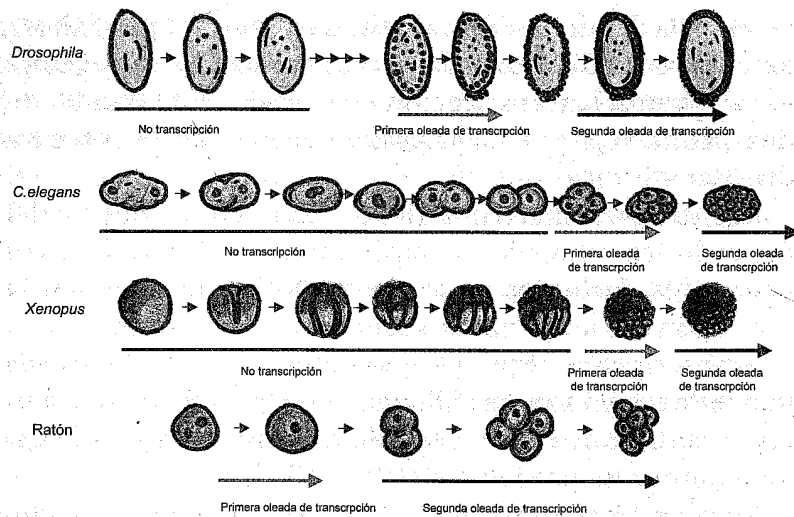


Figura 2. Diagrama comparativo de la activación de la transcripción en *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* y ratón.

puede desarrollarse hasta el estadio de 100 células, sin que ocurra transcripción. Durante este estadio de 100 células es cuando la transcripción en las células somáticas toma vuelo y se mantiene durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto podemos decir que en *C. elegans*, también hay dos oleadas de transcripción en el desarrollo embrionario temprano (figura 2).

En el sapo *Xenopus laevis*, otro modelo para el estudio de la biología del desarrollo, sucede algo parecido a lo que ocurre en la *Drosophila*. Después de la fertilización el embrión sufre 11 divisiones celulares sin prácticamente transcripción. Sin embargo, algo de transcripción puede ser detectada después de la división mitótica 6. La activación global ocurre en el estadio de 4000 células, cuando el embrión pasa de un estado de sincronización en las

divisiones celulares, a un paso de no sincronización durante el ciclo celular. Por lo tanto, también en *Xenopus*, parece haber dos oleadas transcripcionales, primero una leve y después una más intensa que se mantiene durante el desarrollo (figura 2).

En el caso de los mamíferos en el modelo que más se ha estudiado este proceso es en el ratón. Durante la ovogénesis temprana del ratón, ocurre una actividad transcripcional muy elevada, después los oocitos se detienen en la metafase II y la transcripción se detiene. Diez horas después de la fertilización y cuando los dos pronúcleos ya se han formado se activa de nuevo la transcripción de manera muy reducida y sólo en el genoma del pronúcleo masculino. Interesantemente en la transición de un embrión de una célula al de dos células el 90% del RNA almacenado en el oocito es degradado. La activación global de la transcripción ocurre en el estadio de dos células. Por lo tanto, también en mamíferos se puede considerar que hay dos oleadas de transcripción en el embrión temprano (figura 2).

En conclusión podemos decir que la activación cigótica de la transcripción ocurre en diferentes momentos del desarrollo en diferentes especies, sin embargo en todas la contribución materna es fundamental para que esta ocurra y en general esta activación se da en dos oleadas, la primera transcribiendo una parte reducida del genoma, cuyos productos son necesarios para que ocurra la segunda y más robusta oleada transcripcional y así el embrión pase a un estado en el que se empiezan a formar las primeras capas embrionarias.

## 5. DE LAS CÉLULAS MADRE AL INICIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR A PARTIR DE LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE GENES DURANTE EL DESARROLLO

En el momento en que un embrión empieza a dividir sus células y empiezan a adquirir un comportamiento diferente entre ellas, en cuanto a su ciclo celular, se empiezan a establecer los diferentes linajes celulares, que eventualmente se diferenciarán en diferentes tipos de tejidos. En mamíferos los linajes celulares se establecen a través de lo que ahora conocemos como células madre o troncales. Este tipo de células tienen el potencial de diferenciarse a cualquier tipo celular y por lo tanto a partir de ellas se inicia la formación de los diferentes linajes. Durante la determinación de tipo celular específico, puede haber estados intermedios en los que células que se conocen como células precursoras o progenitoras se diferencian a tipos celulares específicos. En general las células precursoras son menos plásticas que las células madre ya que generalmente ya se han expresado factores transcripcionales, tanto activadores como represores, que establecen las características típicas de un linaje celular [5].

En mamíferos, las primeras células que se dividen, todas muestran el mismo fenotipo y tienen la capacidad de dividirse indeterminadamente y de dar origen a cualquier linaje celular. Después de varias divisiones más o menos cuando el embrión está compuesto por 64 células, éstas se separan en dos tipos el trofotodermo que dará origen a las células extra-embriónicas y a la masa celular interna que da origen al embrión. Las células de la masa celular interna son totipotenciales y eventualmente dan origen a las tres capas embrionarias que son el endodermo, el ectodermo y el mesodermo. Es muy

interesante que en la actualidad sabemos que estas células presentan características particulares en cuanto su patrón de expresión de genes y en la arquitectura de su cromatina. Por ejemplo los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog, son importantes en el mantenimiento del estado no diferenciado y totipotencial de estas células. Estos factores necesitan la ayuda de otros factores transcripcionales, que no son específicos de las células madre, pero que se requieren como co-activadores transcripcionales como lo son Klf4, Myc y p53. A la vez que Oct4 actúa como activador transcripcional para la expresión de genes que se requieren para mantener un estado totipotencial, también es represor de muchos genes que son requeridos para activar diferentes rutas de diferenciación. Este mecanismo de represión es mantenido con la ayuda de mecanismos llamados epigenéticos que establecen una estructura de la cromatina compacta alrededor de estos genes reprimidos. En este mecanismo de represión son piezas fundamentales los complejos Polycomb que mantienen un estado reprimido al modificar la estructura de la cromatina. Como parte del mecanismo, que el complejo Polycomb 2 ejerce para mantener una cromatina compacta, es la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3. Esta marca permite el reclutamiento de otros complejos que metilan a la misma histona, pero ahora en la lisina 9. Esto a su vez, hace que se recluten factores como la proteína de heterocromatina 1 (HP1 por sus siglas en inglés) que generan un estado de represión que se puede mantener en las diferentes divisiones celulares, por lo que se puede considerar como un mecanismo epigenético de regulación transcripcional.

Por otro lado, es también muy interesante notar que en promotores de algunos genes que no se expresan en las células troncales, la cromatina presenta un estado

ambivalente, es decir no está en un estado completo de represión, ni de activación de la transcripción. En general, genes en esta condición, son activados en etapas tempranas durante el inicio de la diferenciación celular y determinan el inicio del establecimiento de los linajes celulares.

El estudio de los mecanismos de mantenimiento de la totipotencialidad de las células troncales y de la diferenciación por medio de factores externos que pueden activar este proceso, es en la actualidad uno de los campos de estudio más intensos en la biología del desarrollo. En parte esto se debe a el potencial que tiene el uso de estas células en medicina regenerativa. Si entendemos cómo se regula el mantener un estado indiferenciado y luego cómo se diferencian estas células a diferentes tipos celulares, será ampliamente relevante en el campo. Un descubrimiento reciente que ha tenido un gran impacto en el campo de las células troncales y su posible uso en medicina fue el que a partir de fibroblastos adultos de ratones y humanos fue posible des-diferenciarlos a un estado de pluripotencialidad [7]. Se consideraba prácticamente un dogma que una célula en estado de diferenciación terminal, no tenía la capacidad de convertirse a otro tipo celular y menos a un estado equivalente a una célula troncal. Esto se logró por medio de simplemente expresar en los fibroblastos los factores Oct4, Sox2, Klf4 y Myc [7]. Como mencionamos anteriormente, Oct4 y Sox2 son requeridos para mantener un estado de totipotencialidad e indiferenciado en las células troncales y que Klf4 y Myc colaboran con el establecimiento de esta condición. Esto quiere decir que la expresión de los factores que mantienen el fenotipo de las células troncales en un fibroblasto es suficiente para trans-diferenciar este tipo celular, modificar el patrón de expresión de cientos, si no

es que de miles de genes y cambiar un estado epigenético en la cromatina que ya se había establecido en los fibroblastos, por el que está presente en una célula troncal. La tremenda importancia de este descubrimiento en medicina regenerativa es obvia.

Cuando las células madre inician ciclos de divisiones no sincrónicas se activa una serie de cascadas de regulación de la expresión de factores transcripcionales que van a iniciar el establecimiento de las diferentes capas embrionarias. Cómo se inician estos procesos es también una pregunta central en la biología del desarrollo.

Aunque en la mosca no existe como tal un grupo de células indiferenciadas, a partir de las cuales se formarán todos los diferentes tipos celulares, ya que el patrón de expresión temprano de genes que regulan los diferentes compartimientos del embrión se establece durante la oogenesis, es en *Drosophila* donde mejor se conoce cómo estas cascadas de regulación determinan los diferentes tipos celulares durante el desarrollo. De hecho es en la mosca donde se encontraron por primera vez muchos de los genes reguladores que permiten la diferenciación celular, cuya función está conservada en los mamíferos.

No es la intención de este capítulo revisar en extenso la determinación antero-posterior y dorso-ventral en la mosca, sin embargo mencionaremos de manera general algunos puntos importantes que nos permiten entender cómo ocurre la diferenciación celular durante el desarrollo, en particular en la determinación antero-posterior. Como hemos mencionado aquí, en el huevo de *Drosophila* se encuentran depositados productos de origen materno (RNA mensajeros y proteínas) que se pueden distribuir en diferentes regiones dentro de esta enorme célula. Por ejemplo, uno de los factores que se acumula en la parte anterior del embrión de *Drosophila* se llama Bicoide.

Ya que en los primeros estadios del desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* este es un sincisio, Bicoide puede difundir de la parte anterior a la posterior formando un gradiente. Bicoide es un factor transcripcional que activa la expresión de genes que codifican a otros factores transcripcionales cuya función es determinar las estructuras anteriores del embrión. Por otro lado, en la parte posterior se acumula otro factor que se llama Nanos, que impide la traducción de RNA mensajeros que se requieren para formar la parte anterior del embrión y, por lo tanto, permite la expresión de los factores que determinan la parte posterior del embrión. Tanto Bicoide como Nanos son codificados por los genes maternos, entre otros muchos factores. De esta manera los genes maternos controlan la expresión de los primeros genes cigóticos que van a determinar regiones específicas de diferenciación en el embrión. A los genes blanco de los genes maternos en *Drosophila* se les conoce como genes GAP, ya que mutaciones en estos genes producen organismos que carecen de regiones grandes del embrión. Los genes GAP codifican para factores de transcripción que van a regular la expresión de otra serie de genes que determinan regiones más finas del embrión. Estos genes son conocidos como *pair-rule* (genes que determinan pares de segmentos) y van a determinar las características de cada segmento en la mosca. También en su gran mayoría los genes *pair-rule* codifican para factores transcripcionales. A su vez la combinación de genes GAP y *pair-rule* regula la expresión de los genes *segment-polarity*, que determinan la polaridad de cada segmento de la mosca. Los genes GAP y *pair-rule* son genes de segmentación que en conjunto regula la expresión de los genes homeóticos que en conjunto con los genes de segmentación determinan la formación de los diferentes compartimientos del

organismo. Así pues una cascada jerárquica de factores transcripcionales regulan la diferenciación celular y el establecimiento de regiones en el embrión que formarán los órganos de la mosca (figura 3).

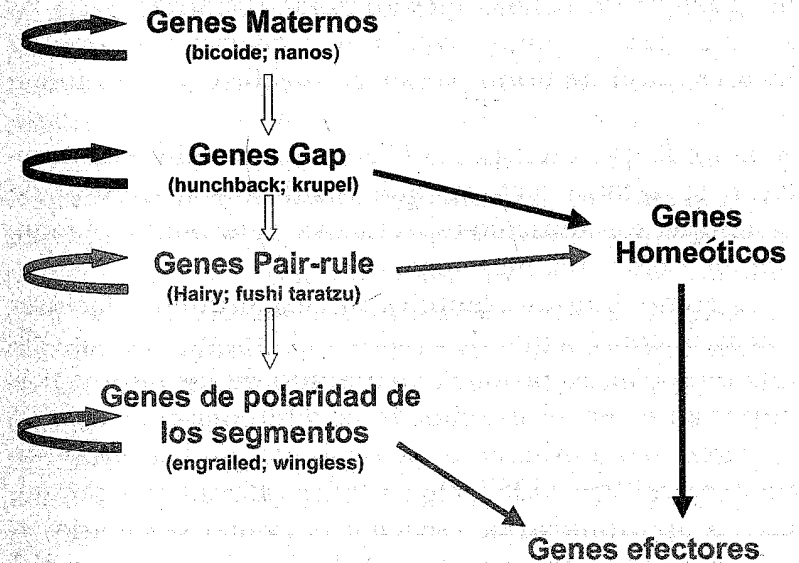


Figura 3. Cascada de regulación de genes durante la determinación anterior-posterior en *Drosophila*.

## 6. EL EJEMPLO DE LA DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA MUSCULAR

Probablemente el tipo celular del que se conoce mejor como factores transcripcionales que regulan la diferenciación celular es en el músculo y es por lo tanto un buen ejemplo para discutir aquí. Este proceso ha sido estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que los fibroblastos en cultivo pueden ser inducidos para diferenciarse de las células

musculares. En general en el embrión de ratón, la miogénesis pasa inicialmente por un estadio de determinación en el que células precursoras llamadas mioblastos, que de alguna manera, ya fueron predeterminadas para formar células musculares en etapas más tempranas del desarrollo a partir de células mesodérmicas localizadas en las somitas. Estas células proliferan y migran a diferentes lugares en el embrión, cesan de dividirse y se fusionan formando un sincisio, que lo conocemos como miotubos. A partir de este punto y por el efecto de señales extracelulares, se activan factores que regulan la expresión de genes que son músculo-específicos y determinan el fenotipo de una célula muscular.

El cómo fueron identificados los primeros factores transcripcionales que determinan el fenotipo de una célula muscular, es probablemente uno de los puntos más importantes en el estudio de la diferenciación celular. Este gran descubrimiento fue realizado por Harold Weintraub entre 1986 y 1987. Me considero afortunado porque tuve la oportunidad de escuchar el primer seminario en que se hacían públicos estos resultados, directamente del autor en la Universidad de Stanford. Este descubrimiento fue logrado por la inventiva y mentalidad que el biólogo molecular puede desarrollar (una década después Harold Weintraub murió de cáncer cerebral y no pudo obtener el premio Nobel). El experimento consistió en usar una línea de fibroblastos conocida como C3H 10T1/2. Cuando estas células son tratadas con 5-azacitidina, un inhibidor de la metilación de citidinas, estas células se transforman en mitubos. La metilación de citidinas está relacionada con la represión de genes y este dato sugería que la activación de unos cuantos genes sería necesaria para transformar los fibroblastos en miotubos. Por lo tanto lo que se hizo a continuación fue tomar RNA mensajero de células

tratadas con 5-azacitidina, hacer DNA complementario e hibridarlo con un exceso de RNA mensajero purificado de células no tratadas. Los cDNAs que no hibridaron con el RNA proveniente de células no tratadas, fueron clonados en bacterias y se buscaron las clonas que sólo fueran detectadas con cDNA de células tratadas con el inhibidor. Esta estrategia se conoce como hibridación substractiva y fue combinada también con una búsqueda diferencial de clonas.

Dentro de las clonas seleccionadas en este ensayo, se selecciono una que codificaba para una proteína que por sus características podría ser un factor transcripcional ya que contiene un dominio de aminoácidos básicos conocido en inglés como *helix-loop-helix*. Después el cDNA de este gen fue introducido y expresado de manera artificial en las células C3H 10T1/2 y éstas se diferenciaron en miotubos (figura 4). La proteína que permite esta diferenciación se conoce en inglés como *myogenic determination* o MyoD. Ahora se sabe que MyoD no actúa sólo para inducir la diferenciación de fibroblastos a miotubos ya que requiere de factores co-activadores y que además hay otros factores transcripcionales que son Myf5 y miogenina que también son músculo específicos y que junto con MyoD generan el fenotipo muscular. Estos experimentos *in vitro*, fueron corroborados en mutantes de *Drosophila* en los genes homólogos.

En base a esta información, es evidente que existen genes maestros que son activados durante el desarrollo e inducen una cascada de regulación jerárquica de genes que, eventualmente, determinan la diferenciación celular.

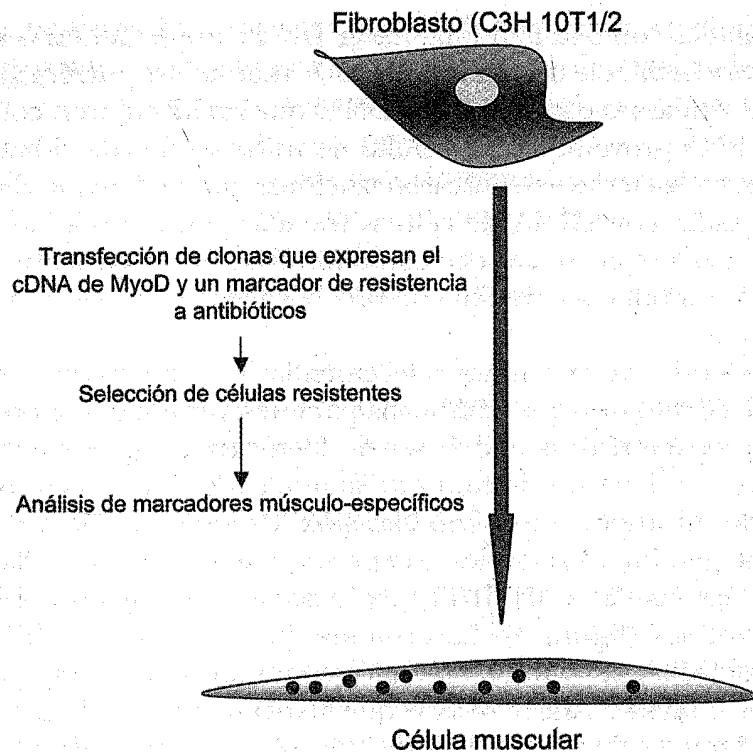


Figura 4. Ensayo para la diferenciación a célula muscular por la expresión de MyoD en una línea de fibroblastos.

## 7. CONCLUSIONES

Después de muchos años de investigación se empieza a tener un panorama de cómo la activación en cascada de factores transcripcionales regula la diferenciación celular durante el desarrollo. Sin embargo aún hay muchas preguntas que tienen que ser contestadas. Por ejemplo, ¿cómo está programada y se activa la transcripción cigótica en el embrión temprano? ¿Cómo está coordinado el ciclo celular con la activación de la transcripción? ¿Cuál

es la influencia y cómo está regulada la estructura de la cromatina en el comienzo de la transcripción cigótica? ¿Cómo factores determinantes de la pluripotencialidad celular controlan la estructura de la cromatina para mantener un estado de no diferenciación? ¿Por qué diferentes factores transcripcionales son activadores y represores a la vez y cuál es el mecanismo a nivel molecular? ¿Qué tantos y cuáles son los mecanismos epigenéticos que controlan el mantenimiento de un fenotipo? ¿Qué tan flexibles son estos mecanismos epigenéticos y qué relación hay en la generación de células cancerosas? Éstos son sólo algunos ejemplos de las preguntas que aún inquietan a los biólogos del desarrollo y a los biólogos moleculares y que nos mantendrán ocupados por muchos años más.

## REFERENCIAS

1. Thomas M. C. y Chiang C-M, *The General Transcription machinery and General Cofactors. Critical Rev Biochem Mol. Biol.* **41**, 105-178 (2006).
2. Zurita M. y Merino C., *The transcriptional complexity of the TFIID complex. Trends in Genet* **19**, 578-584 (2003).
3. Tadros W., Goldman A. L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T. R., Westwood J. T., Smibert C. A. y Lpshitz, H., *SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in Drosophila and its translation is activated by the PAN GU kinase. Dev Cell* **12**, 143-154 (2007).
4. Wang Q. T., Piotrowska K., Ciemerych M. A., Milenkovic L., Scott M., Davis R. W. y Zernicka-Goetz M. *A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. Dev Cell* **6**, 133-144 (2004).
5. Morrison S. J. y Kimble J., *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature* **441**, 1068-1074 (2006).
6. Lunyak V. y Rosenfeld M. G. *Epigenetic regulation of stem cell fate, Human Molecular Genetics* **17**, R28-R36 (2008).



7. Loh Y. H., Wu Q., Chew J. L., Vega V. B., Zhang W., Chen X., Bourque G., Leong B., Liu J., *et al.*, *The Oct4 and nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat. Genetics*, 431-440 (2006).
8. Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B., *Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell*. 198751, 987-1000 (1987).

## CAPÍTULO 18 MORFOGÉNESIS

RAFAEL A. BARRIO y DAMIÁN HERNÁNDEZ HERRÁN\*

*Instituto de Física-UNAM*

*Apdo. Postal 20-364, México 01000 D. F.*

### 1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen muchos sistemas funcionales compuestos de partes radicalmente diferentes. Usualmente estas partes se auto-organizan en el espacio-tiempo de forma notablemente precisa. Ejemplos de esto se pueden ver en sistemas de cualquier tamaño: átomos y moléculas en sólidos, materiales nanoestructurados, organismos vivos, formaciones geológicas y sistemas astronómicos.

Este tipo de organización varía en complejidad dependiendo del tipo de sistema, por ejemplo en los organismos vivos ésta es extremadamente complicada en todas las escalas espacio-temporales, y la localización espacial precisa de todas las partes es crucial para el funcionamiento de todo el sistema, es decir para la vida misma. En todos los casos, independientemente de sus particularidades, esta organización debe ser, a final de cuentas, una consecuencia de interacciones físicas entre diversos com-

\* barrio@fisica.unam.mx

ponentes del sistema. Sin embargo, es extremadamente difícil, o incluso imposible, modelar sistemas complejos tomando en cuenta todas las interacciones físicas microscópicas. Debido a esto, muchas veces es necesario recurrir a modelos fenomenológicos que puedan capturar las características específicas del sistema en las escalas de interés. Dichos modelos deben, al menos, proponer un mecanismo simple capaz de proveer la información espacial necesaria para la organización de las diversas partes del sistema. Recordando un principio universal de la física, el cual relaciona el comportamiento dinámico de un sistema con las simetrías que poseen los campos que actúan en éste, debe haber un mecanismo de rompimiento de simetría que resulte en un patrón estacionario espacial. De esto último podemos deducir también que dichos fenómenos de auto-organización deben estar regidos por leyes de evolución no lineales.

Uno de los primeros que relacionó los patrones en sistemas biológicos con un fenómeno de auto-organización, fue el naturalista D'Arcy Thompson [1]. Las conexiones que él hizo entre la biología y otros campos del conocimiento científico en su importante libro de 1917, inspiraron la realización de mucho trabajo, tanto experimental como teórico, en los llamados *sistemas complejos*.

Los sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales presentan propiedades universales que los hacen particularmente útiles para construir modelos de sistemas complejos. La existencia de rompimientos espontáneos de simetría es una de dichas propiedades, y aparece cuando algunos de los parámetros que definen la interacción del sistema con el mundo exterior alcanzan ciertos valores críticos. Los estados con menor simetría son generalmente robustos ante perturbaciones al azar, tales como ruido térmico y ante variaciones en las condiciones iniciales.

Alan Turing predijo que un sistema formado por elementos químicos que se difunden y reaccionan entre sí en un medio determinado, puede producir patrones espaciales en sus concentraciones que son robustos y estacionarios. Mediante esta idea, Turing intentó describir algunos procesos en sistemas complicados, como uno puede inferir del resumen de su artículo de 1952:

*The purpose of this paper is to discuss a possible mechanism by which the genes of a zygote may determine the anatomic structure of the resultant organism. The theory does not make any new hypothesis, but merely suggests that certain well known physical laws suffice for explaining many facts [2].*

Ambiciosa como suena, esta frase contiene todos los conceptos básicos necesarios para el desarrollo de una teoría sobre la aparición de las formas. En este artículo Turing acuñó el término **morfogénesis** para el conjunto de procesos que llevan a un sistema a tomar una forma precisa, y en consecuencia las sustancias responsables de esto se conocen como morfógenos.

Las leyes físicas de las que habla Turing en su artículo son la cinética química, que modela las reacciones químicas entre ciertas sustancias y la difusión de éstas en un medio determinado, ambas leyes derivables del comportamiento estadístico de un sistema compuesto por muchos componentes. Los patrones aparecen cuando un estado estacionario estable, altamente simétrico en el espacio en la ausencia de difusión se vuelve inestable en presencia de ésta. En este caso, el mecanismo responsable del rompimiento de simetría del sistema se conoce como **inestabilidad inducida por difusión** o **inestabilidad de Turing**. Este mecanismo es sorprendente, ya que usualmente cuando una sustancia se difunde, los gradientes de concentración de la misma disminuyen en el tiempo, lo



que tiene como consecuencia la desaparición o disminución de cualquier tipo de estructura espacial. Sin embargo, cuando existe una inestabilidad de Turing, es precisamente la difusión la causante de la inestabilidad del estado estacionario uniforme y de la aparición de un patrón espacial.

Los modelos de Turing pertenecen a una familia de sistemas modelados por ecuaciones diferenciales parciales no lineales, los cuales se conocen como **sistemas de reacción-difusión**. Estos sistemas pueden presentar una inestabilidad de Turing si, y sólo si, se dan ciertas condiciones restrictivas. Los sistemas de reacción-difusión presentan una amplia variedad de comportamientos, usualmente pensados para modelar fenómenos específicos. Sin embargo todos presentan características universales que pueden ser fácilmente mostradas por un sistema general de Turing propuesto por Barrio *et al.* [3] y que llamaremos BVAM de ahora en adelante.

Es justo decir que en la actualidad la palabra morfogénesis se aplica en un sentido vasto, que abarca muchísimas líneas de investigación diferentes en biología del desarrollo y en embriología, sin embargo, aquí nos reduciremos a tratar el aspecto del rompimiento de simetría que deriva en una información espacial, necesaria para la formación de diferentes partes de un organismo vivo complejo. Sería absurdo querer tratar en un solo tomo todos los métodos usados en la morfogénesis. Aquí nos restringiremos a describir los conceptos básicos para entender la inestabilidad de Turing y la forma en que se producen patrones estacionarios espaciales. También daremos ejemplos de aplicaciones de esta propiedad para modelar diversos fenómenos en la biología.

## 2. LA INESTABILIDAD DE TURING

Un sistema de ecuaciones de reacción difusión para  $N$  morfógenos se puede escribir de la siguiente manera:

$$\frac{\partial u_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 u_i + F_i(\{u_i\}), \quad i = 1 \dots N, \quad (1)$$

donde  $u_i$  son las concentraciones de los morfógenos,  $D_i$  los coeficientes de difusión de cada químico, y las funciones  $F_i$  dan la cinética de las reacciones químicas entre los morfógenos. Aquí es importante señalar que la ecuación (1) es válida solamente cuando el medio en el cual se lleva a cabo la reacción química es homogéneo e isotrópico, restricciones que, de manera general, no cumplen los sistemas biológicos. Pero por lo pronto consideraremos primero que los coeficientes de difusión son constantes.

En 1952 Alan M. Turing demostró que los estados homogéneos estacionarios (puntos fijos) de la ecuación (1), estables en ausencia de difusión, pueden volverse inestables en presencia de ésta si los químicos se difunden de forma diferente. Para ver cómo aparece dicha inestabilidad y las restricciones particulares que la caracterizan, lo primero que tenemos que hacer es ver cómo se comportan estos sistemas ante pequeñas perturbaciones alrededor del estado estacionario homogéneo estable, es decir tenemos que estudiar la respuesta lineal del sistema alrededor de dicho estado homogéneo, lo cual haremos para dos químicos, por simplicidad.

Mediante un cambio de variables, la ecuación (1) para dos químicos se puede escribir de manera adimensional de la siguiente forma:

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D\nabla^2 & 0 \\ 0 & \nabla^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} + \eta \begin{pmatrix} F(u,v) \\ G(u,v) \end{pmatrix}, \quad (2)$$

Donde  $\eta$  es una cantidad que mide qué tan fuerte es la reacción con respecto a la difusión, aunque también se puede interpretar como una escala espacio-temporal del sistema, y  $D = D_u/D_v$  es la razón de coeficientes de difusión.

El medio donde sucede la reacción química es generalmente un medio con volumen finito. Por lo tanto, para que este problema esté bien definido, necesitamos especificar las condiciones a la frontera que cumplen las densidades  $u$  y  $v$ . Estas condiciones pueden ser de la siguiente forma:

$$\left. \begin{aligned} u &= f(x) \\ v &= g(x) \end{aligned} \right\} x \in \partial\Omega; \quad \text{Dirichlet}$$

$$\left. \begin{aligned} \nabla u \cdot \vec{n} &= f(x) \\ \nabla v \cdot \vec{n} &= g(x) \end{aligned} \right\} x \in \partial\Omega; \quad \text{Newman} \quad (3)$$

$$\left. \begin{aligned} \nabla u \cdot \vec{n} + u &= f(x) \\ \nabla v \cdot \vec{n} + v &= g(x) \end{aligned} \right\} x \in \partial\Omega; \quad \text{Robin.}$$

La primera condición significa que las densidades de los químicos en la frontera están dadas por las funciones  $f$  y  $g$ . Las segunda, que el flujo de los químicos en la frontera está determinado por las funciones  $f$  y  $g$ . La tercera

condición dice que el flujo y la densidad de los químicos en la frontera no son independientes, y están relacionadas mediante las funciones  $f$  y  $g$ .

También es común utilizar condiciones de frontera periódicas. El tipo de condición a la frontera que se escoge depende del sistema que se esté modelando.

Ahora bien, si  $(u_0, v_0)$  es un punto fijo o estado estacionario de la cinética, la evolución temporal de pequeñas fluctuaciones alrededor de este punto está gobernada por la siguiente ecuación

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D\nabla^2 & 0 \\ 0 & \nabla^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} + \eta A \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix}, \quad (4)$$

donde  $A$  se conoce como la matriz de estabilidad, y es la matriz jacobiana del vector cuyas entradas son las funciones  $F(u,v)$  y  $G(u,v)$ . Por otro lado,  $u$  y  $v$  son en este caso pequeñas fluctuaciones con respecto al estado de equilibrio, es decir  $u = u_0 + \delta u$ ,  $v = v_0 + \delta v$ .

Escrita de manera explícita,  $A$  es de la forma:

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{21} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} = \left( \begin{array}{cc} \partial_u F & \partial_v F \\ \partial_u G & \partial_v G \end{array} \right) \Big|_{(u_0, v_0)} \quad (5)$$

Hemos supuesto ya que el estado de equilibrio  $(u_0, v_0)$  es estable en ausencia de difusión, lo cual tiene como consecuencia necesaria las siguientes condiciones:

$$\begin{aligned} a_{11} + a_{22} &< 0, \\ a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} &> 0. \end{aligned} \quad (6)$$

Por otro lado, la solución general de la ecuación (5) está dada por:

$$\begin{pmatrix} u' \\ v' \end{pmatrix} = \sum_k \left( W_1(k) V_1(k) e^{\lambda_1(k)t} f(kx) + W_2(k) V_2(k) e^{\lambda_2(k)t} f(kx) \right), \quad (7)$$

donde  $f(kx)$  es solución de  $\nabla^2 f = k^2 f$  y  $W_i(k)$  son funciones que están determinadas solamente por las condiciones iniciales,  $V_i(k)$  y  $\lambda_i(k)$  son los vectores y valores propios de la siguiente matriz:

$$A(k) = \begin{pmatrix} a_{11} - Dk^2 & a_{12} \\ a_{21} & a_{21} - k^2 \end{pmatrix}. \quad (8)$$

Ahora bien, para que el estado estacionario homogéneo sea inestable en presencia de difusión, necesitamos que la parte real de alguno de los valores propios  $\lambda_i(k)$  (o bien, de la familiar relación de dispersión) sea positiva para alguna  $k \neq 0$ , donde la función  $\lambda_i(k)$  está dada por:

$$\begin{aligned} 2\lambda_i(k) &= -\sigma(k^2) \pm \sqrt{[\sigma(k^2)]^2 - 4h(k^2)}, \\ \sigma(k) &= k^2(1+D) - \eta(a_{11} + a_{22}), \\ h(k^2) &= Dk^4 - \eta(Da_{11} + a_{22})k^2 + \eta^2 \det(A). \end{aligned} \quad (9)$$

De la ecuación (9) podemos ver que para cumplir la condición  $\Re(\lambda_i(k)) > 0$ , es necesario que  $h(k^2) < 0$ , ya que debido a las restricciones mostradas en la ecuación (6), tenemos que  $\sigma(k^2) < 0$  para todo valor de  $k$ . Debido también a las restricciones, la única forma en que se cum-

pla que  $h(k^2) < 0$  es que  $Da_{11} + a_{22} > 0$ . Para que esta última desigualdad se cumpla, es necesario que se satisfagan las siguientes condiciones:

$$\begin{aligned} \text{signo}(a_{11}) &\neq \text{signo}(a_{22}), \\ D &\neq 1. \end{aligned} \quad (10)$$

Podemos concluir entonces, que para la existencia de una inestabilidad ante perturbaciones con  $k \neq 0$ , es necesario que los químicos  $u$  y  $v$  se difundan con diferentes coeficientes de difusión.

La condición  $Da_{11} + a_{22} > 0$  es necesaria pero no suficiente para que  $h(k^2)$ ; para asegurarlo se exige que el mínimo de la función  $h(k^2)$  sea menor que cero, lo que implica:

$$\begin{aligned} h(k_c^2) &< 0, \\ \left. \frac{dh}{d(k^2)} \right|_{k_c} &= 0. \end{aligned} \quad (11)$$

Donde  $k_c$  es el vector de onda para el cual  $h(k^2)$  tiene un mínimo. Escritas explícitamente estas condiciones son:

$$\begin{aligned} h_{\min} &= \eta^2 \left( \det(A) - \frac{(Da_{11} + a_{22})^2}{4D} \right) < 0, \\ k_c^2 &= \eta \frac{(Da_{11} + a_{22})}{2D}. \end{aligned} \quad (12)$$

El punto de bifurcación  $h_{\min}$ , nos define un valor crítico  $D_c$  al suponer que todos los demás parámetros están fijos. Por lo tanto, si  $D > D_c$  el sistema es inestable ante

perturbaciones con número de onda  $k \sim k_c$ , donde  $k_c$  corresponde al número de onda más inestable.

El intervalo de números de onda  $k$  que pueden ser inestables está determinado por los ceros de  $h(k^2)$ , de tal manera que si  $k^2 \in (k_1^2, k_2^2)$ , donde  $h(k_1^2) = h(k_2^2) = 0$ , entonces es un número de onda inestable.

De todo esto se concluye que cualquier cinética que no cumpla con las siguientes condiciones:

$$\begin{cases} a_{11} + a_{22} < 0, \\ a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} > 0, \\ Da_{11} + a_{22} > 0, \\ (Da_{11} + a_{22})^2 - 4D(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}) > 0, \end{cases} \quad (13)$$

no presentará una inestabilidad de Turing y por lo tanto no se formarán los patrones espaciales característicos de dicha inestabilidad durante la evolución dinámica de las fluctuaciones de concentración alrededor del estado estacionario homogéneo.

A pesar de que la inestabilidad de Turing ya ha sido producida de forma experimental en sistemas químicos [4], la existencia de patrones espaciales formados a través de ella en la naturaleza todavía es una idea controversial, (ver [5] para una revisión). A este respecto hay dos críticas severas: 1) La identificación de los morfógenos en sistemas complejos es una tarea difícil de lograr experimentalmente, y solamente se han podido encontrar pocas sustancias que cumplen con esta característica.<sup>1</sup> 2) Los

<sup>1</sup> En la actualidad se usa la palabra morfógeno para identificar sustancias que permiten el desarrollo de tejidos biológicos, sin referirse necesariamente a la inestabilidad de Turing.

patrones básicos obtenidos mediante esta inestabilidad son muy simples, por lo que a veces es difícil asociarlos con los patrones extremadamente complejos presentados por los sistemas reales.

La primera objeción no tiene nada que ver con la teoría, y es una cuestión que radica en las dificultades técnicas experimentales, dificultades que seguramente serán superadas con el tiempo y el desarrollo de nuevas técnicas experimentales, lo que dará como resultado el descubrimiento de muchas sustancias que cumplan con las características esenciales para poder ser llamadas morfógenos. De hecho, en algunos procesos biológicos tales como la comunicación química entre neuronas, ya se han encontrado dichos morfógenos [6].

La segunda objeción es más seria, ya que implicaría que esta teoría es demasiado simple para ser aplicada a sistemas reales, sobre todo en el caso de organismos vivos. Esta objeción puede ser parcialmente refutada en algunos casos, ya que se obtienen patrones complicados formados con sistemas de Turing acoplados.

En años recientes ha habido una explosión en el número de investigaciones y una ampliación del tipo de sistemas reales que pueden ser modelados mediante ecuaciones de reacción-difusión. Una buena revisión de las técnicas utilizadas para modelar sistemas biológicos con este tipo de herramientas se puede ver en el libro de J. M. Murray [7] y en el artículo de S. Schnell, *et al.*, [8].

### 3. MODELO BVAM

Para ejemplificar lo dicho hasta ahora, utilizaremos un modelo propuesto por nosotros (y que llamaremos BVAM [3]) para estudiar las diferentes características

y propiedades que pueden presentar los sistemas de reacción-difusión. A diferencia de la mayoría de los modelos de Turing, el BVAM no fue pensado para modelar un fenómeno o una reacción química específica, sino que fue desarrollado para estudiar el comportamiento general de las cinéticas químicas en presencia de difusión. Para esto, no se presupone ninguna forma particular a las funciones que modelan la cinética, sino que simplemente se propone la existencia de un punto fijo en  $(U_0, V_0)$  y se expande en serie de Taylor alrededor de este punto, reteniendo términos hasta tercer orden. La forma específica del modelo obtenido de esta manera es:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D\delta\nabla^2 u + \alpha u(1 - r_1 v^2) + v(1 - r_2 u), \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D\nabla^2 v + \beta v\left(1 + \frac{\alpha r_1}{\beta} uv\right) + u(\gamma + r_2 v), \end{aligned} \quad (14)$$

donde  $\delta$  es un factor de escala,  $D$  es la razón entre los coeficientes de difusión correspondientes a cada químico, y  $u = U - U_0$  y  $v = V - V_0$ , por lo que hay una solución uniforme estacionaria en  $(u, v) = (0, 0)$ . La forma de los términos no lineales, junto con sus respectivos coeficientes, proviene de las leyes de conservación de masa entre químicos.

Hay dos parámetros de interacción no-lineales,  $r_1$  y  $r_2$ , correspondientes al término cúbico y al término cuadrático, respectivamente. En cero dimensiones (es decir, en ausencia de difusión) la ecuación (12) muestra una solución estacionaria en:

$$v = \frac{-(\alpha + \gamma)}{1 + \beta}. \quad (15)$$

Por simplicidad supondremos que  $\gamma = -\alpha$ , lo que asegura que el estado estacionario sólo es  $(u, v) = (0, 0)$ . El análisis en el caso general se puede ver en la referencia [9]. Linealizando la cinética alrededor del estado estacionario, obtenemos la siguiente relación para los eigenvalores de la matriz jacobiana de la ecuación (14):

$$\lambda_{\pm} = \frac{(\alpha + \beta)}{2} \pm \sqrt{\left[\frac{(\alpha + \beta)}{2}\right]^2 - \alpha(\beta + 1)}. \quad (16)$$

La parte real de  $\lambda$  puede ser negativa en ciertas regiones del espacio de parámetros  $(\alpha, \beta)$  y por lo tanto, el estado estacionario es estable en esta región. Tomando en cuenta la difusión, la relación de dispersión del modelo está dada por:

$$\lambda(k)^2 - B\lambda(k) + C = 0, \quad (17)$$

donde

$$\begin{aligned} B &= \delta k^2(1 + D) - (\alpha + \beta), \\ C &= (\alpha - \delta D k^2)(\beta - \delta k^2) + \alpha. \end{aligned}$$

Entonces, de acuerdo con la ecuación (13), las condiciones que deben cumplir los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $D$  para la existencia de una inestabilidad de Turing son:

$$\begin{aligned} \alpha + \beta &< 0 \\ \alpha(\beta + 1) &> 0 \\ D\beta + \alpha &> 0 \\ (D\beta + \alpha)^2 - 4D\alpha(\beta + 1) &> 0 \end{aligned} \quad (18)$$

La región del espacio de parámetros que cumple con las condiciones de la ecuación (13) se llama la región de Turing. El máximo de la relación de dispersión está situado en:

$$k_c = \frac{D(\alpha - \beta) - (D+1)\sqrt{\alpha D}}{\delta D(D-1)}. \quad (19)$$

En la figura 1 se muestran varios ejemplos de distintos patrones formados mediante la ecuación (14), para dos conjuntos de parámetros diferentes: 1)  $D = 0.516$ ,  $\alpha = -\gamma = 0.899$  y  $\beta = -0.91$ , dando  $k_c = 0.42$  para las dos columnas

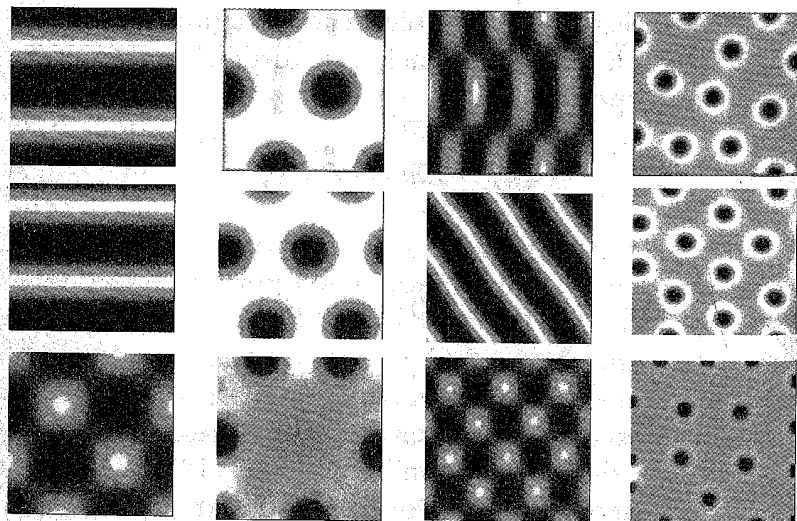


Figura 1. Patrones obtenidos mediante el modelo BVAM con diferentes parámetros y condiciones a la frontera (CF). El renglón de arriba corresponde CF de no flujo, en el segundo renglón las CF son periódicas y en el tercero son CF libres. Los parámetros de las primeras dos columnas son tales que  $k_c = 0.45$  mientras que para la tercera y cuarta columna  $k_c = 0.89$ . En la primera y tercera columna  $r_1 = 3.5$ ,  $r_2 = 0$ , y en la segunda y cuarta  $r_1 = 0.02$ ,  $r_2 = 0.2$ . En todos los patrones las condiciones iniciales son al azar y la escala es la misma  $\delta = 10$ .

de la izquierda; 2)  $D = 0.122$ ,  $\alpha = 0.398$  y  $\beta = -0.4$ , dando como número de onda crítico  $k_c = 0.84$  para las dos columnas de la derecha. Se debe observar que los patrones de la mitad izquierda presentan estructuras con una longitud de onda más grande ( $\lambda = 2\pi/k_c$ ) que los de la mitad derecha.

Con este simple modelo y condiciones de frontera periódicas o de no flujo en el plano, los patrones obtenidos son bastante simples. La selección del tipo de patrón depende del tipo de no-linealidad, las interacciones cúbicas correspondientes al parámetro  $r_1$  favorecen la formación de rayas, mientras que las interacciones cuadráticas  $r_2$  favorecen la formación de puntos [3].

En tres dimensiones hay más posibilidades para el tipo de patrones que se pueden obtener: esferas ordenadas y desordenadas, lamelas, patrones formados por capas, o laberintos y túneles. En la figura 2 mostramos algunos ejemplos tomados de la referencia [10].

Existe la posibilidad de que el sistema presente otro tipo de inestabilidades al salirse de la región de Turing en el espacio de parámetros. Por ejemplo, si  $\Re(\lambda) > 0$

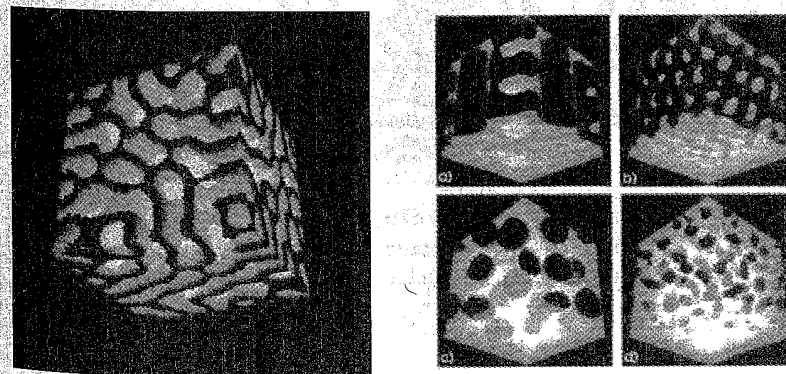


Figura 2. Ejemplos numéricos de patrones en tres dimensiones.



e  $\mathcal{J}(\lambda) \neq 0$  para  $k = 0$ , tenemos una bifurcación de Hopf, lo cual induce oscilaciones con longitudes de onda grandes, del tamaño del dominio donde ocurre la reacción. También puede haber regiones en el espacio de parámetros para las cuales el sistema presente una inestabilidad para  $k \neq 0$  con  $\mathcal{J}(\lambda) \neq 0$ . Esto se conoce como un bifurcación de Turing-Hopf y da lugar a patrones espaciales oscilantes en el tiempo [11]. El modelo BVAM también admite soluciones de frentes de onda cuando se relaja la condición  $\alpha = -\gamma$ . En este caso el sistema puede ser biestable, lo cual tiene como consecuencia la existencia de ondas viajeras. En esta misma situación, si el valor de  $D$  es menor que un valor crítico  $D_c$ , se obtienen patrones laberínticos estacionarios. El espacio de parámetros también contiene regiones donde aparecen ciclos límite, con la consecuente formación de ondas espirales. En la figura 3 mostramos algunos ejemplos de patrones obtenidos en regiones fuera del espacio de Turing.

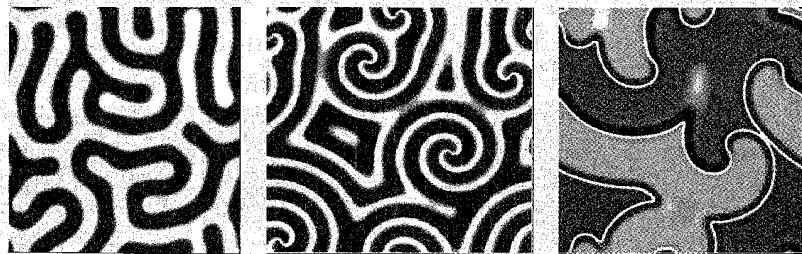


Figura 3. Patrones obtenidos mediante la relajación de la condición  $\alpha = -\gamma$ . El patrón de la izquierda es estacionario y los otros son oscilantes: espirales rotantes y solitones anclados en los puntos de curvatura cero.

#### 4. OTROS MODELOS DE TURING

En esta sección discutiremos un conjunto de modelos de Turing que han sido ampliamente estudiados en el pasado. Algunos de estos modelos pueden ser considerados como casos particulares del modelo BVAM.

En la tabla 1, mostramos las cinéticas de los modelos más famosos. Por famosos queremos decir que éstos son conocidos por un nombre específico y que han sido usados exitosamente para reproducir y predecir el comportamiento de sistemas reales. La notación usada en la tabla corresponde a la convención de escribirlos como sigue:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D_u \nabla^2 u + F(u, v, w, \dots), \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D_v \nabla^2 v + G(u, v, w, \dots), \\ \frac{\partial w}{\partial t} &= D_w \nabla^2 w + H(u, v, w, \dots), \quad \dots \quad \text{etc.} \end{aligned} \quad (20)$$

La primera cinética en la tabla se conoce como la ecuación de Fisher, algunas veces llamada de Fisher-Kolmogorov, y fue pensada originalmente para modelar la propagación de un gene exitoso en una población [12]. La ecuación de Fisher también ha sido utilizada para modelar propagación de epidemias y para modelar la dinámica espacio-temporal de ciertas poblaciones de bacterias [13].

La segunda cinética, representa el modelo de Lotka Volterra [14], que fue diseñado por el químico Alfred Lotka y el biólogo Vito Volterra para estudiar la dinámica depredador-presa entre dos poblaciones. Este modelo y sus variantes ha sido utilizado ampliamente por ecólogos.

Tabla 1  
 MODELOS DE REACCIÓN-DIFUSIÓN CON INESTABILIDAD DE TURING

Cinética química	Nombre del modelo	REF.
$F(u, v) = \mu u(1 - u / K)$	Ecuación de Fisher	[12]
$F(u, v) = au - buv,$ $G(u, v) = -cu + duv$	Lotka-Volterra	[14]
$F(u, v) = \rho_u - \mu_u u + \rho u^2 / v,$ $G(u, v) = \rho_v - \mu_v \rho v + \rho u^2$	Gierer-Meinhard	[15]
$F(u, v) = f(1 - u) - uv^2,$ $G(u, v) = bu - u^2 v$	Gray-Scott	[16]
$F(u, v) = a_u - (b + 1)u + u^2 v,$ $G(u, v) = bu - u^2 v$	Brusselator	[18]
$F(u, v, w) = [qv - uv + u(1 - u)] / \epsilon,$ $G(u, v, w) = [-quv - uv + fw] / \epsilon',$ $H(u, v, w) = u - v$	Oregonator	[20]
$F(u, v) = \gamma(a - u + u^2 v),$ $G(u, v) = \gamma(v - u^2 v)$	Schnakenberg	[21]
$F(u, v) = a - u - 4uv / (1 + u^2),$ $G(u, v) = \delta[u - uv / (1 + u^2)]$	Lengyel-Epstein	[22]
$F(u, v) = -v + u + u^3,$ $G(u, v) = \epsilon(u - \alpha v - \beta)$	FitzHugh-Nagumo	[23]
$F(u, v) = \eta(u - av - Cuv - uv^2),$ $G(u, v) = \eta(bu + hv + Cuv + uv^2)$	BVAM	[3]

La tercera cinética corresponde al modelo de Gierer-Meinhardt, que fue introducido para estudiar la formación de estructuras biológicas mediante inestabilidades de Turing. Esta cinética es representativa de sistemas generalmente conocidos como activador-inhibidor. El modelo Gierer-Meinhardt ha sido aplicado, entre otras cosas, para representar los patrones que aparecen en las conchas de ciertos moluscos, como los caracoles marinos [15].

El modelo de Gray-Scott fue construido como una primera aproximación al fenómeno de la glicólisis dentro de las células [16]. Dicho modelo ha sido extensamente estudiado debido a su simplicidad.

Recientemente, nosotros hemos propuesto este modelo como un mecanismo mediante el cual se forma un patrón químico que sirve como vías para conectar neuronas en el tejido nervioso de manera quimotáctica [17].

El *Brusselator* es un modelo pensado para describir reacciones autocatalíticas, proceso muy común en la naturaleza, y fue propuesto por Prigogine y su equipo [18]. El *Brusselator* ha sido ampliamente estudiado y recientemente se ha utilizado para estudiar la dinámica de sistemas de capas acopladas que presentan la inestabilidad de Turing [19].

El *Oregonator* es un modelo simplificado de la reacción química conocida como la reacción de Belousov Zhabotinskii. Este modelo ha sido utilizado exitosamente para producir diversos tipos de patrones espaciales y también para modelar el crecimiento dinámico de poblaciones de bacterias [20].

Una simplificación extrema del *Oregonator* es el modelo de Schnakenberg [21], que presenta las principales características del modelo general, por lo cual es muy usado como prueba en muchas teorías.



El primer patrón de Turing fue observado experimentalmente en 1990, estudiando una reacción química conocida como CIMA (*chlorine-iodine-malonic acid*) [22]. El modelo de Lengyel-Epstein fue creado para representar la dinámica de dicha reacción.

El penúltimo caso, conocido como el modelo de FitzHugh-Nagumo es el "modelo de un modelo". El original es conocido como el modelo de Hodgking-Huxley que fue concebido para estudiar el axón de un calamar gigante y ha sido utilizado exitosamente para el estudio de la propagación de pulsos en todo tipo de membranas de células nerviosas. Este modelo es necesariamente complicado, por lo que el FitzHugh-Nagumo lo simplifica, capturando sus principales características [23]. Este modelo es el paradigma de los llamados medios excitables.

Por último tenemos al modelo BVAM [3], que se puede ver como una generalización de algunos de los modelos anteriores. Por ejemplo, la ecuación de Fisher es un caso particular del modelo BVAM si en éste ponemos  $u = v$ ,  $\mu = \eta$ ,  $C = 1/K$  y todos los demás parámetros igual a cero. El modelo de Lotka-Volterra también se puede ver como un caso particular del modelo BVAM, si se desprecian los términos de orden cúbico.

##### 5. APLICACIÓN A LA PIGMENTACIÓN DE LA PIEL DE PECES MARINOS

En 1995 Kondo y Asai [24] publicaron un artículo en el cual sugerían que el patrón de pigmentación característico de algunas especies de peces marinos de la familia *Pomacanthus* se debía a una inestabilidad de Turing. Ellos basaron sus afirmaciones en la peculiar manera en la cual la longitud de onda del patrón se conserva durante el crecimiento del pez, pero sus cálculos fueron hechos en una dimensión, por lo cual era dudosa esta afirmación.

Dichos peces presentan un patrón vertical o semicircular rayado cuando son jóvenes. El mismo patrón es común a todas las especies de la misma familia de peces ángeles, lo cual se piensa tiene su origen evolutivo en la prevención del canibalismo selectivo de parte de los adultos. Cuando llegan a la fase adulta, el diseño cambia dramáticamente al patrón característico de cada especie. En un estudio hecho por Barrio *et al.* [25] se hicieron numerosos cálculos numéricos en **dos dimensiones**, usando el modelo BVAM para obtener el patrón de pigmentación típico del *Pomacanthus imperator* durante su crecimiento.

En la figura 4 mostramos algunos resultados obtenidos. Note que el las figuras se pueden detectar dos mecanismos causantes de la conservación de la longitud de onda del patrón que son los predichos por el modelo de Turing, esto es, la bifurcación de líneas y la inserción

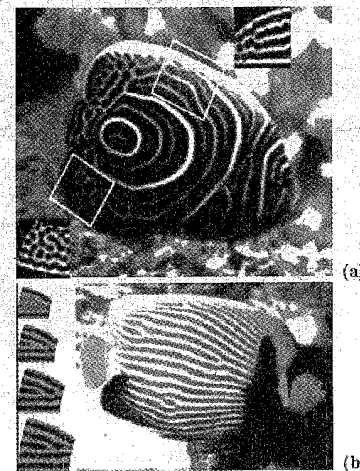


Figura 4. (a) Forma juvenil del pez *Pomacanthus imperator*. (b) Apariencia adulta del mismo pez. Los recuadros corresponden a las simulaciones numéricas.

de un nuevo motivo entre dos líneas. Estos resultados fueron corroborados observando los cambios presentados en la pigmentación del pez vivo mientras crecía.<sup>2</sup>

En la figura 5 mostramos una serie de fotografías tomadas a lo largo de seis meses que muestran dichos cambios.

Para poder obtener patrones alineados horizontalmente con el modelo BVAM, sugerimos la existencia de fuentes de morfógenos en la espina dorsal del pez, de tal manera

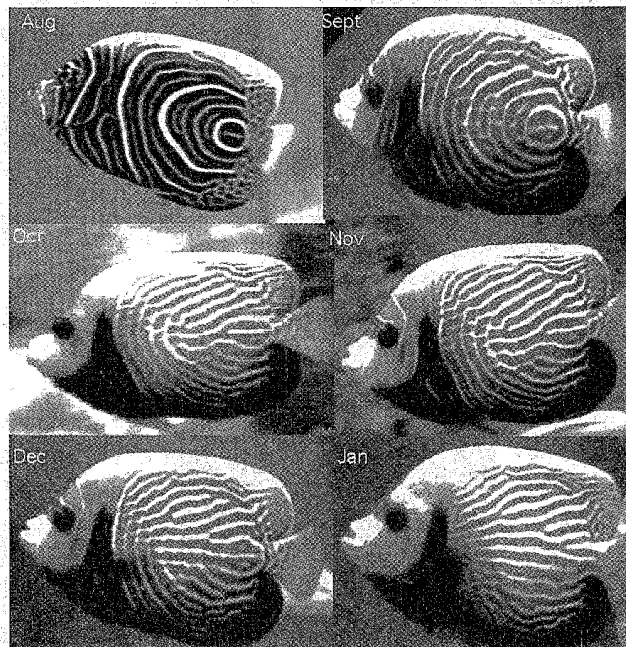


Figura 5. Serie de fotografías tomadas al pez durante su crecimiento en el tiempo de cambio de pigmentación. Los intervalos corresponden a un mes aproximadamente.

<sup>2</sup> Después de cuatro años sin crecer (el pez deja de crecer si el ambiente en el que se encuentra no tiene suficiente espacio), los cambios en el patrón comenzaron a ocurrir rápidamente, en cuestión de semanas.

que la combinación que las condiciones de frontera junto con la forma del dominio produjeron los patrones observados. En este trabajo, también se propuso que la modulación del coeficiente de difusión en algunas direcciones podría producir un patrón alternado de puntos y rayas, característico de otras especies de peces. Patrones más complicados se pueden modelar mediante el acoplamiento (lineal o no lineal) de dos o más sistemas de Turing. Esta idea ha sido exitosa para la obtención de muchos patrones observados en la piel de los peces [25]. En la figura 6 mostramos algunos ejemplos numéricos de dos sistemas de Turing acoplados con los patrones mostrados por diversas especies de peces.

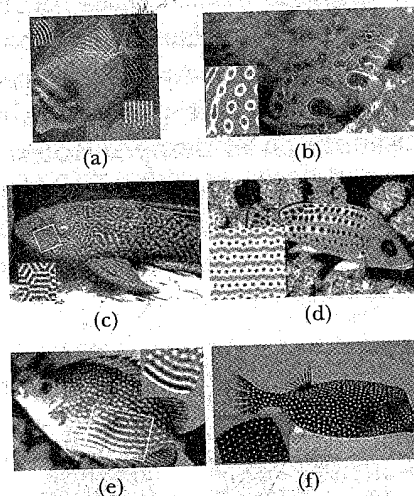


Figura 6. Ejemplos de pigmentación de la piel de varias especies de peces que fueron modelados con el sistema BVAM, acoplando dos sistemas en capas. Los cálculos numéricos se muestran en los recuadros. (a) *Zebrasoma veliferum*, (b) *Synchiropus picturatus*, (c) *Hypostomus plecostomus*, (d) *Pomacanthus Maculatus*, (e) *Siganus vermiculatus* y (f) *Ostracion meleagris*.

## 6. PATRONES EN DOMINIOS CURVOS

Cuando un dominio bidimensional cambia su forma en el tiempo y en el espacio, las ecuaciones de Turing tienen que modificarse. Básicamente, las diferencias en las ecuaciones se deben a la aparición de un término advectivo en las derivadas temporales y la sustitución del laplaciano por el operador de Laplace-Beltrami, el cual toma en cuenta los efectos locales de la curvatura del dominio en el cual se lleva a cabo la reacción [26]. Así es posible estudiar los cambios característicos que muestran los patrones de Turing en dominios que crecen o en superficies curvas.

Es interesante estudiar los patrones formados cuando los dominios crecen en escalas de tiempo similares al tiempo necesario para que el patrón se forme. En la figura 7(a) mostramos un patrón de puntos en un cuadrado que crece linealmente en el tiempo. Nótese que los dos mecanismos necesarios para la conservación de la longitud de onda están presentes, esto es: la división de puntos y la inserción de nuevos puntos entre éstos.

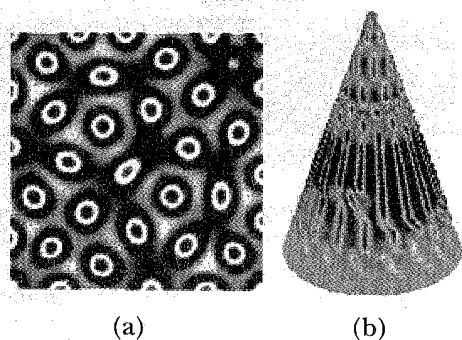


Figura 7. (a) Patrón obtenido con el modelo BVAM en un dominio cuadrado que crece en el tiempo. (b) En un cono que crece.

En la figura 7(b) se puede ver un patrón de puntos que se forma en un cono que crece en el tiempo. Observe que los puntos se convierten en rayas alineadas en ciertas regiones del cono. Es claro que el patrón se modifica por la geometría del cono, produciendo un patrón comúnmente observado en las colas de algunos reptiles, tales como las lagartijas.

Patrones en dominios con curvatura constante son de particular interés, ya que se observan en diversos organismos, tales como los radiolarios y virus. Utilizamos el modelo BVAM para obtener de manera numérica las simetrías que aparecen en patrones de Turing formados en esferas [27]. En este estudio se constató que los puntos siempre se acomodan en posiciones regulares, dependiendo del radio de la esfera. Algunas simetrías icosaédricas aparecen persistentemente. Los patrones rayados son muy interesantes debido a la existencia de singularidades, no necesariamente en polos opuestos. Cuando el radio de la esfera es conmensurada con la longitud de onda aparecen patrones de *target* (blanco de tiro). Ejemplos de estos cálculos se muestran en la figura 8.

## 7. SISTEMAS DE TURING ACOPLADOS

En los últimos años ha habido una serie de artículos sobre patrones oscilantes en el tiempo. Éstos son producidos mediante el acoplamiento lineal de dos sistemas de Turing, que en los artículos mencionados corresponden al *Brusselator* [28], al *Oregonator* [29] y al modelo de Lengyel-Epstein [30]. Estos modelos consisten en dos capas químicamente activas separadas por una capa intermedia inerte que permite el transporte de las diversas sustancias a través de ella. El acoplamiento está hecho de tal

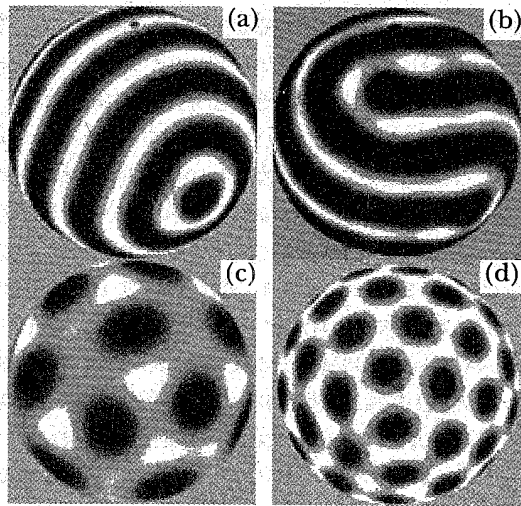
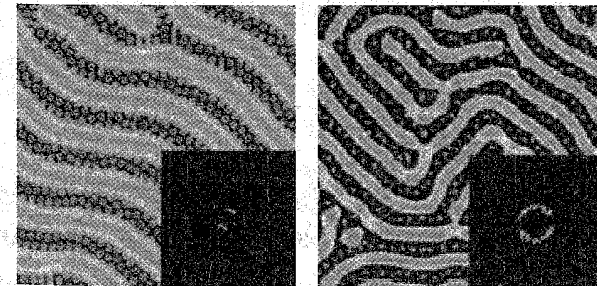


Figura 8. Patrones obtenidos con el modelo BVAM en superficies esféricas de diferente tamaño. En (a) y (b) sólo existe una no-linealidad cúbica. En (c) y (d) se agrega un término cuadrático.

manera que el punto fijo (en ausencia de difusión) de las diversas cinéticas se conserva, y los diferentes parámetros del sistema se escogen de tal forma que dos modos, correspondientes a diferentes longitudes de onda, sean excitados en forma resonante, lo cual resulta en una superposición de patrones de Turing espaciales. Por ejemplo, se pueden obtener patrones de puntos dentro de un patrón de rayas (o viceversa), o patrones de puntos con diferentes tamaños, entre muchos otros. En un estudio reciente [31] se hicieron experimentos en un reactor químico compuesto por dos capas que cumplen las especificaciones anteriores y que permiten corroborar las predicciones teóricas.

Hay situaciones en las que la capa intermedia puede ser químicamente activa (tal como sucede en membranas

biológicas) y la dinámica resultante de esto puede ser más complicada que la simple interferencia debida a un fenómeno de difusión selectiva de compuestos químicos. Tales casos pueden ser modelados mediante el acoplamiento no lineal de sistemas de Turing. En un trabajo reciente, Kytä y Barrio [19] hicieron un estudio numérico de estos casos utilizando la cinética química correspondiente al Brusselator, con acoplamientos no lineales cuadráticos y cúbicos. En la figura 9 se pueden comparar los patrones formados mediante un acoplamiento cúbico y uno lineal. Los dos patrones lucen similares ya que la intensidad del acoplamiento en este caso es pequeña. En este trabajo también se encontró que la apariencia de los patrones a los que convergen los sistemas acoplados, dependen sensiblemente de la intensidad del acoplamiento. Si el acoplamiento es débil, aparecen resonancias y los patrones se muestran como la superposición de los patrones correspondientes a cada capa. Por otro lado, si el acoplamiento es fuerte, el sistema con longitud de onda mayor domina la dinámica, y el patrón final se vuelve



(a)

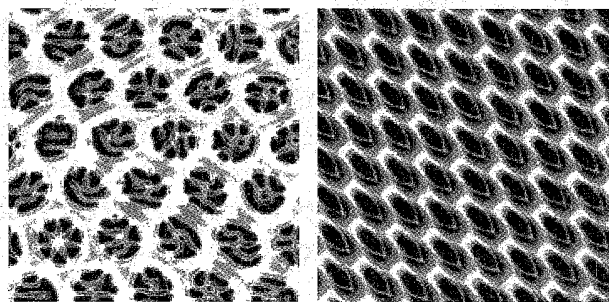
(b)

Figura 9. Patrones oscilantes de puntos dentro de rayas, obtenidos con un acoplamiento de dos bruscladores. (a) Acoplamiento lineal, (b) acoplamiento cúbico.



muy simple. Si la intensidad del acoplamiento se encuentra entre estos dos casos, aparecen nuevos patrones cuyas simetrías y complejidad son muy diferentes a los patrones de Turing normales y a la superposición entre ellos.

En la figura 10 mostramos dos patrones obtenidos mediante acoplamiento cúbico entre las capas y con valores diferentes para el parámetro de acoplamiento, estas figuras fueron tomadas de [19].



(a)

(b)

Figura 10. (a) Patrones oscilantes de rayas dentro de puntos, obtenido con un acoplamiento cúbico intermedio. (b) Patrón de "lanchas" obtenido con un acoplamiento cúbico fuerte.

## 8. BIESTABILIDAD Y ONDAS VIAJERAS

Como ya hemos mencionado, uno puede obtener diferentes comportamientos espacio-temporales, si uno se sale de la región de Turing en el espacio de parámetros. En el modelo BVAM, esto sucede cuando se relaja la condición  $\gamma = -a$ , lo cual significa que aparecen dos nuevos puntos fijos, en  $v = \pm \sqrt{(\alpha g - 1)/\alpha g r_1}$  y  $u = -g v$ , donde  $g = (\alpha + \beta)/(\alpha + \gamma)$ .

Cuando ambos puntos son estables, existe una situación análoga a un sistema termodinámico en la descomposición espinodal, en la que dos fases estables coexisten y evolucionan en el tiempo. Por otro lado, si además uno pide que los químicos se difundan igual, es decir  $D = 1$ , y se utilizan los siguientes parámetros  $h = -2.5$ ,  $\eta = 1$ ,  $C = 0$  se obtiene el diagrama de fases mostrado en la figura 11.

En la región 2 el punto fijo en  $(0,0)$  es inestable y los otros dos puntos fijos son estables, en este régimen es posible predecir la existencia de frentes de ondas viajeras, una característica casi universal de los sistemas de reacción difusión biestables [32]. La existencia de dichos frentes de onda fue corroborada numéricamente en una

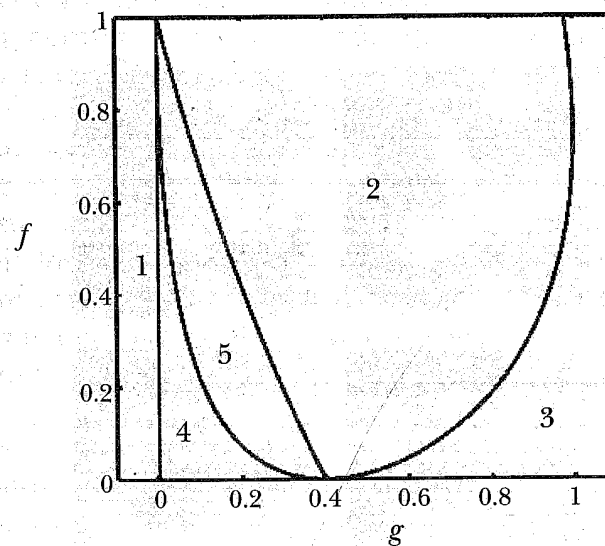


Figura 11. Diagrama de fases del modelo BVAM cuando éste presenta tres puntos fijos, dando la posibilidad de biestabilidad. El espacio corresponde a  $C = 0$ . El carácter de los eigenvalores cambia en cada región numerada. En la región 2 hay modos oscilantes estables y en la región 5 éstos se vuelven inestables.

y dos dimensiones. En una dimensión, la velocidad del frente es constante y es proporcional a la integral de los *campos* sobre todo el espacio, lo que implica que los frentes simétricos alrededor del cero no se mueven. Estos frentes simétricos o estados estacionarios son inestables, por lo que cualquier perturbación alrededor de ellos tiene como consecuencia la aparición de un frente asimétrico que se mueve con velocidad constante.

Mucho más interesante es el caso en dos dimensiones, ya que la velocidad de los frentes depende de su curvatura local. Esto tiene como consecuencia que los frentes comiencen a rotar alrededor de los puntos donde la curvatura cambia de signo. Esto se ve en los cálculos numéricos mostrados en la figura 12.

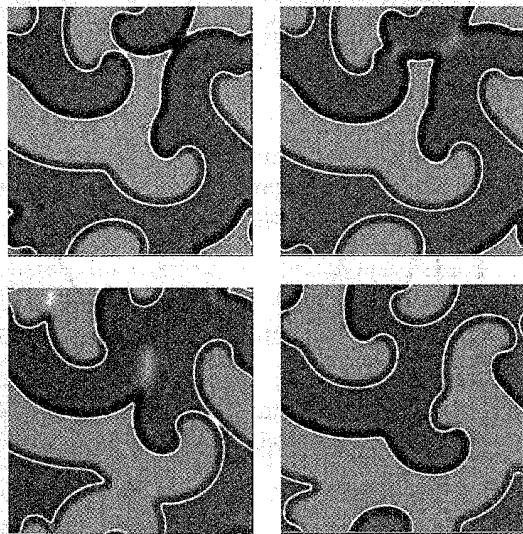


Figura 12. Fotos sucesivas de ondas viajeras en dos dimensiones. Observe que los puntos donde la curvatura del frente cambia de signo no se mueven.

Dichas ondas son muy similares a las ondas observadas en la actividad eléctrica en el corazón de los pollos [33], lo cual abre una posibilidad para el modelo BVAM en lo que respecta a la modelación de fenómenos cardíacos.

Hemos visto ya que el modelo BVAM (entre otros) es útil para modelar los patrones de pigmentación que aparecen en la piel de algunos animales, y que para modelar casos de patrones especialmente complejos, se pueden utilizar dichos sistemas acoplados de diferentes maneras.

La idea de acoplar más de un sistema de reacción-difusión es especialmente útil para modelar la pigmentación en la piel de algunos vertebrados, ya que la piel de éstos está formada esencialmente por dos capas diferentes: la dermis y la epidermis, las cuales están separadas por una estructura conocida como membrana basal. Esta membrana permite la comunicación química entre las dos capas, lo cual implica que las reacciones químicas que suceden en una de ellas son influenciadas por las reacciones que ocurren en la otra capa.

Por otro lado, de los ejemplos de patrones de Turing en sistemas acoplados dados hasta ahora, podemos inferir que los patrones, aunque más complejos en lo que se refiere a su estructura espacial, siempre están ordenados, es decir que hay escalas espaciales bien definidas, y las diferentes estructuras, ya sean rayas o puntos (o combinaciones de ambos), siempre se encuentran a una distancia típica. Para obtener patrones espaciales más desordenados, podemos relajar la condición sobre la existencia de un solo punto fijo para la cinética química ( $\alpha = -\gamma$  en el BVAM) en una de las capas, permitiendo además que los parámetros usados se encuentren fuera de la región de Turing, lo que produciría la formación de otro tipo de estructuras espacio temporales (frentes de onda, por ejemplo).

Una aplicación particular de esto último, se puede ver en la modelación de los patrones característicos de la piel de algunas especies de peces de agua dulce originarias de varios lugares de Sudamérica.

Para esto utilizamos el modelo BVAM, escrito en la forma en que aparece en la tabla 1. Mencionamos ya que cuando el término cuadrático es  $C = 0$  y el sistema está en la región 2 (pero cerca de la frontera con la región 5) del diagrama de fases mostrado en la figura 11, tenemos frentes de onda que conectan las dos fases igualmente estables de la cinética. Si comenzamos a aumentar el valor del término cuadrático desde cero, las dos fases estables dejan de ser simétricas (igualmente estables), dando lugar al crecimiento de una de ellas a costa de la otra. Entonces se forman diferentes estructuras estacionarias que van desde laberintos hasta puntos desordenados [34]. Algunos de estos patrones pueden ser comparados con los patrones exhibidos por ciertas especies de peces de agua dulce, tal como se muestra en la figura 13.

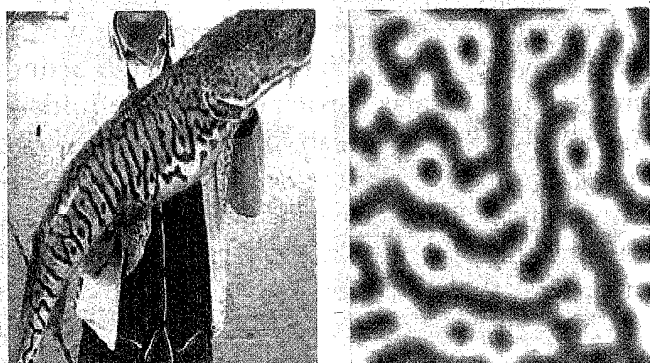


Figura 13. Izquierda: *Pseudoplatystoma fasciatum* (Surubim pintado), especie de pez gato originaria del Amazonas. Derecha: Cálculo numérico obtenido con el modelo BVAM en una sola capa, con  $D = 1$  y  $C = 0.82$ .

Si se disminuye la razón entre coeficientes de difusión, y se aumenta el valor de  $C$  desde cero, las estructuras de los patrones se vuelven estacionarias, obteniendo así patrones de tipo laberinto, puntos desordenados, o una combinación de ellos. Esto se puede ver en la figura 14, donde se muestra un estudio numérico del tipo de patrones que aparecen en la misma región del diagrama de fase, conforme el parámetro  $C$  se aumenta.

Los patrones de puntos desordenados, del tipo mostrado en la figura 14(f), son muy comunes en una especie de mantarraya de agua dulce del Amazonas. En la pigmentación del pez se observa que alrededor de dichos puntos además existe otro patrón, cuya longitud de onda característica es más pequeña que el tamaño de los puntos.

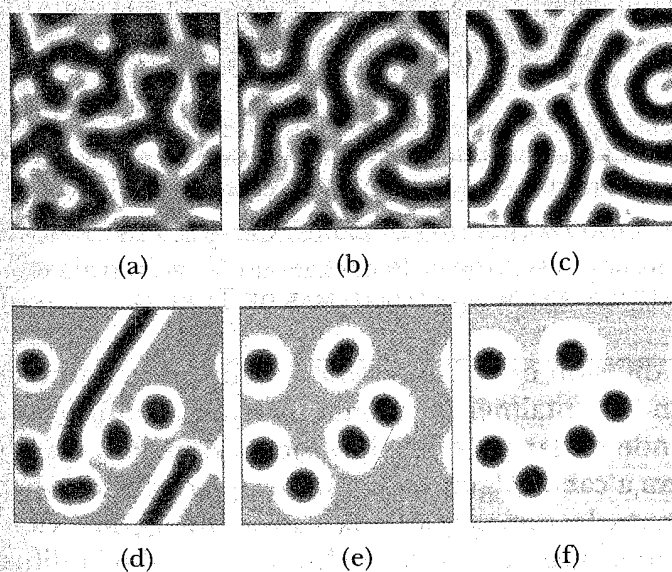


Figura 14. Patrones obtenidos con  $D = 0.516$ ,  $\eta = 0.35$ ,  $h = -2.5$ ,  $f = 0.65$  y  $g = 0.165$ . Los valores del término cuadrático  $C$  son, respectivamente, (a) 0.0, (b) 0.30, (c) 0.60, (d) 0.70, (e) 0.71 y (f) 0.72.

Estos patrones se pueden modelar acoplando dos sistemas de Turing idénticos, una capa debe estar en la región del espacio de parámetros donde se forman puntos desordenados, mientras que la otra debe estar en la región de Turing. En la figura 15 se muestra un cálculo numérico hecho de esta forma y el patrón real que se quiere modelar. Este estudio ha sido publicado en la referencia [34].

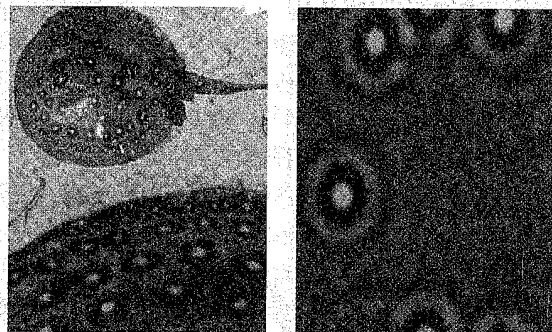


Figura 15. Izquierda: mantarraya de agua dulce del Amazonas (*Potamotrygon schroederi*). Derecha: cálculo numérico utilizando dos capas con la cinética química del modelo BVAM. El acoplamiento es lineal.

## 9. DIFUSIÓN ANÓMALA EN SISTEMAS DE TURING

La difusión es un fenómeno común en la naturaleza y es fundamentalmente un mecanismo de transporte que depende de las propiedades físicas del medio en el cual se lleva a cabo. Algunas de estas propiedades son: la temperatura, la dimensión y la estructura geométrica del espacio o sustancia en la cual se lleva a cabo la difusión, o del tipo de interacción entre la sustancia que se difunde y la sustancia en la cual ocurre este fenómeno. Hasta ahora hemos supuesto al modelar la difusión que el medio donde

se lleva a cabo es isotrópico y homogéneo, propiedades que no siempre se cumplen en sistemas biológicos, tales como tejidos vivos y membranas celulares [35]. La principal característica del fenómeno difusivo con todas estas suposiciones hechas *a priori*, es que el desplazamiento cuadrático medio crece linealmente con el tiempo. Sin embargo, existen muchas situaciones reales donde este crecimiento no es lineal, sino que está dado por [36]:

$$\langle x^2 \rangle \propto t^\gamma. \quad (21)$$

Los procesos difusivos que cumplen con esta ecuación definen la **difusión anómala** y pueden ser clasificados de acuerdo al valor del exponente anómalo  $\gamma$ . Para  $\gamma > 1$  el fenómeno difusivo se conoce como *superdifusión*, mientras que si  $\gamma < 1$  tenemos *subdifusión*.

Ahora bien, hemos visto ya que la difusión juega un papel fundamental en lo que respecta a la aparición de patrones de Turing, por lo que es interesante investigar la inestabilidad de Turing en presencia de difusión anómala. Una manera de describir esta difusión es reemplazando los operadores diferenciales de la ecuación (1) por operadores integro-diferenciales conocidos como derivadas fraccionarias. Al hacer esto el sistema toma la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \frac{{}^c \partial^\alpha u}{\partial t^\alpha} &= \chi \nabla^\beta u + \eta F(u, v), \\ \frac{{}^c \partial^\gamma v}{\partial t^\gamma} &= \nabla^\delta v + \eta G(u, v), \\ \nabla^\beta &= \sum_{i=1}^3 \left( s_{x_i} ({}_{-\infty} D_{x_i}^\beta) + (1 - s_{x_i})_{x_i} D_\infty^\beta \right), \\ \nabla^\delta &= \sum_{i=1}^3 \left( r_{x_i} ({}_{-\infty} D_{x_i}^\delta) + (1 - r_{x_i})_{x_i} D_\infty^\delta \right), \\ 0 < \alpha, \gamma \leq 1; \quad 1 < \beta, \delta \leq 2; \quad 0 \leq s_{x_i}, r_{x_i} \leq 1. \end{aligned} \quad (22)$$



Donde la variable  $x_i$  con  $i = 1, 2, 3$  corresponde a las tres direcciones espaciales.

En la ecuación (24) las derivadas fraccionarias en el tiempo modelan el tipo de subdifusión caracterizado por la ecuación (23), y los parámetros  $\alpha$  y  $\gamma$  corresponden a los exponentes anómalos de cada compuesto. De la misma forma, las derivadas fraccionarias en el espacio modelan superdifusión con exponentes anómalos  $\beta$  y  $\delta$  para cada compuesto.

Los parámetros  $r_{xi}$  y  $s_{xi}$  nos dicen qué tan asimétrica es la superdifusión, ya que en este caso una sustancia puede difundirse de forma diferente en cada dirección. En la ecuación (22) la notación de la razón entre los coeficientes de difusión se ha cambiado por  $\chi$ , para evitar confusiones con los operadores diferenciales espaciales.

Nótese que si en la ecuación (24) los exponentes anómalos ( $\alpha, \gamma$ ) y ( $\delta, \beta$ ) son uno y dos, respectivamente, recuperamos la ecuación (1), y la difusión es normal. La forma explícita de estos operadores fraccionarios está dada por:

$$\frac{\partial^\alpha u(X, t)}{\partial t^\alpha} = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \int_0^t (t-\tau)^{-\alpha} \frac{\partial u(X, t)}{\partial \tau} d\tau,$$

$$\frac{\partial^\delta u(X, t)}{\partial t^\delta} = \frac{1}{\Gamma(2-\delta)} \frac{\partial^2}{\partial X^2} \int_{-\infty}^{\infty} (X-Y)^{1-\delta} u(Y, t) dY, \quad (23)$$

$$0 < \alpha \leq 1, \quad 1 < \delta \leq 2.$$

El caso de superdifusión se modela usando derivadas espaciales fraccionarias y, utilizando el modelo BVAM, Varea y Barrio [37] encontraron que la asimetría direccional (parámetro  $s_{xi}$  en la ecuación (22)) causa que los

patrones de Turing se muevan con velocidad constante. En una dimensión, dicha velocidad es una función del exponente anómalo, mientras que en más dimensiones es una función de los exponentes anómalos correspondientes a cada dirección espacial. Esto tiene como consecuencia que los defectos característicos de los patrones de Turing desaparezcan fácilmente, alcanzando patrones perfectos (sin defectos) en menos tiempo que en el caso de difusión normal.

También mostraron que el intervalo de valores de  $\chi$  necesarios para la existencia de la inestabilidad de Turing crece, inclusive hasta el punto en que las dos sustancias se difunden igualmente ( $\chi = 1$ ) que, como ya vimos, es imposible cuando la difusión es normal.

Para mostrar los efectos que tiene la superdifusión asimétrica en dos dimensiones, en la figura 16 mostramos un patrón que rota en la superficie de una esfera donde, debido a que la velocidad del patrón es constante, uno puede ver vórtices en los polos de la esfera.

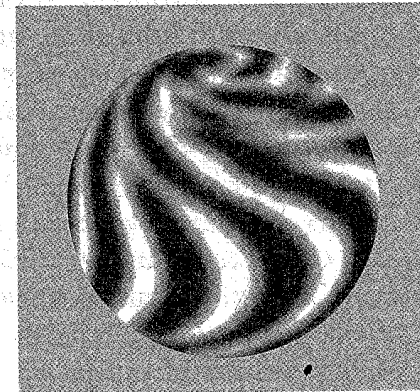


Figura 16. Patrón de Turing formado en presencia de superdifusión asimétrica rotando en la superficie de una esfera.

Para el caso en que se tiene sólo subdifusión, el sistema de reacción-difusión generalizado toma la siguiente forma [37]:

$$\begin{aligned} \frac{{}^c \partial^\alpha u}{\partial t^\alpha} &= D \nabla^2 u + \eta F(u, v), \\ \frac{{}^c \partial^\beta v}{\partial t^\beta} &= \nabla^\delta v + \eta G(u, v), \end{aligned} \quad (24)$$

$$0 < \alpha, \beta \leq 1.$$

En este caso, es posible mostrar que los patrones de Turing no difieren de los patrones formados con difusión normal, y que éstos aparecen en una región del espacio de parámetros mucho mayor que la región de Turing normal. Esto se debe a que en presencia de subdifusión, existe un valor crítico del exponente anómalo para el cual si los compuestos se difunden con un exponente anómalo menor a dicho valor crítico, la primera desigualdad de la ecuación (13) ya no es una condición necesaria para la estabilidad del estado homogéneo, lo cual implica a su vez que la condición  $\text{signo}(a_{11}) \neq \text{signo}(a_{22})$  puede ser relajada. De estos resultados se puede inferir que el conjunto de cinéticas químicas que pueden producir un patrón de Turing es mucho mayor en el caso de subdifusión. En la figura 17 se muestran dos patrones formados en presencia de subdifusión.

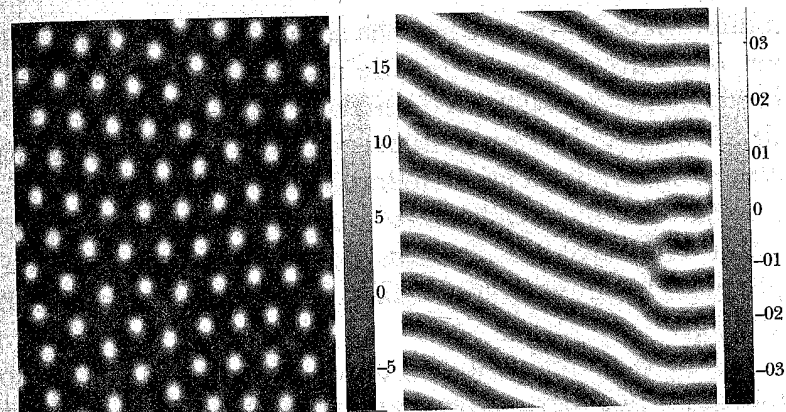


Figura 17. Ejemplos de patrones de Turing en presencia de subdifusión para dos compuestos con exponentes anómalos iguales  $\alpha = \beta$ . Los patrones se calcularon utilizando el modelo BVAM, donde los parámetros cumplen con  $a_{11} + a_{22} > 0$ ,  $\alpha < \alpha_c$ .

## 10. COMENTARIOS FINALES

En este trabajo hemos intentado dar una revisión de varios estudios usando ecuaciones de reacción-difusión para tratar varios aspectos de la morfogénesis. Aunque el título del mismo es muy general, no hemos pretendido hacer un compendio de todos los aspectos de la morfogénesis, la cual es actualmente una línea de investigación amplísima y que abarca muchos aspectos de la biología del desarrollo.

Nos hemos enfocado en discutir nuestro trabajo durante los últimos diez años, que tocan varios aspectos de las propiedades de un modelo de ecuaciones diferenciales parciales propuesto por nosotros, sin olvidar situarlo entre los muchos modelos útiles que se encuentran en la literatura. La característica de nuestro modelo es que,

a diferencia de los otros, no ha sido propuesto para resolver una cuestión específica de la formación de patrones espaciales, sino que fue diseñado en forma general obedeciendo simplemente las reglas fundamentales de la conservación de la masa de los ingredientes químicos. Es por esto que el modelo se ha mostrado útil y versátil para tratar muy diversos aspectos de la morfogénesis, cumpliendo cabalmente con las expectativas del propio Alan Turing.

Nuestras contribuciones, aunque modestas, han sido utilizadas por otros investigadores para estudiar diversos problemas, por ejemplo, el patrón de puntos de las catarinitas (*lady bugs*), las alas de las mariposas, la morfogénesis de los erizos marinos, entre otros.

Mucho del material usado aquí se encuentra en un artículo de revisión recientemente publicado en inglés [38] y aquí hemos agregado trabajo más reciente y adaptado algunos capítulos en forma más coherente.

Esperamos que este trabajo sea útil a nuestros colegas de habla española y sobre todo para los jóvenes estudiantes que se quieran adentrar en los temas de la morfogénesis.

Es evidente que de ninguna manera el potencial del modelo BVAM se ha agotado; en la actualidad existen muchos otros campos en los que puede ser utilizado como herramienta de investigación y entre los temas que aquí tocamos varios de ellos están inacabados y son objeto de estudios presentes y extensiones futuras. En particular los problemas de difusión anómala tienen relevancia si se quieren modelar procesos en tejidos vivos y las propiedades de los sistemas de reacción-difusión en dominios de capas nos acercan aún más a los estudios experimentales en las pieles de animales como las aves y los reptiles.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Conacyt, a través del proyecto núm. 79641. Queremos agradecer a nuestros numerosos colaboradores en los trabajos aquí esbozados: C. Varea, J. L. Aragón, K. Kaski, Teemu Leppänen, Mikko Kartunen, Klaus Kytta, Faustino Sánchez, R. Baker y P. K. Maini.

## REFERENCIAS

1. D'Arcy W. Thompson, *On growth and form* (abridged edition), Cambridge Univ. Press, Reino Unido (1961).
2. A. M. Turing, *A chemical basis of morphogenesis*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B237**, 37 (1952).
3. R. A. Barrio, C. Varea, J. L. Aragón y P. K. Maini, *A two-dimensional numerical study of spatial pattern formation in interacting Turing systems*, *Bull. Math. Biol.* **61**, 483 (1999).
4. V. Castets, E. Dulos, J. Boissonade y P. D. Kepper, *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2953 (1990).
5. P. K. Maini, K. J. Painter, H. N. P. Chau, *Faraday Transactions* **93** (20), 3601-3610 (1997).
6. B. J. Dickson, *Science* **298**, 1959 (2002).
7. J. D. Murray, *Mathematical biology*, Springer-Verlag, Berlín (1980).
8. S. Schnell, R. Grima, P. K. Maini, *Multiscale modeling in biology*, *Amer. Sci.* **95**, 134 (2007).
9. C. Varea, D. Hernández y R. A. Barrio, *Soliton behaviour in a bistable reaction diffusion model*, *J. Math. Biol.*, **54**, 797 (2007).
10. T. Leppänen, en *Current topics in physics*, R. A. Barrio y K. K. Kaski, editores, Imperial College Press, p. 199. (2005)
11. R. T. Liu, S. S. Liaw y P. K. Maini, *J. Korean Phys. Soc.* **50**, 234 (2007).
12. R. A. Fisher, *Ann. Eugenics* **7**, 353 (1937); ver también la referencia [7] p. 237.
13. V. M. Kenkre, *Physica A* **342**, 242 (2004).
14. Ver referencia [7], pp. 63-68.
15. A. Gierer, H. Meinhardt, *Kibernetik* **12**, 30 (1972).

16. P. Gray y S. K. Scott, *J. Chem. Phys.* **89**, 22 (1985).
17. O. Ávila, D. Hernández, R. A. Barrio y Limei Zhang, *Modeling neurite growth and guidance*, *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **10** (1), 5, (2007).
18. I. Prigogine, R. Lefever, *J. Chem. Phys.* **48**, 1695 (1968).
19. K. Kytta, K. Kaski y R. A. Barrio, *Complex Turing patterns in nonlinearly coupled systems*, *Physica A* **385**, 105 (2007).
20. R. J. Field y R. M. Noyes, *J. Chem. Phys.* **60**, 1877 (1974).
21. J. Schnackenberg, *J. Theor. Biol.* **81**, 389 (1979).
22. I. Lengyel y I. R. Epstein, *Science* **251**, 650 (1991).
23. R. FitzHugh, *Biophysics J.* **1**, 445 (1961); J. S. Nagumo, S. Arimoto y S. Yoshizawa, *Proc. IRE* **50**, 2061 (1962).
24. S. Kondo y R. Asai, *Nature* **376**, 765-768 (1995).
25. J. L. Aragón, C. Varea, R. A. Barrio y P. K. Maini, *FORMA* **13**, 154 (1998).
26. R. Plaza, F. Sánchez-Garduño, P. Padilla, R. A. Barrio y P. K. Maini, *Journal of Dynamics and Differential Equations* **16**, 1093 (2004).
27. C. Varea, J. L. Aragón y R. A. Barrio, *Phys. Rev. E* **60**, 4588 (1999).
28. L. Yang, M. Dolnik, A. Zhabotinsky e I. Epstein, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 208303 (2002).
29. L. Yang e I. Epstein, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 178303 (2003).
30. L. Yang e I. Epstein, *Phys. Rev. E* **69**, 026211 (2004).
31. I. Berenstein, M. Dolnik, L. Yang, A. Zhabotinsky e I. Epstein, *Phys. Rev. E* **70**, 046219 (2004).
32. J. D. Murray, *Mathematical biology II: spatial models and biomedical applications*, Springer-Verlag, Berlín (2003).
33. G. Bub, A. Shrier y L. Glass, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 058101 (2002).
34. R. A. Barrio, *et al.*, *Modeling the skin pattern of fish* (en prensa).
35. A. T. Winfree, *Int. J. Bifur. Chaos Appl. Sci. Eng.* **7**, 487 (1997).
36. J. P. Bouchaud y A. Georges, *Phys. Rep.* **195**, 127 (1991).
37. C. Varea y R. A. Barrio, *J. Phys. Condens. Matter* **16**, S5081 (2004).
38. D. Hernández, C. Varea, R. A. Barrio, *Dynamics of reaction-diffusion systems in a sub-diffusive regime* (en prensa).
39. R. A. Barrio en *Physics of emergence and organization*, I. Licata, A. Sakaji, editores, World Scientific, Singapur (2008).

## CAPÍTULO 19

### CORAZÓN: ASPECTOS DE SU FUNCIONAMIENTO Y PROPIEDADES FÍSICAS

OSCAR INFANTE\*

*Departamento de Instrumentación Electromecánica  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez*

#### 1. INTRODUCCIÓN

Empecemos por aceptar que el corazón es una bomba muy peculiar, muy resistente, muy redundante, muy compleja, muy cuidadosamente regulada y con muchas otras características más, pero bomba al fin. Dejaremos de lado los aspectos evolutivos de este órgano que tan finamente ha sido moldeado con el transcurrir del tiempo hasta estar espléndidamente adaptado a las diferentes demandas que al organismo que lo porta le exige su entorno, ya sea en lo referente a su ambiente físico o al de competencia biológica. Nos centraremos en aspectos del corazón de los mamíferos superiores de acuerdo con los biólogos, enfocados principalmente en el hombre como cumbre de esta evolución según nosotros mismos nos clasificamos. En cada caso haremos énfasis en aquellas características en las que las herramientas de la física y la matemática han contribuido de manera sustancial a comprender mejor la función y la patología (y por ende al

\* infante@cardiologia.org.mx

diagnóstico y tratamiento) del sistema cardiovascular, cuyo sufrir ha llevado a que en los seres humanos, la principal causa de muerte sea precisamente la enfermedad cardíaca, tanto en la actualidad como en los años por venir, según la evaluación de la Organización Mundial de la Salud en 2008 [1]. Aunque lo anterior conlleva al planteamiento de problemas formidables para el actual conocimiento físico y matemático, aquí sólo se comentarán algunos de estos aspectos a un nivel introductorio, dejando en todo caso esbozados ciertos tópicos que requieren de más antecedentes de los que aquí se pretenden.

Así, en la primera sección veremos a la *bomba cardíaca* como un artificio que impulsa la sangre mediante la generación de un gradiente de presión determinada y dándole con ello propulsión en una dirección específica, favorecido esto último por válvulas unidireccionales adecuadamente orientadas (ver figura 1). Aquí se cubrirán conceptos de hidrostática e hidrodinámica asociados a la *contractilidad cardíaca*.

Por otro lado y dado que, para que el corazón funcione adecuadamente, existe un muy delicado proceso de sincronía sustentado principalmente en impulsos eléctricos, en la segunda sección se verán elementos del *potencial de acción cardíaco* y su acoplamiento con la *contracción miocárdica*, pasando luego a revisar el *electrograma cardíaco* y enseguida ver el *electrocardiograma* y algunos modelos para el caso.

Con esto y como uno de los aspectos que a últimas fechas más se está estudiando en el ámbito de la cardiología es aquel relacionado a la naturaleza de la *regulación y control de la función cardiovascular*, en la tercera sección veremos tal cosa, iniciando por reconocer al *sistema nervioso simpático y parasimpático* en su interactuar con el sis-

tema circulatorio, lo que se ha estudiado profusamente mediante el *análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca* como herramienta para el examen de la *cibernética y complejidad cardiovascular*, la cual repasaremos en esta tercera sección, para de aquí pasar finalmente a inspeccionar al *reflejo barorreceptor*.

## 2. LA BOMBA CARDIACA

El corazón es un órgano muscular hueco conformado por cuatro cavidades contráctiles (dos *ventrículos* y dos *aurículas*, ver figura 1), que impulsa la sangre (cerca de 85 ml por latido, o *volumen latido*) generando un gradiente de presión que desplaza al fluido en una dirección preferencial, favorecido esto por válvulas unidireccionales debidamente orientadas en los vasos y en el corazón. Este impulso tiene la función de llevar oxígeno ( $O_2$ ) y nutrientes (generalmente en la *sangre arterial*) a la economía corporal y recoger de ésta, principalmente mediante la *sangre venosa*, el bióxido de carbono ( $CO_2$ ) y el resto de los residuos que el metabolismo produce, aunque la sangre también transporta hormonas (y otros factores), además de que participa en el control de la temperatura corporal y en el proceso inmune entre otras funciones más.

Para describir la *circulación sanguínea*, iniciaremos con el impulso cardíaco que desde el *ventrículo izquierdo* (VI) del corazón (figura 1) envía la sangre oxigenada proveniente de los pulmones, hacia la *aorta* (pasando la unidireccional *válvula aórtica*), desde donde fluye al resto de la economía corporal (*circulación sistémica*) por las *arterias, arteriolas y capilares* (lecho este último en el que se realiza la permuta de sustancias metabólicas) para de aquí pasar



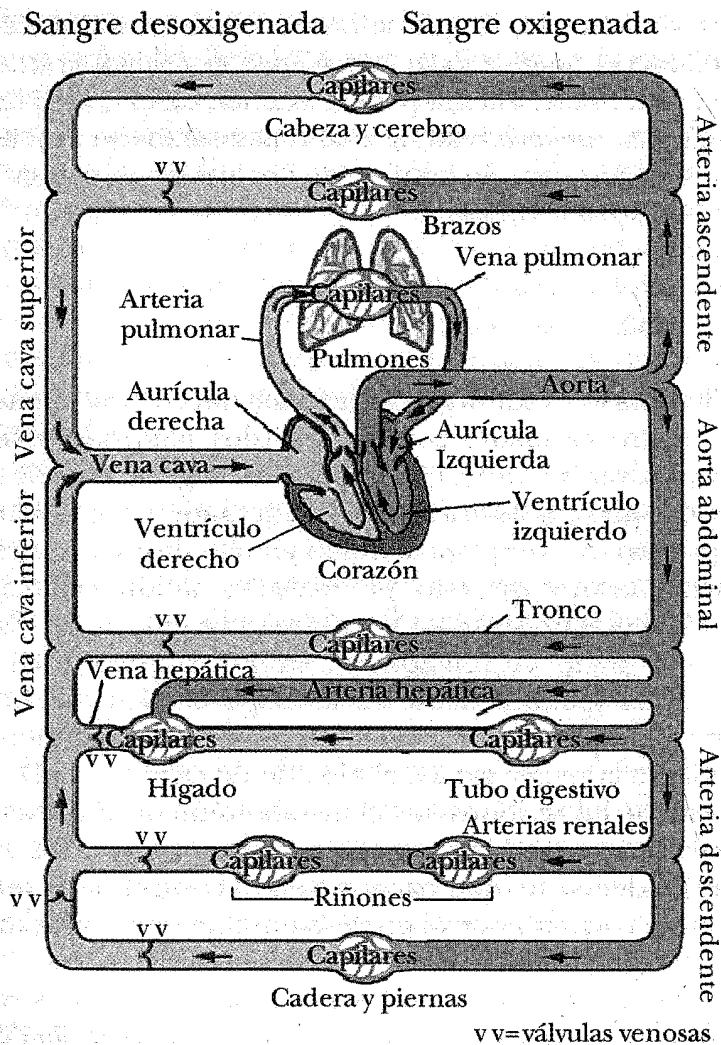


Figura 1. Esquema del sistema circulatorio indicando la dirección del flujo sanguíneo. A la derecha la circulación de la sangre oxigenada (arterial si excluimos las venas pulmonares) y a la izquierda la de la desoxigenada (venosa si omitimos la arteria pulmonar). Entre la aurícula y ventrículo se localiza la válvula mitral en el lado izquierdo y la tricúspide en el derecho. A la salida del ventrículo izquierdo está la válvula aórtica y en la del derecho, la pulmonar.

por las *vénulas* y *venas* hasta la *vena cava* que comunica con la *aurícula derecha* (AD) y de ésta, salvando la *válvula tricúspide*, al *ventrículo derecho* (VD), para iniciar la *circulación pulmonar* cuando el VD impulsa (por conducto de la *arteria pulmonar* y pasando antes por la *válvula pulmonar*) la sangre pobre en oxígeno y cargada de  $\text{CO}_2$ , a los pulmones, donde el  $\text{CO}_2$  se recambia por  $\text{O}_2$ , pasando así (vía la *vena pulmonar*) a la *aurícula izquierda* (AI), reiniciando el ciclo al pasar de aquí al VI, atravesando para el caso la *válvula mitral*. Las válvulas mencionadas (y las venosas de la figura 1) son unidireccionales.

La contracción (*sístole*) y relajación (*diástole*) periódica del corazón (el inverso del período en segundos por 60, entrega la *frecuencia cardíaca* en latidos por minuto) hace que éste actúe como una bomba pulsátil que, durante la *sístole* (ver figura 2), lleva en cada latido la presión interna del VI de 5 mmHg a 120 mmHg<sup>1</sup> sobre la atmosférica, mientras que la sangre en la aorta se encuentra al inicio del pulso (inmediatamente antes de la apertura de la válvula aórtica) a 80 mmHg (*presión diastólica* o PD) y en el máximo de la onda pulsátil a 120 mmHg (*presión sistólica* o PS). La sangre en el lado venoso alcanza una presión cercana a cero en la vena cava (o en a la *vena pulmonar*) antes de llegar a la AD (o a la AI), mientras que en la arteria pulmonar, a la salida del VD, se registran 10 mmHg de PD pulmonar y de 25 mmHg para la PS pulmonar (no mostrado en la figura 2). Así, el corazón actúa como una bomba hidráulica que lleva la sangre desde un sistema de baja presión (venoso) a uno de alta (arterial),

<sup>1</sup> En fisiología cardiovascular es usual medir la presión en mmHg (milímetros de mercurio), considerando que 7.5 mmHg = 1KPa. Recordaremos que un Pascal (Pa) es la fuerza de un Newton aplicada sobre un metro cuadrado ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y el bar en cgs ( $\text{dina}/\text{cm}^2$ ).



de donde la interacción geométrica y mecánica son factores a considerarse en la descripción del estado funcional del sistema circulatorio.

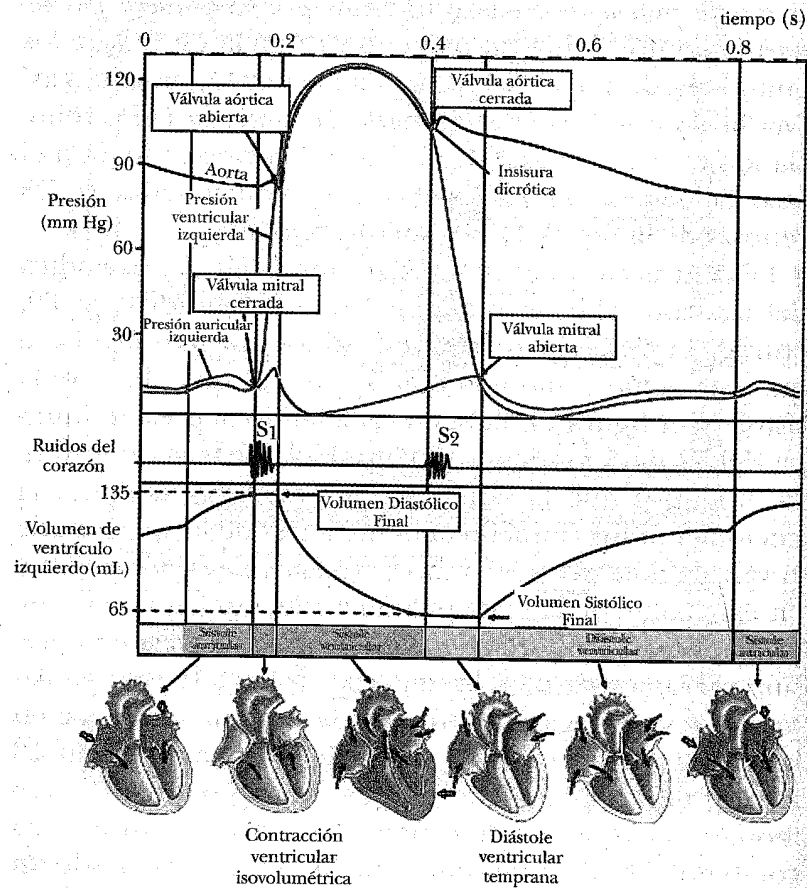


Figura 2. Curso temporal de la presión en la aorta y en el ventrículo y aurícula izquierdos, registrados mediante la colocación de un catéter en la luz de la cavidad. Se muestran también los ruidos cardíacos (S1 y S2) asociados al cierre y apertura de la válvula aórtica y el curso del volumen del ventrículo izquierdo.

## 2.1. Ley de Laplace

Tomando en cuenta que la presión intra-ventricular debe mantenerse a costa del estrés<sup>2</sup> en la pared muscular (*miocardio*), si aproximamos a los ventrículos por una esfera homogénea de paredes de ancho  $h$ , pero delgadas respecto a su radio  $r$ , y aplicamos la *Ley de Laplace*, el estrés parietal  $\sigma$  sobre la superficie del ventrículo sometido a una presión  $P$  sería (ver figura 3)

$$\sigma = Pr/(2h)$$

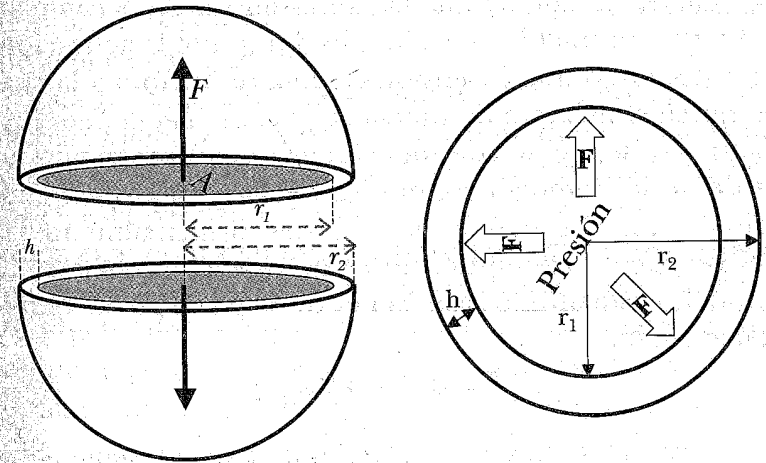


Figura 3. Viendo el ventrículo como una esfera homogénea de pared de ancho  $h$ , radio interior  $r_1$  y exterior  $r_2$ , la fuerza de la presión  $P$  estaría dada por  $F_p = P\pi r_1^2$ , mientras que la que mantiene a la pared en su lugar actuaría sobre  $h$  y estaría dada por el estrés  $\sigma$  en la propia área parietal:  $F_e = \sigma(\pi r_2^2 - \pi r_1^2) = \sigma\pi((r_1 + h)^2 - r_1^2)$ . En el equilibrio se da que  $P\pi r_1^2 = \sigma\pi((r_1 + h)^2 - r_1^2)$ , entonces  $Pr_1 = \sigma h(2 + h/r_1)$ , de manera que si  $h \ll r_1$ , tenemos  $\sigma = Pr_1/(2h)$ .

<sup>2</sup> Aquí definimos *tensión* como la fuerza soportada sobre una longitud de material (dinas/cm en unidades cgs), mientras que por estrés  $\sigma$  haremos referencia a tal relación pero respecto a una superficie (dinas/cm<sup>2</sup>).

de manera que, a un radio dado, el aumento de presión incrementa linealmente el estrés parietal como en una relación de Hooke,<sup>3</sup> lo que también hace ver que, conforme aumenta el volumen de la cámara, se requerirá incrementar la tensión parietal para generar la misma presión, de forma que corazones más pequeños serán en este sentido más eficientes.

Así, se comprende que para cierto estrés en el miocardio, la presión ejercida será menor cuanto mayor sea el diámetro (volumen) ventricular y viceversa, aunque en ese último caso ( $P$  mayor a  $r$  menor a cierto estrés) deberá tomarse en cuenta que las fibras miocárdicas cambian la fuerza contráctil con su longitud durante la activación, prevaleciendo una extensión óptima de la fibra a la cual se ejerce el máximo de fuerza contráctil (*Ley de Starling*). Tampoco dejaremos de mencionar que el ventrículo no es del todo homogéneo, que su forma es más bien elipsoidal y que el grueso de las paredes, principalmente las del ventrículo izquierdo, no es despreciable respecto al radio. En este último caso, la Ley de Laplace puede enunciarse como:

$$P = \sigma(1/r_1 + 1/r_2).$$

A pesar de lo básico, la relación de Laplace sigue atendiéndose para valorar la función cardíaca y su patología, por ejemplo al tratarse quirúrgicamente algunos casos de insuficiencia cardíaca,<sup>4</sup> padecimiento en el que la geometría

<sup>3</sup> Aunque generalmente los materiales biológicos no siguen una relación lineal sino una de tipo exponencial, en donde la rigidez del material se incrementa con la tensión.

<sup>4</sup> Patología caracterizada por la acentuada disminución de la capacidad contráctil miocárdica que lleva a una circulación sanguínea insuficiente para el soporte de las demandas metabólicas del organismo, restringiendo notablemente el quehacer cotidiano del paciente a pesar del tratamiento farmacológico máximo [2].

elipsoidal del VI frecuentemente pasa a una morfología más esferoidal y de mayor tamaño, lo que determina un estrés parietal excesivo que coadyuva a la claudicación funcional del ventrículo, lo que en ciertos casos puede subsanarse restableciendo quirúrgicamente la geometría elipsoide normal del VI [2, 3].

De la misma manera, una de las consecuencias de la hipertensión arterial ( $PS > 140$  mmHg o  $PD > 90$  mmHg), es la remodelación, esto es, el incremento del tamaño (hipertrofia) ventricular a consecuencia de esta patología que, además de limitar la distensibilidad para el llenado diastólico, baja la eficiencia en la producción de presión de acuerdo a la Ley de Laplace.

Esta ley también ayuda comprender cómo el *volumen sistólico final* (i.e., la cantidad de sangre que en el máximo de la contracción se mantiene en el ventrículo (ver figura 2), está parcialmente determinado por la presión contra la cual el VI expulsa la sangre (*postcarga*) dado que si, por ejemplo la presión en la aorta disminuye, el VI ha de producir menos estrés para expulsar la sangre, lo que reducirá el volumen sistólico final pues las fibras se acortarán en mayor medida que a una presión alta en vista de que, de acuerdo con la Ley de Laplace, requerirán menos tensión para obtener la presión necesaria para expulsar el volumen de sangre. Como la presión de salida se pone de manifiesto hasta que la válvula aórtica se abre, a este efecto se le denomina *postcarga* del VI.

En contraparte, la denominada *precarga* está vinculada con el *volumen diastólico final* (y consecuentemente con la presión a este tiempo) que como se dijo, está directamente relacionado con la fuerza de contracción miocárdica (a mayor volumen mayor fuerza contráctil) como lo mostró Starling desde 1918 (*Ley de Starling*).

Así, la bomba cardiaca genera una presión (ver figura 2) que provoca un flujo que lleva a la expulsión de alrededor de 85 ml de sangre en cada ciclo cardiaco (*volumen latido*) cuando el VI cambia de 150 ml al final de la diástole (*volumen diastólico final*), a 65 ml en el máximo de la contracción (*volumen sistólico final*), aunque hay que tomar en cuenta que estos volúmenes se ven alterados por diversos factores que van desde la frecuencia cardiaca (que interviene en el tiempo de llenado), hasta el efecto de Laplace (el radio ventricular interactúa con la presión ejercida), pasando por influencias neuronales (que vía el sistema nervioso autónomo altera la frecuencia y la fuerza de la contracción cardiaca), hormonales, de temperatura y del retorno venoso por enumerar algunas. En la sección 4 se comentará más al respecto.

## 2.2. Trabajo cardiaco

Dado que la tarea principal del corazón es forjar presión a costa de tensión parietal, su demanda energética está supeditada a estos requerimientos en el miocardio, lo que ayuda a comprender por ejemplo el mayor reclamo metabólico del corazón ocasionado por la *hipertensión arterial* (PS > 140 mmHg o PD > 90 mmHg) en razón de que el incremento de la tensión parietal conlleva a un aumento en la exigencia energética, recordando que el actuar de la presión (dada en **dinas/cm<sup>2</sup>** por ejemplo) es energía (**ergios** en unidades **cgs**) por volumen y éste dado en **cm<sup>3</sup>**, como se comprende fácilmente bajo un simple cambio de unidades:

$$\frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2} \frac{\text{cm}}{\text{cm}} = \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^3} = \frac{\text{ergios}}{\text{cm}^3}$$

lo que pone de manifiesto que el trabajo interno realizado por el miocardio (que se refleja en generación de calor) está en función de la presión y del volumen sostenidos (principalmente durante la fase en la que se ejerce presión sin cambio en el volumen, contracción isovolumétrica en la figura 2), aunque el trabajo externo ( $dW$ ) ejercido por el corazón (patente principalmente desde el final de la contracción isovolumétrica, cuando se alcanza el volumen diastólico final, hasta el final de la diástole temprana, cuando se alcanza el volumen sistólico final, ver figura 2) vendrá dado por el producto de la presión ( $P$ ) por el volumen de sangre bombeado ( $dV$ ):

$$dW = PdV$$

como se muestra mediante compatibilidad de unidades:

$$\frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2} \text{cm}^3 = \text{dinas cm} = \text{ergios.}$$

Con esto, el trabajo mecánico ( $W$ ) ejercido por el ventrículo durante un ciclo cardiaco vendría dado por

$$W = \int_{V_{df}}^{V_{sf}} \bar{P} dV,$$

donde  $V_{df}$  indica el volumen diastólico final y  $V_{sf}$  el correspondiente al sistólico final (ver figura 2), aun cuando una expresión completa del trabajo cardiaco debería considerar la suma de los efectos presivos con la energía cinética otorgada al torrente sanguíneo en cada pulsación. Para esto y a fin de simplificar el cálculo, usualmente se considera al trabajo mecánico cardiaco como el resultado

del producto de la presión media ( $\bar{P}$ ) por el volumen latido ( $V_1 = V_{df} - V_{sf}$ ) más la energía cinética otorgada a la sangre de masa  $m$  y velocidad  $v$ :

$$W = \bar{P}V_1 + \frac{1}{2}mv^2,$$

donde

$$\bar{P} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} P(t) dt,$$

con  $t_1$  a  $t_2$  cubriendo el tiempo de un ciclo cardiaco específico. Por ejemplo, si en un latido consideramos la presión media como de 100 mm Hg, un volumen latido ( $V_1$ ) de 85 cm<sup>3</sup> y una velocidad media en la raíz de la aorta de 100 cm/s (valores aceptablemente normales para el ventrículo izquierdo en el humano en reposo), el primer término de la derecha de la ecuación (transformando la  $\bar{P}$  de mmHg a dinas/cm<sup>2</sup> con la relación  $h \times \rho_{\text{Hg}} \times G$ , con  $h$  como la altura de la columna de mercurio,  $\rho_{\text{Hg}}$  la densidad del Hg y  $G$  la constante gravitacional) daría:  $10 \text{ cm} \times 13.6 \text{ g/cm}^3 \times 980 \text{ cm/s}^2 \times 85 \text{ cm}^3 = 1.13 \times 10^7$  ergios, mientras que lo atribuible a la energía cinética, luego de obtener la masa al multiplicar el  $V_1$  por la densidad de la sangre, sería:  $85 \text{ cm}^3 \times 1.005 \text{ g/cm}^3 \times \frac{1}{2}(100 \text{ cm/s})^2 = 4.27 \times 10^5$  ergios, de manera que la contribución cinética al trabajo cardiaco es del 3.78% (cerca de 4 mmHg para este ejemplo), aunque durante el ejercicio, la velocidad de la sangre en la raíz de la aorta puede llegar a 500 cm/s, lo que lleva la energía cinética a un nivel equivalente a la ejercida por la presión sobre el volumen desplazado (con el mismo  $V_1$  da  $1.07 \times 10^7$  ergios = 1.07 J,

o cerca de 95 mmHg), algo que debe tomarse muy en cuenta al valuar la presión intrarterial, pues si el catéter (tubo flexible que puesto en la luz de la cavidad es empleado para el registro de la presión sanguínea o PS) se coloca a contra flujo, puede medirse una PS que prácticamente duplique el valor real. En el ventrículo derecho la energía sería de cerca del 20% de la del izquierdo, tomando la  $\bar{P}$  a 20 mmHg en esta cámara y por supuesto igual volumen latido.

Si por otro lado tomamos una frecuencia cardiaca de 75 latidos por minuto (0.8 segundos entra latidos, valor aceptablemente normal) la potencia cardiaca en el sujeto en reposo sería entonces de  $1.13 \text{ J}/0.8 \text{ s} = 1.41 \text{ W}$ .

Si ahora consideramos el trabajo realizado por el corazón en el intervalo de tiempo de un latido, la expresión correspondiente se formula como

$$W = \int_{t_1}^{t_2} P Q dt + \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{2} \rho v^2 Q dt,$$

donde  $\rho$  representa la densidad de la sangre,  $Q \equiv (dV/dt)$  el flujo y  $t_1$  y  $t_2$  el tiempo de inicio y fin de un ciclo cardiaco.

### 2.3. Capacidad y flujo ventricular

Es claro entonces que la presión, el volumen y el flujo son variables del mayor interés en la evaluación de la función cardiaca. Aquí comentaremos un poco más respecto al flujo, considerado éste como el volumen de sangre que pasa por unidad de tiempo en una sección del circuito circulatorio.

Aunque a nivel microscópico la sangre no tiene un comportamiento clásico, a escala macroscópica se acepta que puede considerarse como si fuese un líquido newtoniano (incompresible y con régimen laminar, aunque exhibe una viscosidad anómala) de manera que, si de momento dejamos de lado los cambios en la tonicidad de la cámara, podemos definir el flujo sanguíneo bajo la correspondiente formulación óhmica clásica:

$$Q = \frac{P_1 - P_2}{R} = \frac{\Delta P}{R}$$

con  $P_1$  y  $P_2$  representando la presión a la entrada y a la salida del vaso ( $P_1 > P_2$ ) y  $R$  la resistencia del conducto al flujo  $Q$ , relación válida en la consideración de que habrá una presión crítica sobre la cual dará inicio el flujo y que la resistencia es aceptablemente constante.

Siguiendo con la analogía eléctrica (donde el flujo sanguíneo se equipara con la corriente eléctrica, la presión al voltaje y el volumen a la carga), así como existe una resistencia al flujo, también se presenta un efecto capacitivo en razón de que, siendo elástica la pared ventricular (así como los vasos sanguíneos), ésta se distiende en respuesta al impulso presurizante (efecto principalísimo en la aorta), lo que puede representarse como:

$$V = C P,$$

donde  $V$  representa el volumen sanguíneo expulsado por la presión  $P$  y  $C$  representa la distensibilidad (capacitancia) del vaso.

Podemos entonces modelar al ventrículo como una cámara que se ajusta a lo señalado antes (aunque para la

simplificación de arriba se han considerado independientes a la distensibilidad  $C$  y a la resistencia  $R$ , cosa que en las cavidades cardiacas cambia conjuntamente) y con ello inferir propiedades mecánicas cardiacas [4] y algunas relaciones con el árbol arterial [5,6], sobre todo al modelar la frecuencia cardiaca controlada mediante un retardo asociado al barorreceptor [7]; más adelante se verá más al respecto.

### 3. ELECTROGRAMA CARDIACO Y ELECTROCARDIOGRAMA

Para que el corazón desempeñe satisfactoriamente su vital función de bomba, se requiere que cada porción del órgano se contraiga sincrónicamente bajo un orden de inicio bien definido y que tal orden pueda ser adecuadamente conducida a través de la masa cardiaca; lo que establece las cuatro categorías funcionales en las que se puede ver al corazón: la contractilidad (inotropismo), el automatismo (cronotropismo), la excitabilidad (badotropismo) y la conductividad (dromotropismo) [8].

Mientras la contractilidad está más ligada a las propiedades mecánicas del corazón, las otras tres categorías funcionales (automatismo, excitabilidad y conductividad) se relacionan con las propiedades eléctricas de la masa y de las fibras cardiacas. Son estas propiedades las que, registradas gráficamente mediante electrodos colocados en la superficie corporal, dan origen al electrocardiograma (ECG), el cual se genera dado que la totalidad de las fibras musculares deben accionar sincrónicamente para que el corazón cumpla adecuadamente con su función ímpelente, lo que origina señales eléctricas muy grandes (de algunos milivolts o mV) sobre cualquier punto del volumen corporal. El electrocardiograma es entonces la

historia temporal de las diferencias de potencial causadas por la actividad eléctrica del corazón, registradas desde la superficie corporal y representadas gráficamente contra el tiempo.

El electrocardiograma, desde los registros iniciales de Waller (quien usó un electrómetro capilar) y Einthoven (quien reinventó el galvanómetro de aguja para registrar el ECG) [9]) se ha establecido como una de las técnicas diagnósticas cuya accesibilidad y poder han contribuido a que se utilice extensamente en la clínica médica; esto favorecido por el mejoramiento en los métodos de obtención y registro de la actividad eléctrica cardiaca y el abatimiento de los costos de los equipos que los incorporan [10].

Así, el incremento del conocimiento de las bases fisiológicas de la actividad eléctrica del corazón [11], el establecimiento de marcos teóricos, como el concepto del dipolo de Einthoven, y el mejoramiento en los métodos de medición del electrocardiograma (como la introducción de las derivaciones monopolares por Wilson y de las derivaciones ortogonales por Frank) han permitido que la interpretación clínica de los electrocardiogramas sea cada vez más racional y deductiva.

La excitación del cardiomiocito expresada por el potencial de acción cardiaco, generalmente sigue trayectorias bien definidas en la masa cardiaca y aproximadamente constantes en cada ciclo (aunque la recuperación en menor grado); lo cual permite interpretar las señales reflejadas en el ECG y deducir la región desde donde se generan como se verá más adelante.

No obstante, habrá que considerar que, a diferencia del fenómeno de excitación apreciado en el nervio aislado, ahora el generador (corazón) está inmerso dentro de un conductor de volumen, donde la corriente eléctrica se

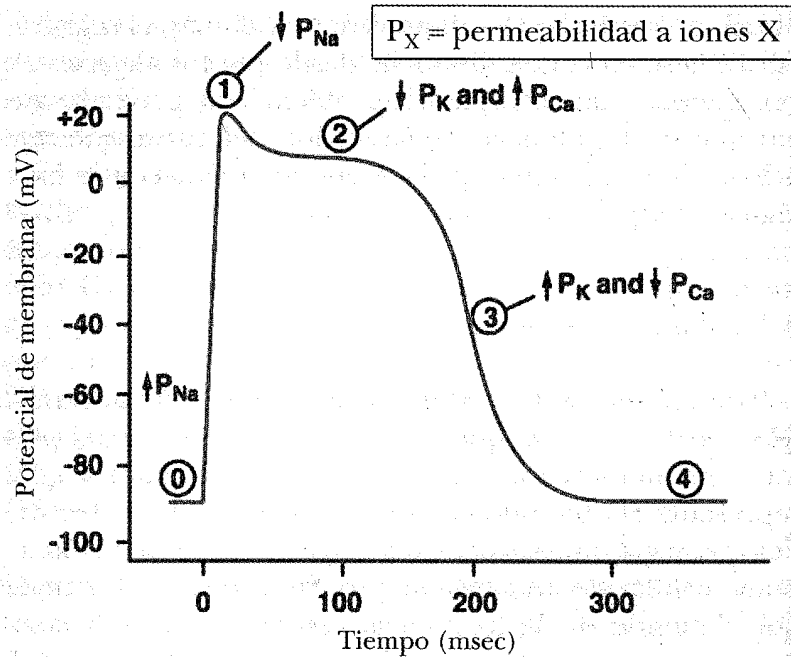
distribuye según las tres dimensiones. Además, el registro del ECG se efectúa a distancia, desde puntos alejados al generador, lo que complica la problemática, pero a la vez enriquece el potencial esclarecedor del razonamiento físico, e ilustra cómo es posible entender situaciones biológicas complejas a partir del mismo.

### 3.1. *Potencial de acción cardiaco*

Para resaltar algunas diferencias del *potencial de acción* (PA) cardiaco con el que se presenta en el nervio, el primero se muestra esquemáticamente en la figura 4 que representa al obtenido cuando se colocan micro-electrodos que registran la actividad eléctrica a través de la membrana celular de un cardiomiocito. Su duración, que aunque depende de la frecuencia cardiaca, es como cien veces mayor que el del potencial de acción del nervio, del que también se distingue por presentar un "platillo" bien nítido. En su generación interviene una corriente de sodio inicial análoga a la del nervio (fase 0 de la figura 4) y una corriente de potasio con cinética diferente (fase 2) asociada a canales selectivos a este ión que presentan distintas propiedades. En el PA cardiaco se registran además importantes corrientes de calcio (fases 2 y 3 de la figura 4) que no se reconocen en el PA nervioso. La larga duración del PA cardiaco lleva también a la existencia de un largo periodo refractario absoluto (tiempo durante el cual no se alcanza respuesta excitatoria) que comprende desde la fase 0 a la 3.

Aunque no entraremos en detalles al respecto del PA cardiaco, no dejaremos de mencionar que éste difiere entre regiones del corazón debido a que porciones del mismo manifiestan distintas propiedades electrofisiológicas,





Fase	Canales de membrana
①	$\text{Na}^+$ canal abierto
②	$\text{Na}^+$ canal cerrado
③	$\text{Ca}^{2+}$ canales abiertos; $\text{K}^+$ canal cerrado rápido
④	$\text{Ca}^{2+}$ canales cerrados; $\text{K}^+$ canal abierto lento
⑤	Potencial en reposo

Figura 4. Potencial de acción de un cardiomiocito registrado con microelectrodos intracelulares. En la fase cero se incrementa la permeabilidad al sodio ( $P_{\text{Na}}$ ) lo que acerca el potencial de membrana ( $E_m$ ) al de equilibrio de Nerst ( $E_{\text{ion}}$ ) para este ión ( $I_{\text{ion}} = P_{\text{ion}} (E_m - E_{\text{ion}})$ ). En la fase 2, la permeabilidad a potasio ( $P_K$ ) baja con respecto a la existente en reposo y se incrementa la de calcio ( $P_{\text{Ca}}$ ), mientras que en la fase 3 esto se invierte. En la fase 4 se recupera el potencial de reposo.

en cuya base están las diversas cinéticas de los canales selectivos a las especies iónicas involucradas en el efecto. Así, en la aurícula derecha, cerca de la vena cava, existe una región especializada (nodo seno-auricular) que sin intervención externa alcanza el umbral de excitación, lo que provoca que periódicamente se dispare el PA (automatismo) y que esta excitación sea transmitida al resto de la masa cardiaca, también por rutas específicas de tejido especializado en la realización de esta tarea (fibras de Purkinje). Estas especializaciones conllevan morfologías diferentes para el potencial de acción de tejidos específicos como se esquematiza en la figura 5.

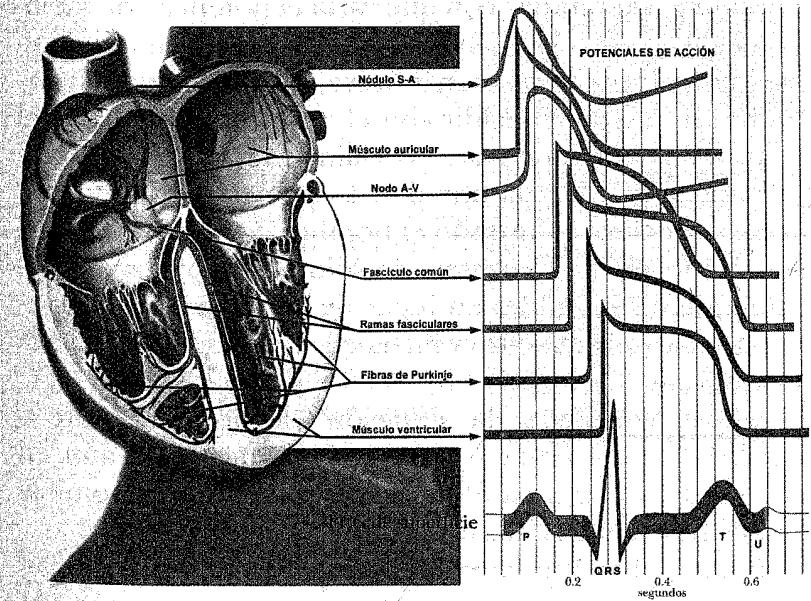


Figura 5. Curso temporal del potencial de acción de distintas regiones cardiacas. El PA del nódulo SA y del A-V se dispara automáticamente, mientras que el fascículo de Hiz y las fibras de Purkinje conducen más rápidamente la excitación. En la parte inferior se aprecia el ECG de superficie y su relación temporal con la actividad eléctrica de cada región.

### 3.2. Señales eléctricas asociadas a frentes de excitación

Sabemos que una célula uniformemente polarizada no genera diferencia de potencial eléctrico en puntos exteriores a ella, y en consecuencia el potencial de acción cardíaco no dará manifestación eléctrica externa alguna durante el desarrollo del "platillo", ya que éste es suficientemente prolongado respecto al tiempo de propagación total como para que durante varias decenas de milisegundos la mayoría de las células cardíacas estén aproximadamente al mismo potencial (ver figura 5). En cambio, durante la ocurrencia del principio y del final del *potencial de acción*, se generan señales cuya amplitud es proporcional a la rapidez con que varía el potencial de membrana. Otro aspecto a tener en cuenta es que en la aurícula el *potencial de acción* es más breve, además de que su terminación puede coincidir con el inicio del potencial del ventrículo, quedando así parcialmente oculta por éste (ver figura 5). Es esta una de las razones por las que en varias especies, incluyendo el hombre, los registros externos como el ECG consten de sólo 3 complejos temporalmente distinguibles en lugar de los 4 que podrían esperarse para el comienzo y final de la activación en aurícula y ventrículo.

Analicemos ahora la situación eléctrica existente a nivel del límite entre una zona excitada y otra aún en reposo de una misma fibra, frontera a la que denominaremos frente de excitación.

Supongamos que queden vecinas zonas de polaridad opuesta. Podemos ver en la figura 6 que el punto "A" situado delante del frente excitador recibirá simultáneamente la influencia de los dipolos membranales subtenidos por el ángulo sólido  $\Omega$ , todos orientados por su lado positivo respecto al punto A de observación, lo que

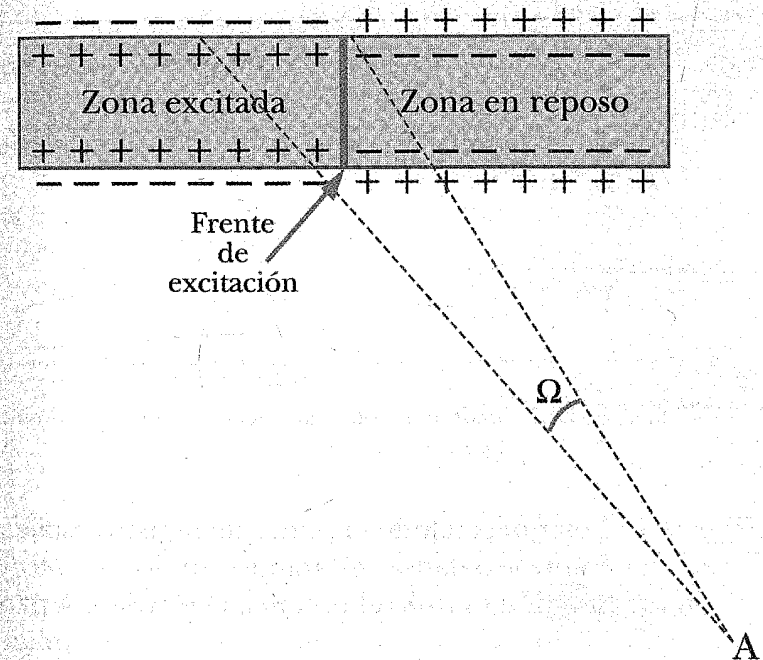


Figura 6. Frente de activación en una hipotética fibra miocárdica que genera un campo eléctrico apreciado desde el punto A a un ángulo sólido  $\Omega$ .

por lo tanto dará un campo eléctrico con polaridad de este signo: la magnitud de este potencial eléctrico positivo viene dada por la expresión:

$$V_A = \kappa \cdot \rho \cdot \Omega,$$

donde  $\kappa$  es la constante dieléctrica del medio,  $\rho$  la densidad de dipolos sobre la superficie, y  $\Omega$  el ángulo sólido que subtiende a la superficie del frente desde el punto "A". Si consideramos diferentes puntos de registro varía el ángulo sólido y por lo tanto la magnitud del potencial eléctrico (ver figura 7).

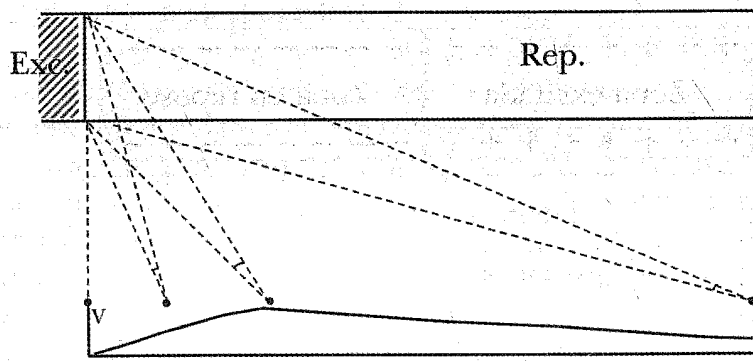


Figura 7. Valores hipotéticos del potencial eléctrico ante el cambio del punto de observación.

Reparemos en que, cuando el punto de registro está en la línea del frente excitador, el ángulo sólido es nulo y por lo tanto también es nulo el potencial eléctrico. A partir de esa posición el ángulo sólido crece muy rápidamente hasta alcanzar un máximo y luego decrece en forma continua hasta anularse para una distancia indefinidamente grande.

Ahora bien, la situación y la forma del registro será idéntica si registramos en un mismo punto fijo y fuese el frente excitador el que cambiase de posición alejándose a la derecha, mientras que si se aleja hacia la izquierda la forma sería la misma pero en imagen especular. De esto podemos ver que si un punto está situado en todo momento por delante de los sucesivos frentes de activación, se verán siempre potenciales positivos crecientes o decrecientes según éstos se acerquen o se alejen del punto en cuestión. De esta forma, podremos saber el sentido en que se desplazan dichos frentes.

Si en cambio el punto de registro queda detrás de los frentes de excitación, entonces se obtendrán potenciales eléctricos negativos de forma análoga a la anterior.

Si ahora los frentes de excitación pasan frente al punto de registro, se tendrá una onda bifásica positivo-negativa, cualquiera sea el sentido de su propagación (ver figura 8).

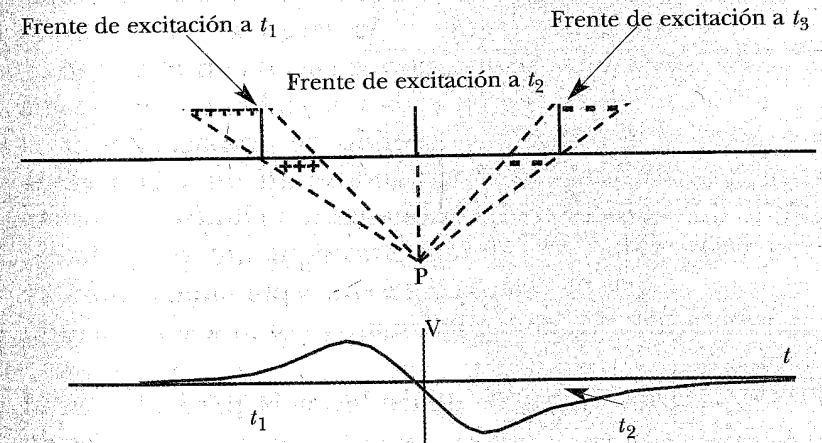


Figura 8. Esquemización de un registro bifásico obtenido de un frente de onda que se desplaza hacia la derecha del punto de observación.

### 3.3. Dipolo excitador

La totalidad de los registros precedentes se hubiese obtenido idénticamente si en lugar de las superficies de membrana polarizadas existiese un único dipolo a nivel del frente, con su polo positivo apuntando a la zona aún en reposo (polo positivo apuntando el sentido de la propagación).

A su vez, este dipolo equivalente queda caracterizado físicamente por una magnitud vectorial denominada momento dipolar  $\mu$ , cuyo módulo es igual al producto de

la carga  $q$  por la distancia  $d$  que separa a ésta de la otra:  $|\mu| = |q| \cdot |d|$ , mientras que la dirección y el sentido son las de la propagación a lo largo de la célula. Con esto simplificamos a únicamente considerar un vector por fibra en un instante dado.

Si ahora imaginamos un frente de excitación propagándose simultáneamente a lo largo de varias fibras (como, por cierto, se acepta que sucede en el corazón), se podrá postular que en cada una habrá un vector que caracterice la dirección y sentido de propagación en el instante considerado, originándose así un vector resultante que caracteriza globalmente a dicho frente instantáneo de excitación. Al momento siguiente, podrá haber un cambio en la geometría del frente y por tanto existirá un nuevo dipolo resultante instantáneo, como se aprecia en la figura 9.

Lo anterior adquiere una relevancia particular en el caso del corazón, debido a que los sucesivos frentes de excitación guardan entre sí una relación geométrica bien definida para las varias regiones cardiacas, lo que normalmente se mantiene constante entre ciclos sucesivos. Por ejemplo, la excitación de la aurícula precede a la del ventrículo y en éste último se activan primero las zonas internas y después las superficiales externas; en la figura 9 se esquematiza esta relación con la anatomía cardiaca. Como a cada frente instantáneo corresponde un vector momento resultante, el proceso podrá visualizarse entonces como una sucesión de vectores de magnitud y dirección cambiantes.

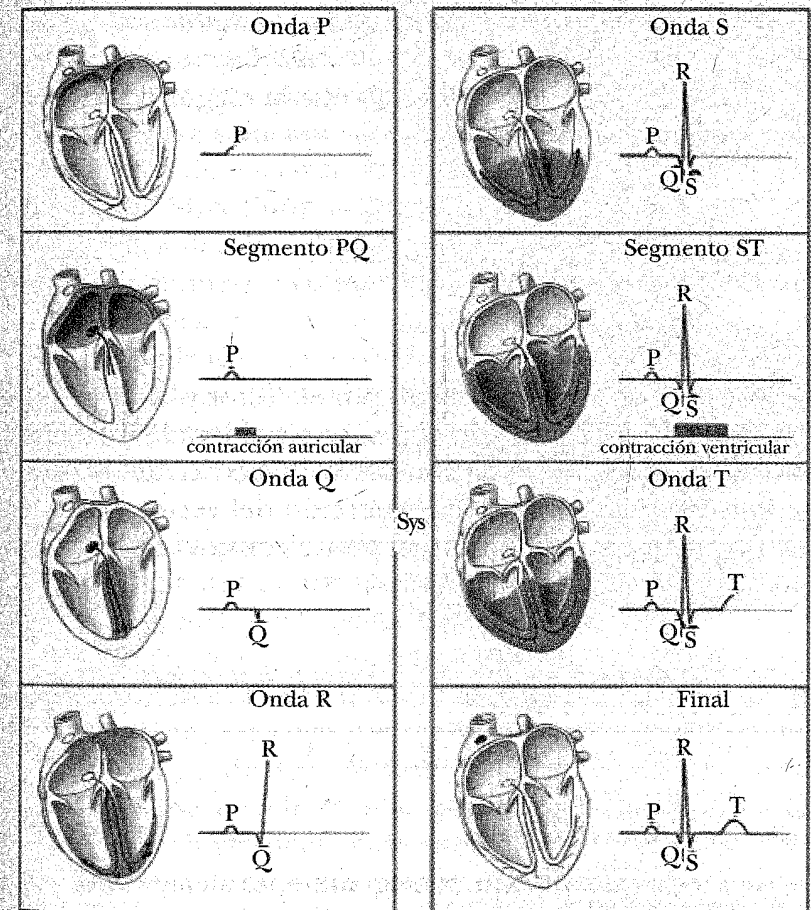


Figura 9. Ciclo de activación eléctrica cardiaca y su reflejo en el electrocardiograma de superficie. Inicia con la onda P asociada a la activación del nodo sinusal (arriba a la izquierda), para terminar con la repolarización ventricular asociada a la onda T (abajo a la derecha) para, en seguida, reiniciar un nuevo ciclo.

### 3.4. Potencial generado en un punto por un dipolo

Si el punto está alejado del dipolo, la magnitud de este potencial viene dada por:

$$V_p = \kappa \cdot \mu \cdot \frac{\cos \hat{\alpha}}{d^2},$$

donde  $\hat{\alpha}$  es el ángulo formado por el vector y la recta que une el origen de éste con el punto considerado,  $d$  la distancia entre ambos y  $\kappa$  la constante dieléctrica del medio.

Pero si consideramos la proyección del vector sobre la recta que une su origen con el punto considerado, vemos que:

$$\cos \hat{\alpha} = \frac{\text{Proy } \mu}{\mu} \quad \text{Proy } \mu = \mu \cdot \cos \hat{\alpha}$$
$$V_p = \kappa \cdot \text{Proy } \mu \cdot \frac{1}{d^2}.$$

De modo que, para puntos igualmente alejados del origen del vector, la sola consideración de la proyección de éste sobre las rectas correspondientes nos permitirá deducir la magnitud del potencial.

### 3.5. El electrodo de referencia y registro del ECG

Para registrar el potencial eléctrico de un punto es preciso compararlo con el de otro punto, cuyo valor no varíe. Pero tal punto no existe en el volumen conductor corpo-

ral, porque la señal eléctrica del corazón es muy fuerte y alcanza a todos los territorios corporales.

De modo que para lograr un electrodo "indiferente" una primera solución consistiría en "aumentar" artificialmente el volumen en la continuidad eléctrica con el cuerpo, como lo hizo Einthoven en sus históricos registros de principios del siglo XX. Otra solución sería conectar puntos del volumen corporal entre sí, tales que las respectivas señales eléctricas se cancelasen recíprocamente en forma aproximada durante todo el ciclo cardíaco, como lo realizó Wilson en 1939, al referir el registro eléctrico de las extremidades corporales a un punto cuya ponderación con resistencias eléctricas llevaría a un voltaje cero (*red de Wilson*).

Así, dado que en cada instante de la excitación existe un frente con su correspondiente *vector momento resultante instantáneo* y que la magnitud y orientación de estos vectores es diferente, también lo serán sus proyecciones y los voltajes instantáneos que se originen en los puntos de observación, en cuyo caso y dado que se han aceptado puntos específicos para la localización en la superficie corporal de los electrodos de exploración, los registros electrocardiográficos se denominan en relación a donde se hayan colocado los electrodos. Así, el registro que toma la diferencia de potencial eléctrico entre las extremidades superiores se denomina DI, mientras que se identifica como DII a la que considera la diferencia entre el vértice de la sínfisis púbica y el brazo derecho y DIII para esto mismo, pero hacia el brazo izquierdo.

El ECG de superficie, además de su utilidad diagnóstica intrínseca en razón de que diferentes patologías cardíacas (isquemias, infartos, miocarditis, alteraciones en la pre y en la postcarga, etcétera) frecuentemente se reflejan en desviaciones del patrón normal característico del



ECG, también es muy utilizado para evaluar los mecanismos de control neural de la función cardíaca, como se verá en la siguiente sección.

#### 4. CIBERNÉTICA CARDIOVASCULAR: ASPECTOS DEL CONTROL DEL SISTEMA CIRCULATORIO

Si bien los términos *ciberespacio*, *cibercafé*, *cibernauta*, etc., tienen el mismo lexema que el vocablo *cibernética* (del que por cierto pretenden derivarse), en realidad no comparten una base conceptual común (podrían tenerla si forzamos los conceptos), dado que *cibernética*, siguiendo a la Real Academia Española, significa:

**cibernética.** (Del fr. *cybernetique*, éste del ingl. **cybernetics**, y éste del gr. *κυβερνητικ*, arte de gobernar una nave).

f. Estudio de las analogías entre los sistemas de control y comunicación de los seres vivos y los de las máquinas; y en particular, el de las aplicaciones de los mecanismos de regulación biológica a la tecnología.

O, como lo establece el tan prestigiado matemático del siglo XX Norbert Wiener (1894-1964) en su libro *Cibernética y sociedad* [12]:

Es propósito de la cibernética desarrollar una lengua y unas técnicas que nos permitan, no sólo encarar los problemas más generales de comunicación y regulación, sino además establecer un repertorio adecuado de ideas y métodos para clasificar sus manifestaciones particulares por conceptos.

De manera que, como la cibernética busca conceptualizar los sistemas de control e información con indepen-

dencia de si se presentan en las máquinas o en los seres vivos, sus métodos deberán ser útiles si se aplican al estudio del control del sistema circulatorio.

En la introducción del capital libro *Cybernetics or control and communication in the animal and the machine* [13], Norbert Wiener (creador del concepto de **cibernética** con este libro en 1948) hace notar que tal obra es producto de diez años de trabajo realizado conjuntamente con Arturo Rosenblueth, quien en esos años se encontraba en Boston, pero también en el Instituto Nacional de Cardiología (INC) desde 1946, de tal forma que en 1948 año de publicación del libro referido, Rosenblueth encabezaba el Departamento de Fisiología del INC. Todavía más, esta introducción se realizó precisamente durante una estancia del doctor Wiener como profesor visitante en tal instituto entre 1947-1948. De manera que, si bien la gestación de la cibernética se realizó en Boston (en la Escuela Médica de Harvard, en donde estaba el doctor Rosenblueth en ese entonces, y en el MIT, en donde trabajaba el doctor Wiener) puede decirse que su parto se efectuó en la Ciudad de México, particularmente en el INC.

En lo subsiguiente haremos uso de algunos de los conceptos y métodos de la cibernética para tratar de comprender ciertos aspectos del control cardiovascular.

##### 4.1. Homeostasis de la presión arterial

Ya señalamos que el corazón es una bomba que envía sangre con oxígeno y nutrientes a la economía corporal y recoge de ésta los desechos metabólicos, manteniendo para el caso un gradiente de presión. De hecho, una de estas presiones, la correspondiente a la de las arterias



(concretamente a la braquial), es la que se mide al momento que uno asiste a una consulta médica. Este valor regularmente se entrega como dos números: uno que hace referencia a la presión sistólica (120 mmHg como la cifra normal) y otra a la diastólica (80 mmHg si no la afecta alguna patología).

Sin embargo, la presión sanguínea (tanto la diastólica como la sistólica) está lejos de mantenerse constante [14]. De hecho cambia en el transcurso del día como un ciclo circadiano en el que por ejemplo la presión arterial (PA) tiene un cierto valor durante la mañana, mientras que normalmente disminuye en la noche durante el sueño como se aprecia en el panel A de la figura 10. A la

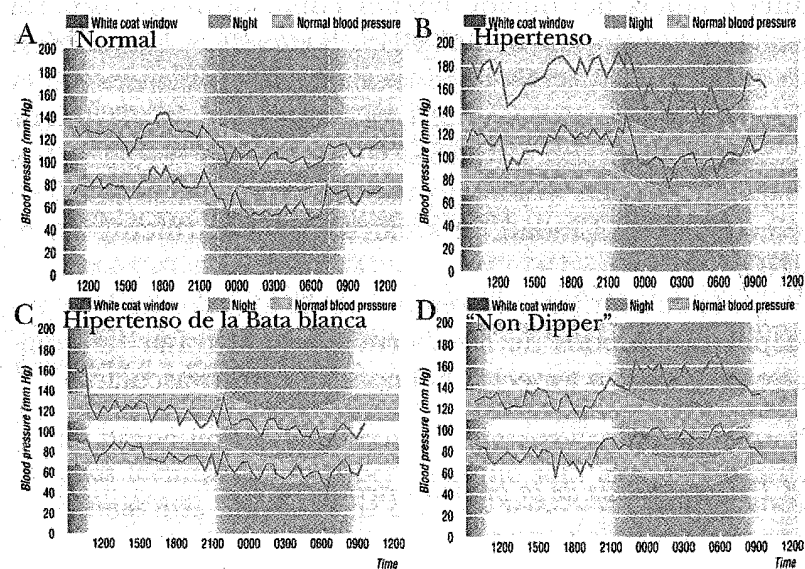


Figura 10. A) Variación de la presión sanguínea (PS) durante el día en un sujeto normal. B) Cambios de la PS en un sujeto hipertenso. C) Alteración de la presión en un sujeto con hipertensión de la bata blanca. D) Variación de la PS en un sujeto con incremento nocturno anormal. Modificado de [14].

derecha de la misma figura, en el panel B, se ve este mismo ciclo circadiano pero en alguien que presenta hipertensión de forma que, si bien la trayectoria de la PA durante el día en este caso es a *grosso modo* similar a la que se presenta en un sujeto normal, en el hipertenso los valores de presión están generalmente más elevados en todo momento.

Por otro lado, en el panel C de la figura 10 se muestra otro tipo de alteración del ciclo normal de la presión arterial, como la llamada “hipertensión de la bata blanca”, caso en el que la PA se eleva acentuadamente cuando el sujeto se presenta a la consulta médica, mientras que mantiene su valor normal el resto del tiempo. En esta misma figura, en el panel D, se muestra un caso frecuente en el que no existe una disminución nocturna de la presión arterial como normalmente debería suceder durante el sueño, sino que contrariamente a esto, la presión aumenta por la noche. Las alteraciones de la presión arterial ilustradas en los paneles B, C y D de la figura 10, muestran que el sistema que controla el nivel de la presión arterial tiene alguna anomalía, cada una de ellas claramente identificada como factor de riesgo cardiovascular que puede llevar a la muerte prematura [14].

Pero la PA no solamente cambia en el transcurrir del día, en situación normal también presenta variaciones latido a latido, incluso durante el reposo, no se diga durante el esfuerzo o bajo alguna otra condición estresante [15]. La pérdida de esta variabilidad de la presión arterial está también asociada a un mal pronóstico para quien la presenta [14, 15].

Aunque lo que aquí se ha comentado de ninguna manera agota las posibles alteraciones del control de la PA, sí ilustra la gran importancia que conlleva la búsqueda tendiente a comprender mejor los mecanismos que

afectan o controlan la presión sanguínea, a pesar de su complejidad intrínseca. La complejidad misma de tal fenómeno, hace necesario utilizar las herramientas para el análisis de sistemas [15] como se ilustra más adelante al respecto de la frecuencia cardiaca, variable que participa de manera central en el control de la presión arterial.

El comprender los mecanismos que interactúan para establecer el estado de la presión arterial está muy lejos de ser una tarea simple. Para apreciarlo mejor basta con revisar de manera genérica algunos de los mecanismos que intervienen en la regulación de la presión arterial, como los que se señalan en la figura 11 la cual, sin ser exhaustiva, sí ilustra el grado de complejidad de los componentes que tercian el efecto [16]. En la figura se ejemplifica la participación hormonal (cuadros arriba a la derecha), ajustes por control de volumen capilar (arriba a la izquierda) o venoso (abajo a la izquierda), o mediante vías neurales (abajo a la derecha en la misma figura). Es esta última, la de la participación del sistema nervioso autónomo (SNA)<sup>5</sup> en el control de la función cardiovascular, una de las áreas que más activamente se están desarrollando en la búsqueda para comprender mejor los mecanismos neurales que participan en el control de la función cardiocirculatoria.

<sup>5</sup> El SNA es la sección del sistema nervioso encargada de modular la función de los órganos involuntarios como las vísceras (corazón, pulmón, intestino y otros) o como el diámetro pupilar y las glándulas sudoríparas. Para ello consta de dos ramas (simpático y parasimpático) que cuando inervan algún órgano, en general actúan de manera opuesta. Así, el simpático dilata la pupila mientras el parasimpático la contrae; el simpático dilata los bronquios y el parasimpático los contrae, etc.

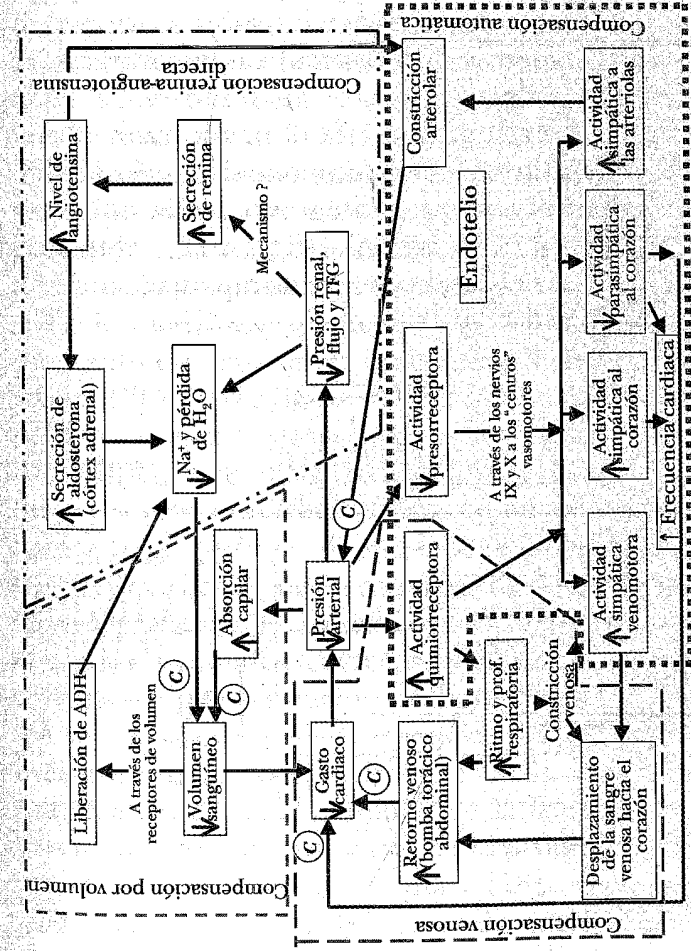


Figura 11. Esquema genérico de algunos mecanismos que participan en el control de la presión sanguínea ante una caída de volumen. Los círculos con una C indican los mecanismos compensatorios de una caída de presión por desangrado. Modificado de [16].

## 4.2 Variabilidad de la frecuencia cardiaca

Como se aprecia en la figura 11, los mecanismos neurales que participan en el control de la presión sanguínea actúan principalmente mediante el sistema nervioso autónomo en sus dos vías: el simpático y el parasimpático, en donde el primero, al proceder sobre el corazón, incrementa la frecuencia (y la fuerza) de la contracción cardiaca (y por ende colabora el aumento de la PA), mientras que el parasimpático (vía el nervio vago) favorece el efecto contrario. A este respecto, si vemos al sistema nervioso central como un integrador de la información que le llega por diversas vías (figura 12), entonces éste actuará, vía el simpático y el parasimpático, sobre el corazón, cambiando la frecuencia cardiaca (o FC)

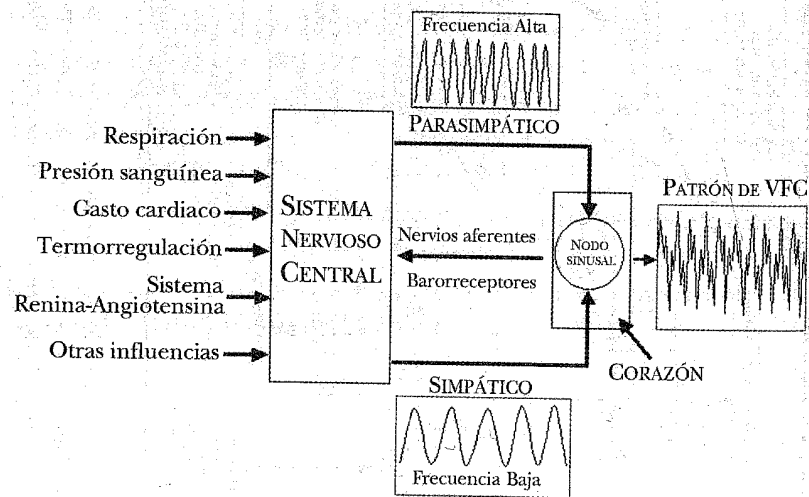


Figura 12. Modelo gráfico que ilustra al sistema nervioso central como integrador de información para, mediante la vía simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo, actuar sobre el nodo sinusal del corazón y controlar así la frecuencia cardiaca, lo que genera un patrón de variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC).

haciendo referencia a la información que le llega por sensores situados en el tórax (respiración), en las arterias y en el corazón (presión arterial) o bien desde la temperatura corporal (termorregulación) y de otras influencias. Esto nos lleva a un modelo gráfico como el de la figura 12, el cual se establece en términos cibernéticos al momento en que se transmite y procesa información que actuará sobre un conjunto de efectores que a su vez modifican la información que se transmite al sistema integrador (realimentación de información). El que esto esté sucediendo en todo momento, conduce a que la FC, al igual que la presión sanguínea, no sea constante sino que fluctúe latido a latido (variabilidad de la frecuencia cardiaca o VFC) alrededor de un cierto nivel [15, 17, 18].

De lo anterior, si podemos identificar por ejemplo el momento de ocurrencia de la onda R del electrocardiograma (ECG) (ver figura 13) y con ello medimos el tiempo T transcurrido entre ondas R consecutivas (intervalo RR o IRR), veremos cómo cambia la FC de un latido a otro, y si esto lo hacemos durante un tiempo suficientemente largo (esto es, obtenemos el tacograma de la frecuencia cardiaca), podremos valorar el grado de variabilidad de la FC (VFC) mediante los parámetros estadísticos convencionales como la varianza o la desviación estándar, o por valoración de la dispersión del histograma de distribución de frecuencias de los IRR, como el índice triangular por ejemplo [17, 18]. Muchos de estos estimadores de la variabilidad de la frecuencia cardiaca han mostrado utilidad clínica en el pronóstico de pacientes con alguna patología cardiaca [18].

Por otro lado, existe evidencia de que en el tacograma de la frecuencia cardiaca es posible también reconocer el nivel de actividad del simpático en referencia a la del parasimpático [15, 17, 18] dado que, sin bien este último

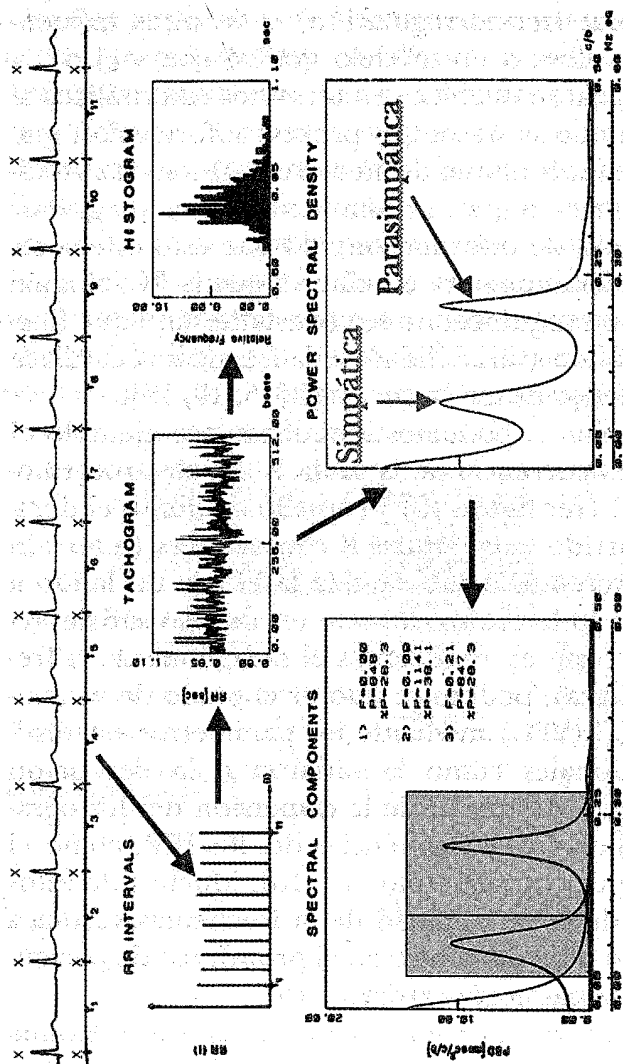


Figura 13. Aquí se ilustra cómo, tomando del electrocardiograma el intervalo RR latido a latido (T1, T2, etc.) y se grafica respecto al número de latido (T1 par el latido uno, T2 para el dos, etc.) podemos generar un tacograma de la frecuencia cardiaca del cual, a su vez, se extraen la distribución estadística (histograma) y el espectrograma. Modificado de [17].

disminuye la FC, el cambio lo obtiene en un tiempo más corto (a una frecuencia mayor) que el incremento de la frecuencia cardiaca logrado por la actividad del simpático, la que en consecuencia se ubica a una frecuencia más baja como se ilustra esquemáticamente en la figura 12. Es decir, el incremento de la frecuencia cardiaca causado por la actividad simpática es más lento que el decremento provocado por el actuar del parasimpático. Con esto entonces, en el tacograma de la FC se presentan variaciones al menos a dos periodicidades diferentes: una atribuida al actuar del simpático sobre la frecuencia cardiaca y otra debida a la actividad vagal. De aquí que, si obtenemos el tacograma de la FC como se mencionó en el párrafo anterior y de este colegimos el espectrograma (mediante la transformada de Fourier o por algún otro método como se ilustra en la figura 13), en éste resaltarán dos picos en frecuencias que corresponderán al nivel de participación del simpático por un lado (frecuencia baja, o LF de sus siglas en inglés, localizada entre 0.04 a 0.15 Hz) y por otro el que corresponderá al efecto vagal sobre la FC (frecuencia alta, o HF de sus siglas en inglés, ubicada en la banda que va de 0.15 a 0.4 Hz) como se ilustra en la figura 13 [17, 18].

Así por ejemplo, si se evalúa el espectrograma de un sujeto sano en clinostatismo (acostado), se apreciarán los picos referidos en el párrafo anterior (ver figuras 13 y 14) y si en seguida el mismo individuo se pone de pie (ortostatismo), se apreciará un aumento del pico de frecuencias asociado con la actividad simpática respecto de aquel atribuible al nivel de la participación del parasimpático en el control de la frecuencia cardiaca. Es decir, en el sujeto sano, la relación simpatovagal (HF/LF) se incrementa en ortostatismo con respecto a su valor cuando el individuo está acostado. Esto mismo sucede con la

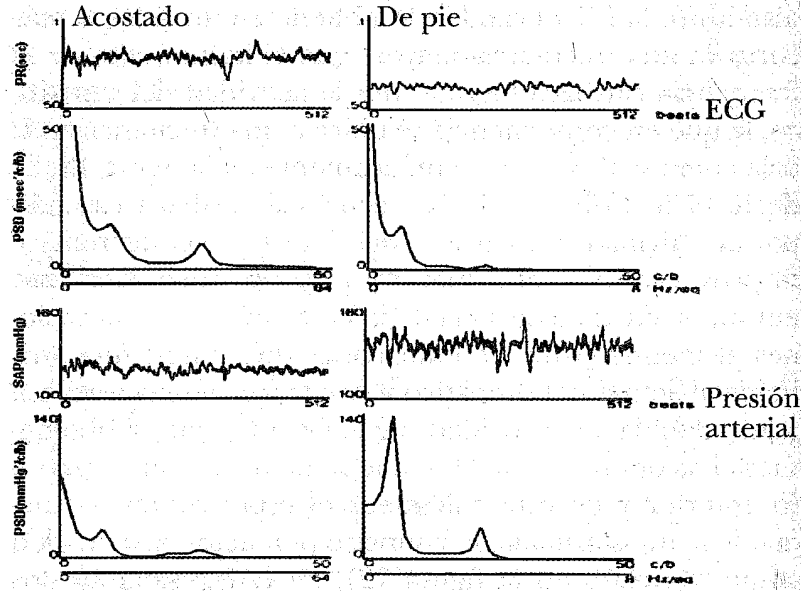


Figura 14. Cuando un sujeto normal pasa de estar acostado a la posición de pie, el valor promedio de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial se incrementan. El simpático también lo hace en referencia al parasimpático (modificado de [17]).

presión arterial, en donde su valor promedio se incrementa al ponerse el sujeto de pie como se muestra en la figura 14.

El nivel de participación de una vía u otra (simpática o parasimpática) y su valor relativo, se ve alterado en diversas patologías y tiene interés en la predicción de muerte súbita o de sobrevida en diversas patologías cardiovasculares [18]. De aquí que se hayan desarrollado equipos que permiten obtener el tacograma de la frecuencia cardiaca a partir del electrocardiograma [19, 20] y con esto realizar el procesamiento de esta señal para identificar la participación autonómica en diferentes patologías,

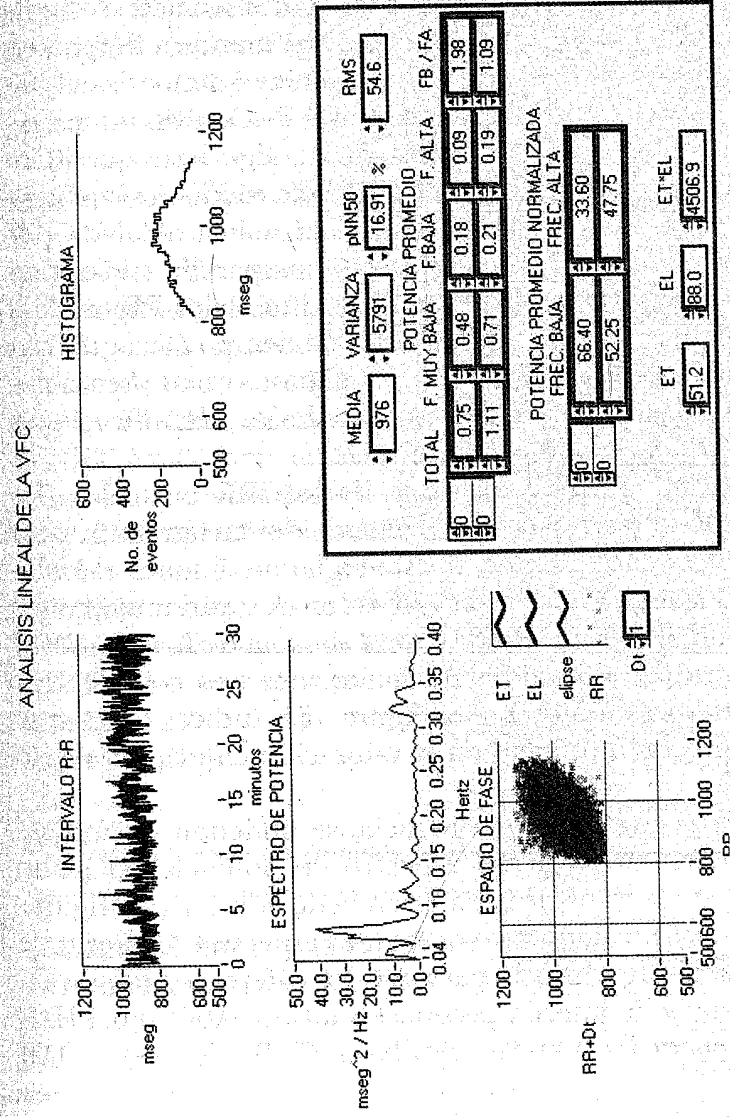


Figura 15. Ejemplo de reporte generado en pantalla (y en papel) del sistema desarrollado por el análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca [20].



evaluada ésta por métodos lineales o no lineales [20, 21], como se ilustra en la figura 15. En la generalidad de estos equipos para la captura y análisis de las señales, se digitaliza el electrocardiograma (ECG) al menos a 240 muestras por segundo, para de aquí medir automáticamente los intervalos entre las ondas R del ECG (IRR, en milisegundos o ms) ubicadas éstas con un algoritmo que identifica la onda R del ECG, por ejemplo mediante la obtención de la segunda derivada de la señal calculada por mínimos cuadrados, rectificadas y comparadas en seguida con un umbral [22]. El medir los intervalos RR latido a latido, permite generar las series de tiempo (tacogramas) de estos eventos (figura 15), en algunos casos previa evaluación visual de la pertinencia de las identificaciones realizadas automáticamente.

Una vez generada la serie de los IRR normales (las arritmias y los artefactos se excluyen del tacograma), para el análisis en el tiempo el sistema ha de obtener el histograma y los índices estadísticos: media, varianza y valor cuadrático medio o RMS (de *root mean squared*), y el pNN50 o porcentaje de latidos normales sucesivos con diferencias mayores a 50 ms (ver figura 15), índices todos que han mostrado utilidad en la valoración clínica del sujeto [15,18].

Para el análisis en frecuencia, se obtienen los índices espectrales a partir del espectro de potencia calculado mediante la transformada discreta de Fourier (ver figuras 13, 14 y 15) o algún otro estimador espectral. Con esto, se calcula el área bajo la curva en los diferentes rangos de frecuencia de interés: potencia total (de 0.003 a 0.4 Hz), potencia de frecuencias muy bajas (FMB, de 0.003 a 0.04 Hz, que se cree se corresponde con el control térmico y hormonal de la FC), potencia de frecuencias bajas (FB de 0.04 a 0.15 Hz, asociada a la actividad del parasimpático),

potencia de frecuencias altas (FA, de 0.15 a 0.4 Hz, relacionada con la actividad simpática) y el cociente FB entre FA (FB/FA) como índice del balance simpato-vagal [18], ver figura 15. A la FMB también se le denomina VLF (del inglés *very low frequency*), a la FB LF (del inglés *low frequency*) y HF a la FA (de *high frequency*).

Para el estudio del tacograma por métodos no lineales, una aproximación es generar la gráfica de Poincaré de la VFC, de donde se calculan índices ajustando por ejemplo una elipse a los puntos de la gráfica de Poincaré [21]. El eje longitudinal de la elipse (EL en la figura 15) corresponde a los puntos cuyas coordenadas están alejados menos de dos veces la desviación estándar respecto a la línea identidad, mientras que el eje transversal de la elipse (ET en la mencionada figura 15) corresponde a los puntos cuyas coordenadas están alejados menos de dos veces la desviación estándar respecto a la perpendicular a la línea identidad. En general se considera que el eje longitudinal mide la variabilidad instantánea, mientras que el transversal mide la de largo plazo [18, 21]. Estos métodos rebelan por ejemplo dinámicas del sistema que no quedan evidentes por métodos lineales como el análisis espectral [21].

#### 4.3 Relación entre los cambios de la amplitud del pulso fotopleletismográfico y la frecuencia cardiaca

Como se mostró, la relativamente fácil interpretación del análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) ha favorecido el incremento de su aceptación (aunque no sin controversia [23, 24, 25]) como un método incruento útil para ponderar el actuar de la actividad vagal y simpática sobre el corazón, estimando con ello el estado del control autonómico de la función cardiaca,



regulación ésta que por otro lado, también participa en la administración del flujo sanguíneo en la piel [26, 27], aunque en este caso únicamente a través de su rama simpática, la cual ejerce un efecto vasoconstrictor principalmente, si bien en los músculos y otras regiones tiene también una acción vasodilatadora, aunque esto último en mucho menor medida [28].

Siendo así y considerando la complejidad de los mecanismos del control de la presión arterial, se puede plantear la posibilidad de valorar simultáneamente la influencia del autonómico sobre los cambios en la frecuencia cardíaca y en el flujo sanguíneo de la piel, que suponiéndolas variables sujetas conjuntamente a la regencia del SNA en condiciones normales [19, 29, 30], permitiría tener una mejor perspectiva de la intervención del sistema nervioso autónomo en el control de la función cardiovascular y de su fisiopatología. El escrutinio de la variabilidad del flujo sanguíneo de la piel puede efectuarse por ejemplo mediante el registro de los cambios en la amplitud del pulso fotopleletismográfico (PFP) que, al capturarse simultáneamente al electrocardiograma (ECG), permite la obtención de los tacogramas de la frecuencia cardíaca conjuntamente con los cambios en la amplitud del PFP latido a latido [30, 31 32]. Con esto y a fin de estimar la relación entre estos parámetros, en primera instancia se puede valorar la correlación entre la amplitud de la base del pulso fotopleletismográfico (diástole arterial o pie de pulso o pP) y del máximo del mismo (cima del pulso o cP, relacionado a la sístole arterial) con la frecuencia cardíaca; por ejemplo mediante correlación múltiple entre la cima y el pie del pulso como variables independientes y la frecuencia cardíaca como dependiente de éstas. Además, y para valorar la relación dinámica entre estas variables, se pueden estimar también sus

espectrogramas, a la vez que la coherencia espectral entre las variaciones en la amplitud del PFP y de la VFC, para así identificar las bandas de frecuencias que afectan paralelamente al control del flujo sanguíneo de la piel y al de la frecuencia cardíaca, y con esto buscar relacionar lo que ya se conoce respecto al análisis de la VFC con lo que acontece en la variabilidad de la amplitud del pulso fotopleletismográfico, de escaso estudio en este contexto. Para lo anterior, y una vez generado el tacograma de la frecuencia cardíaca como se comentó antes, el PFP se logra obtener por ejemplo de la luz reflejada por un dedo iluminado con diodos emisores de luz, reflejo que se puede recoger en un fototransistor y cuya señal, una vez amplificada, filtrada y digitalizada, se procesa a fin de obtener los puntos notables de la señal asociados al inicio (pie de pulso o pP, asociado a la diástole arterial) y al máximo del pulso fotopleletismográfico (cima o cP, relacionado con la sístole arterial), los cuales pueden ser ubicados (al igual que la onda R del ECG) con rutinas que adaptan a este ambiente algoritmos reportados previamente [22, 32]. El medir simultáneamente los intervalos RR y la amplitud del pP y de la cP latido a latido, permite generar las series de tiempo o tacogramas (por analogía con la medición de ciclos) de estos eventos (ver figura 16), previa evaluación visual de la pertinencia de las identificaciones realizadas automáticamente. En esta figura se muestran los tacogramas de seis minutos de la FC y de los PFP tomados de un individuo aparentemente sano colocado primero en posición clinostática (clino, previa espera de diez minutos para la estabilización hemodinámica) y luego poniéndose el sujeto de pie (orto, también previa espera para estabilización).

Para proceder al análisis de los tacogramas, primero se ha de verificar la fidelidad de las detecciones automáticas

(por juicio visual de un experto por ejemplo), eliminándose manualmente las arritmias y los artefactos de cada tacograma, los que han de ser sustituidos por algún método de interpolación.

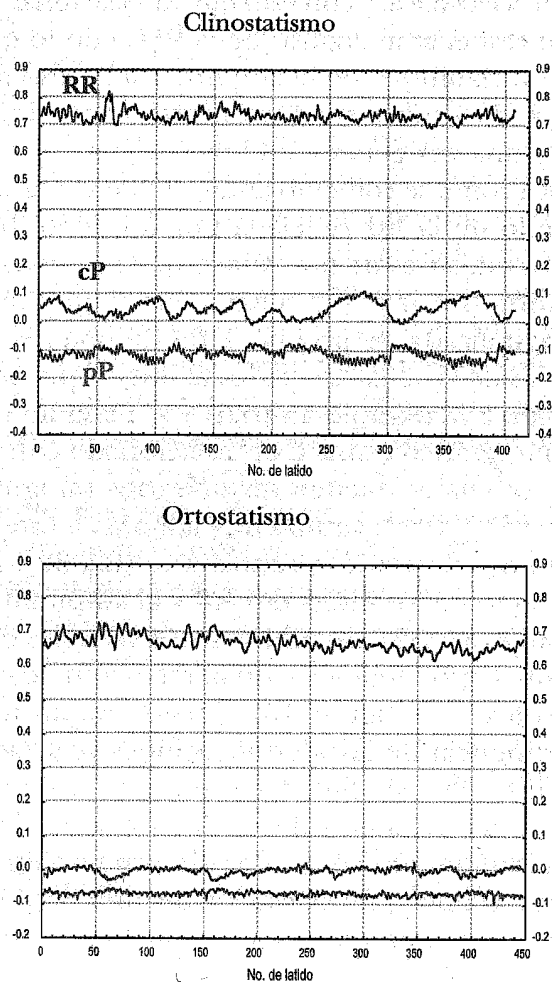


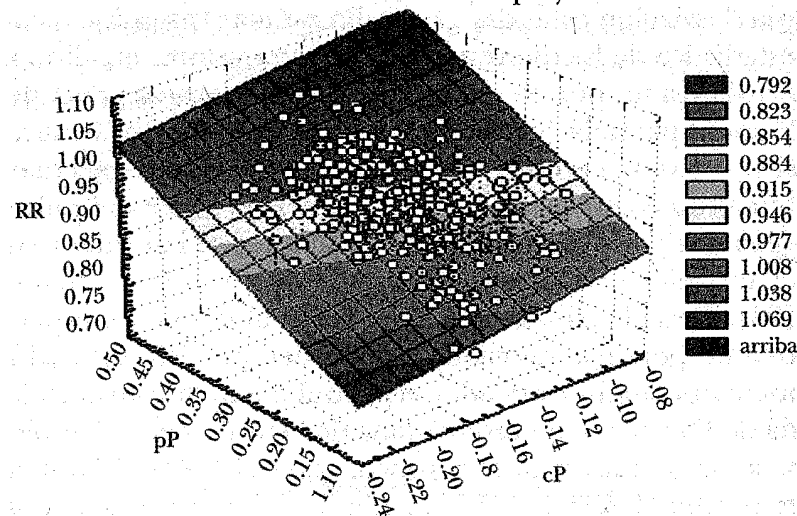
Figura 16. Cambios latido a latido de los intervalos RR (en segundos) y de la amplitud del pie (pP) y de la cima (cP) del pulso fotopleletismográfico (ambos en voltios en el c a/d o de unidades arbitrarias) en uno de los voluntarios.

A cada serie de tiempo se le ha de calcular el promedio y la desviación estándar y con ello estimar la significancia estadística de las diferencias entre estos valores en clino y ortostatismo, por ejemplo mediante una prueba de t de Student pareada (generalmente considerada significativa si  $p < 0.05$ ). La correlación múltiple se puede efectuar tomando como variables independientes al pie del pulso (pP) y la cima del mismo (cP), mientras se considera en el modelo al intervalo RR como variable dependiente [33]. Para el análisis en frecuencia se obtienen los espectros de potencia de cada serie de tiempo (RR, cP y pP) mediante algún estimador espectral como la transformada de Fourier (bajo una ventana de Hanning por ejemplo si se ha de buscar la coherencia espectral [34]). También es posible determinar la función de coherencia espectral del RR con el pP y la cP, y la de estas últimas variables entre sí, a fin de estimar si existe asociación lineal entre señales en alguna banda de frecuencia específica, todo ello tanto en orto como en clinostatismo.

Como se observa en el ejemplo de los tacogramas de la figura 16, al cambiar la posición de clino a orto (como es de esperarse en sujetos normales [17, 18]) en general se presenta un decremento del intervalo RR promedio. También decae la amplitud de los pulsos (tomados como la diferencia entre el valor en la cP menos el correspondiente en el pP) en un 63% como consecuencia de la vasoconstricción atribuible al incremento de la actividad simpática al ponerse el sujeto de pie [31, 35]. Por su lado, el decremento del IRR fue de sólo 17% en promedio.

La correlación lineal múltiple del RR con el pP y la cP (ver figura 17) entrega una r de Pearson de más de 0.15 ( $p < 0.05$ ) en la mayoría de los casos y en éstos las pendientes de la regresión fueron positivas (es decir, al subir el volumen fotopleletismográfico aumenta el intervalo RR)

### Correlación del RR con el pP y la cP



$$RR = 0.84 + 0.63 pP + 0.20 cP$$

$$r = 0.57, p < 0.001$$

Figura 17. Ejemplo de correlación múltiple entre el intervalo RR en segundos, contra la cima (cP en unidades arbitrarias (au)) y el pie del pulso (pP en au).

y mayores para el pie del pulso (diástole arterial) que para la cima (sístole arterial) del mismo. Dicho de otra manera, el incremento en el volumen sanguíneo está en general asociado a una baja en la frecuencia cardiaca, lo cual es más evidente para la diástole arterial [35, 36].

Respecto al análisis espectral de la VFC (figura 18), los espectros de potencia del RR presentan las ya conocidas bandas de muy baja (VLF, 0.003 a 0.04 Hz, atribuible generalmente al control térmico y hormonal), baja (LF, 0.04 a 0.15 Hz, principalmente simpática) y alta frecuencia (HF, 0.15 a 0.4 Hz, predominantemente vagal) en casos normales [17, 18]. Así mismo, la respuesta al cambio de

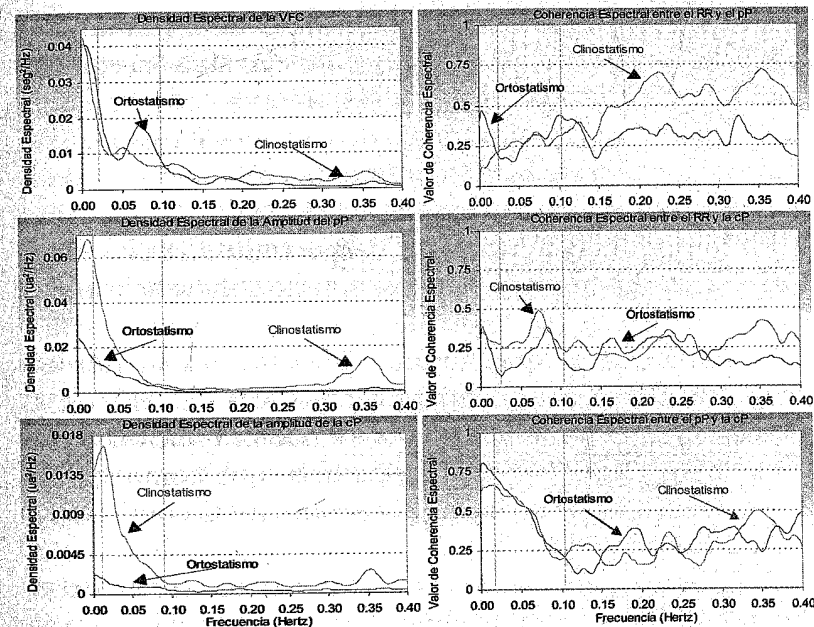


Figura 18. A la izquierda, espectros de potencia de los intervalos RR (VFC) y de la amplitud en el pie (pP) y en la cima (cP) del pulso fotopleiográficos, mientras que a la derecha se muestra la coherencia espectral de estos últimos con el RR y entre sí. Las líneas punteadas verticales delimitan en cada caso las secciones correspondientes a la muy baja (0.003 a 0.04 Hz), baja (0.04 a 0.15 Hz) y alta frecuencia (0.15 a 0.4 Hz).

posición de acostado (clino) a de pie (orto) muestra los cambios correspondientes a sujetos normales ante el reto ortostático, esto es: disminución de la banda HF e incremento de la LF con el consecuente aumento en el balance simpátovagal, como puede apreciarse en la figura 18.

Por lo que se refiere a los espectros de las amplitudes del pP y de la cP latido a latido, se aprecia en ellos que, al igual que en la VFC, también pudieran ubicarse picos en las bandas VLF, LF y HF de los espectros de potencia

de estas variables. Al contrastarlos, la coherencia del RR con el pP es muy buena en las frecuencias altas (aceptadas generalmente como vagales o respiratorias en el análisis de la VFC) aunque al ponerse de pie, en esta banda disminuye la coherencia, pero aumenta en la región correspondiente a las frecuencias bajas [35, 36].

En lo que hace a la relación espectral de la cP con el RR, se aprecia un pico en la función de coherencia en las bajas frecuencias (relacionada como ya se dijo a la actividad simpática) el que aunque presente, es menor en ortostatismo. Al compararse los espectros del pP con la cP, la coherencia indicó una muy buena relación entre ellos en la baja y muy baja frecuencia, que como se dijo antes, en la VFC se atribuye generalmente al control hormonal y térmico [35, 36].

Referente a los valores del análisis en frecuencias, cuando el sujeto pasa de clino a ortostatismo, la potencia espectral total, la de la banda LF y la de la HF, decaen tanto en el RR como en la cP y el pP (cosa que también se aprecia en la figura 18, en donde la potencia total por ejemplo estaría dada por el área bajo la curva), mientras que la VLF aumentó para el RR y disminuyó para el pP y la cP. También se aprecia que el balance simpato-vagal (LF/HF) se incrementa en el RR como era de esperarse al ponerse de pie el sujeto, al igual que como sucedió para el pP, pero decae para la cP ante la misma maniobra.

El que la correlación entre el IRR y la amplitud del PFP sea significativa plantea la posible utilidad de esta relación para evaluar la respuesta barorreceptora (como en la relación de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca [37]), posiblemente en mejor relación con el pP dado que la pendiente de la regresión fue mayor para esta variable así como lo fue la coherencia en la HF, asociada como ya se dijo, a la actividad vagal en la VFC [35].

La disminución de la amplitud del PFP parece atribuible a la vasoconstricción debida al incremento en la actividad simpática en respuesta al cambio de clino a ortostatismo. De aquí que las respuestas que se aprecian en el pP y la cP ante el cambio de postura, podrán también relacionarse con el cambio en la actividad simpática y parasimpática identificable en el análisis de la VFC.

Respecto al análisis en frecuencia, el que en los espectros del pP y de la cP descritos también puedan asignarse bandas VLF (relacionado con el control hormonal y térmico y con el sistema renina-angiotensina en la VFC [7]), LF (simpática en la VFC) y HF (vagal o respiratoria en la VFC) concuerda con los mecanismos postulados para el control del flujo sanguíneo de la piel [26, 27]. De este modo, dado que la coherencia espectral de la VFC con el pP es muy buena en las frecuencias altas, lo que indicaría que la amplitud del pie del pulso (asociada a la diástole arterial) estaría también bajo influencia respiratoria como corresponde en la VFC, pero aquí podría ser más bien por factores mecánicos dado que los vasos sanguíneos no cuentan propiamente con inervación del parasimpático [28].

Por otro lado, aunque en general está reducida, el pico encontrado en la función de coherencia entre el RR y la cP en la región correspondiente a las bajas frecuencias, indica que aquí la contribución del simpático al control del máximo del PFP (relacionada con la sístole arterial) es más importante que otros factores que también inciden en esta variable.

La alta coherencia encontrada entre la cP y el pP en las muy bajas frecuencias, pero con una muy reducida coherencia de la cima y del pie del pulso con la VFC en estas mismas bandas, y el que estos aspectos no cambian ante el reto ortostático como se aprecia en la figura 18, indican

que en estas frecuencias el control ha de ser meramente local y en efecto, como en la VFC, aquí se refleje también la administración del flujo sanguíneo para controlar, por ejemplo, la temperatura .

Lo anterior hace pensar que este tipo de estudio puede tener importancia clínica al permitir una visión más integral del control de la función cardiovascular, bajo una metodología simple y de bajo costo, aunque habrán de hacerse más estudios para aclarar el carácter posiblemente complementario del enfoque que se presenta, respecto a los otros regularmente utilizados para este tipo de estudios, lo que plantea el estudio de la correspondencia entre estas variables fisiológicas. Para con ello tendremos que incursionar más aún en los aspectos del control del sistema circulatorio.

#### REFERENCIAS

1. World Health Organization, *World Health Statistics 2008*. En [www.who.int/whosis/whostat/E\\_WHS08\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/E_WHS08_Full.pdf), pp 29-30, visitado el 9 de Julio de 2008.
2. Sánchez Torres G-, Infante O., *Myocardial contractility, from normality to heart failure*, en *Cardiovascular failure, pathophysiological bases and management*, Fischer E. I. C., Stein A. J., Balanguer J. M., editores, Ediciones del Valle, Buenos Aires, pp. 121-140 (2005).
3. Buckberg G. D., *Commonality of ischemic and dilated cardiomyopathy, Laplace and ventricular restoration*, *J. Card. Surg.* **14**, 53-59 (1999).
4. Delhaas T., Bovendeerd P., Xander V., Prinzen F. W., *Adaptation to mechanical load determines shape and properties of heart and circulation, the CircAdapt model*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1943-H1954 (2005).
5. Sánchez Torres G., Infante O., *La mecánica arterial en la patología cardiovascular*, *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* **66**, 301-305 (1996).
6. Sánchez Torres G., Infante O., Sánchez M. G., de León P. A., Martínez M. R., *Mechanical factors of cardiovascular risk in systemic arterial hypertension. A new sign of arterial rigidity*, *Arch. Cardiol. Mex.* **73**, 261-270 (2003).
7. Lerma C., Minzoni A., Infante O., Marco V. J., *A mathematical analysis for the cardiovascular control adaptations in chronic renal failure*, *Artific. Organs* **28**, 398-409 (2004).
8. Marshall J. M., *The heart*, en *Medical physiology* vol 2, Mountcastle V. B., editor, p. 849 (1977).
9. De Michelli A., *En torno al centenario de la electrocardiografía*, *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, **58**, 265-271 (1988).
10. Daskalov I. K., *Modern electrocardiographic instrumentation*, *Hospimedica* vol 6, pp. 49-64 (1988).
11. Guntheroth G., *Electrical properties of cardiac muscle*, en *Cardiovascular function*, Abel F. L. y McCutcheon E. P., editores, Little Brown, EUA, pp. 81-134 (1979).
12. Wiener N. *Cibernética y sociedad*, Editorial Sudamericana (1969).
13. Wiener N. *Cybernetics of control and communication in the animal and the machine*, MIT Press (1948).
14. O'Brien E., Beevers G., Lip G. Y., *Blood pressure measurement. Part III: Automated sphygmomanometry, ambulatory blood pressure measurement*, *BMJ* **322** (7294), 1110-4 (2001).
15. Persson P. B. *Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction*, *Physiol. Rev.* **76**, 193-244 (1996).
16. White F. N., *Circulación*, en *Fisiología animal*, Gordon M. S. editor, CECSA, p. 269 (1982).
17. Pagani M., Lombardi F., Guzzetti S., et al., *Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympathovagal interaction in man and conscious dog*, *Circulation Research* **59**, 178-193 (1986).
18. *Task Force of the ESC and the NASPE. Heart rate variability, standards of measurement, physiological interpretation and clinical use*, *Circulation* **93**, 1043-1065 (1996).
19. Infante O., Montalvo L., Sánchez Torres G., Cadena M., Martínez R., Flores P., *Estudio de la variabilidad de la velocidad del pulso y de la frecuencia cardiaca*, VII Simposium Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, Bucaramanga, Colombia, 9-13 de octubre de 1996.
20. Lerma C., Infante O., José M., *Sistema de análisis de la VFC*, *Electro* **2**, 63-67 (2000).
21. Lerma G. C., Infante V. O., Pérez-Grovas H., Marco V. J., *Poincaré plot indexes of heart rate variability capture its dynamic adaptations induced by hemodialysis in chronic renal failure patients*, *Clin. Physiol. & Func. Im.*, **23**, 72-80 (2003).



22. Infante O., Valenzuela F., Polo S., *Algoritmo que utiliza la segunda derivada para identificar el complejo QRS en tiempo real*, *Rev. Mex. Ing. Biomed.* **13** (1), 23-32 (1992).
23. Ekberg D. L., *Sympathovagal balance, a critical appraisal*, *Circulation* **96** (9), 322-432 (1997).
24. Malpas S. C., *Neural influences on cardiovascular variability, possibilities and pitfalls*, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **282** (1), H620 (2002).
25. Taylor J. A., Studinger P., *Counterpoint, cardiovascular variability is not an index of autonomic control of the circulation*, *J. Appl. Physiol.* **101** (2), 678-81 (2006).
26. Bernardi L., Hayoz D., Wenzel R., Passino C., Calciati A., Weber R., Noll G., *Synchronous and baroreceptorsensitive oscillations in skin microcirculation, evidence for central autonomic control*, *Am. J. Physiol.* **273**, H1867-H1878 (1997).
27. Mundo S., Estañol B., Téllez J. F., Plascencia A., Corona V., Infante O., García Ramos G., *Respuesta del flujo sanguíneo de la piel con diferentes maniobras respiratorias en sujetos sanos*, *Arch. Cardiol. Mex.* **72**, 115-124 (2002).
28. Guyton A. C., Hall J. E., *Tratado de fisiología médica*, Editorial Interamérica 9ª edición, pp. 227-238 México (1997).
29. Infante Vázquez O., Sánchez Torres G., Flores Chávez P., Martínez Memije R., *Variabilidad espontánea de la velocidad del pulso arterial y su correlación con la de la frecuencia cardiaca*, 2º Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, La Habana, Cuba, 22-25 de mayo de 2001.
30. Nitzan M., Babchenko A., Khanokh B., Landau D., *The variability of the photoplethysmographic signals: a potential method for the evaluation of the autonomic nervous system*, *Physiol Meas.* **19** (1), 93-102 (1998).
31. Lerma C., Infante O., José M. V., *Sistema de captura y análisis de la variabilidad del pulso arterial y la frecuencia cardiaca*, *Electro.* **24**, 74-77 (2002).
32. Infante O., Sánchez Torres G., Martínez-Memije R., Flores P., Sánchez-Miranda G., *Sistema para la medición no invasiva de la velocidad del pulso arterial en diferentes territorios vasculares*, *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* **69**, 330-337 (1999).
33. Milton J. S., *Estadística para biología y ciencias de la salud*, McGrawHill (2001).
34. Gottman J. M., *Time-series analysis*, Cambridge University Press (1981).
35. Infante O., Lerma C., Sánchez-Torres G., Flores P., Martínez-Memije R., Estañol B., *Coherencia entre los cambios de la amplitud del pulso fotoplethysmográfico y de la frecuencia cardiaca*, III Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, 22-25 de septiembre, João Pessoa, Brasil (2004).
36. Infante O., *Cibernética cardiovascular. Elementos para el estudio del control del sistema circulatorio*, en *Tecnología en desarrollo. Puntal de la evolución de la cardiología, 1986-2006*, pp. 231-252, Gustavo Sánchez T., Oscar Infante, editores, Editorial Prado S. A. (2009).
37. Parati G., Di Rienzo M., Mancia G., *How to measure baroreflex sensitivity*, *J. Hypertens.* **18**, 719 (2000).

**CAPÍTULO 20**  
**ANÁLISIS FRACTAL**  
**DE FLUCTUACIONES CARDIACAS**

**JUAN CARLOS ECHEVERRÍA ARJONILLA\***,  
**JOSÉ ÁLVAREZ RAMÍREZ**,  
**RAMÓN GONZÁLEZ CAMARENA**,  
**MIGUEL ÁNGEL PEÑA CASTILLO**,  
**EDUARDO RODRÍGUEZ FLORES**  
*Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa*

**1. ANTECEDENTES FISIOLÓGICOS**

Las funciones y estructuras celulares se mantienen y evolucionan debido a desequilibrios permanentes entre las células y su entorno [1].

En los organismos pluricelulares con un sistema vascular cerrado, el líquido extracelular o medio interno se encuentra confinado en dos espacios principales: el intersticial y el plasma sanguíneo. A partir del líquido intersticial el oxígeno y sustancias nutritivas se derivan a las células, y también en éste son eliminados los productos de desecho del metabolismo celular. Los desequilibrios indispensables entre las células y el medio dependen del mantenimiento de la "constancia" o estabilidad fisicoquímica en este espacio, también conocida como homeostasis [2]. Para esto es fundamental tanto el transporte como la actividad cardiovascular,

\*jcea@xanum.uam.mx

facilitando intercambios y transferencia de masa, energía e ímpetu con otros sistemas corporales y con el espacio intersticial a nivel de los tejidos [3].

En el plasma sanguíneo se transportan entre otros las sustancias absorbidas por el sistema digestivo, el oxígeno captado por los pulmones, el bióxido de carbono eliminado por las células, varios productos metabólicos y las hormonas que modulan funciones celulares. Desde el ventrículo izquierdo la sangre es bombeada a través de las arterias y las arteriolas a los capilares en donde se generan fenómenos de filtración, difusión y transporte con el líquido intersticial. Los capilares afluyen a las venas por medio de las vénulas y luego a la aurícula derecha. De aquí, la sangre fluye al ventrículo derecho para ser bombeada y circular a través de los vasos pulmonares a la aurícula izquierda y nuevamente al ventrículo izquierdo. En los capilares pulmonares la sangre entra en contacto con el aire alveolar [2].

## 2. REGULACIÓN CARDIOVASCULAR

La función cardiovascular es regulada por múltiples sistemas que mantienen en niveles adecuados el flujo sanguíneo y las presiones capilares [2]. Así, en cualquier momento al menos cinco por ciento del volumen sanguíneo circulante se ubica en los capilares [2,3]. Mediante el mantenimiento de la presión hidrostática en éstos se promueven —entre otras condiciones— los desequilibrios con el líquido intersticial necesarios para conservar la actividad celular. De esta manera, el control fisiológico a corto plazo de la función cardiovascular, abarcando escalas temporales desde segundos a minutos, se dirige principalmente a la regulación de la presión

arterial media [4]. Esto se consigue mediante el control de variables como la frecuencia cardiaca, el volumen expulsado en cada latido cardiaco, o la resistencia vascular [4]; mismas que se modifican ampliamente para mantener a la presión arterial en un rango estrecho de variación [5].

Específicamente, existen diversos factores o mecanismos que influyen en la actividad cardiaca. Entre ellos se encuentra el control nervioso directo ocasionado por la permanente descarga de neurotransmisores en terminaciones cardiacas. Éstos resultan de importancia predominante pues ejercen una acción especializada y eficiente para modificar la frecuencia cardiaca, así como el volumen expulsado en cada latido. Entonces, no obstante el automatismo en la actividad cardiaca, ésta se encuentra modulada por la influencia nerviosa. Así la rama del sistema nervioso autónomo (SNA) conocida como *simpática* incrementa la frecuencia cardiaca y favorece que las fibras musculares se contraigan con mayor fuerza. Por el contrario la rama *parasimpática* disminuye la frecuencia cardiaca, posiblemente contribuyendo también a una disminución moderada de la contractilidad cardiaca [4,6]. Asimismo, como consecuencia de la existencia de un vínculo funcional entre el SNA y la actividad respiratoria, el intervalo entre latidos cardiacos disminuye durante cada inspiración [6].

A raíz de estas influencias, las perturbaciones externas [7] y en menor medida factores como descargas hormonales o la organización del tejido cardiaco, la frecuencia cardiaca y otras variables cardiovasculares exhiben fluctuaciones en diferentes escalas temporales.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>De cualquier manera, la presunta regularidad o constancia en los latidos cardiacos se utilizó, curiosamente, para definir el *tempo* o velocidad de ejecución musical. Así el término *moderato* originalmente se refería a 76-80 negras/minuto ( $\approx 72$  latidos/minuto) [8].

Recientemente, el estudio, caracterización y modelado de dichas fluctuaciones ha promovido un extenso interés en diversos círculos ya que son utilizadas como base para explorar las propiedades dinámicas de los sistemas de regulación cardiovascular. En la figura 1 se esquematiza un modelo retroalimentado de dicha regulación que sintetiza los principales mecanismos conocidos y específicamente involucrados en el origen de fluctuaciones cardiovasculares.

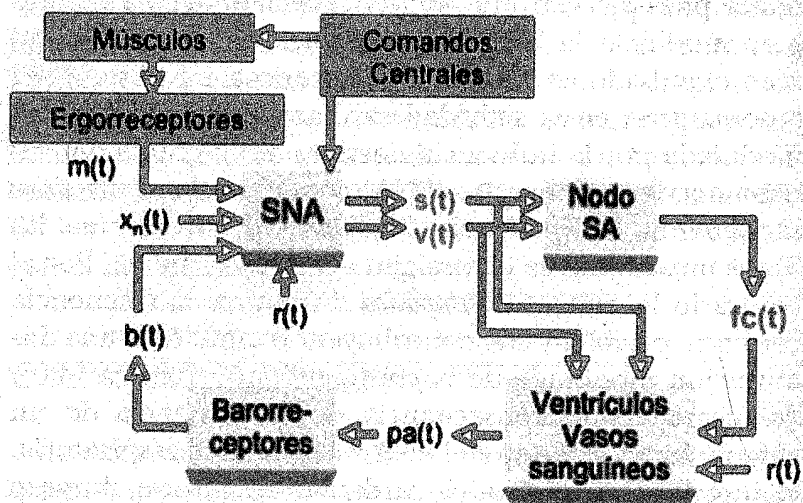


Figura 1. Variables cardiovasculares y neurales en función del tiempo.  $s(t)$ , actividad simpática;  $v(t)$  actividad parasimpática;  $fc(t)$ , frecuencia cardíaca;  $pa(t)$ , presión arterial;  $m(t)$ , sensorial muscular;  $b(t)$ , barorreceptores;  $r(t)$ , respiración; Nodo SA, nodo sino-auricular cardíaco; SNA, sistema nervioso autónomo;  $x_n$ , otras señales de entrada. (Este esquema fue definido a partir de modelos como el presentado en [9]).

#### 4. FLUCTUACIONES EN LA FRECUENCIA CARDIACA

La existencia de fluctuaciones o variabilidad temporal en parámetros cardiovasculares fue identificada alrededor de 1732 por Stephen Hales [10], pero no fue sino hasta la pasada década de los sesenta que se reconoció como una posible fuente de información clínica durante el trabajo de parto. Específicamente se encontró que los fetos que perdían las fluctuaciones —originalmente descritas como irregularidades— en los intervalos de tiempo entre latidos cardíacos, tenían un mayor riesgo de presentar complicaciones e inclusive la muerte durante la subsiguiente evolución del parto [11].

Hoy en día, el análisis de fluctuaciones en intervalos cardíacos, a las que también se les describe como variabilidad en la frecuencia cardíaca (VFC) [12], se ha generalizado en la investigación clínica aunque su incorporación a la práctica clínica rutinaria todavía se discute y resulta limitada [13].

La medición de la VFC típicamente se realiza a partir de señales electrocardiográficas, tal como se ilustra en la figura 2a. También se presenta en esta figura un trazo característico o serie de tiempo involucrando 300 intervalos cardíacos consecutivos; se aprecia que éstos fluctúan continuamente e inclusive es posible identificar la presencia de oscilaciones regulares o componentes periódicos (figura 2b). No obstante, al graficar el comportamiento de miles o decenas de miles de intervalos (figuras 2c y 2d) resulta evidente que las fluctuaciones correspondientes también presentan irregularidades notables y un comportamiento no estacionario, ya que las propiedades estadísticas como la media o la desviación estándar parecen cambiar a lo largo de la serie.

Para analizar los componentes periódicos en las fluctuaciones de los intervalos cardiacos, normalmente se realiza un análisis espectral en segmentos de cinco minutos (abarcando aproximadamente 300 latidos). Esto resulta de utilidad pues se identifican dos bandas de frecuencia principales que se han relacionado directamente a la actividad de las ramas del SNA mencionadas con anterioridad, principalmente la parasimpática. Así, se ha encontrado que en diversas condiciones patológicas se producen cambios significativos en el contenido o potencia de dichas bandas. Por lo que algunos investigadores coinciden en que este procedimiento es favorable para

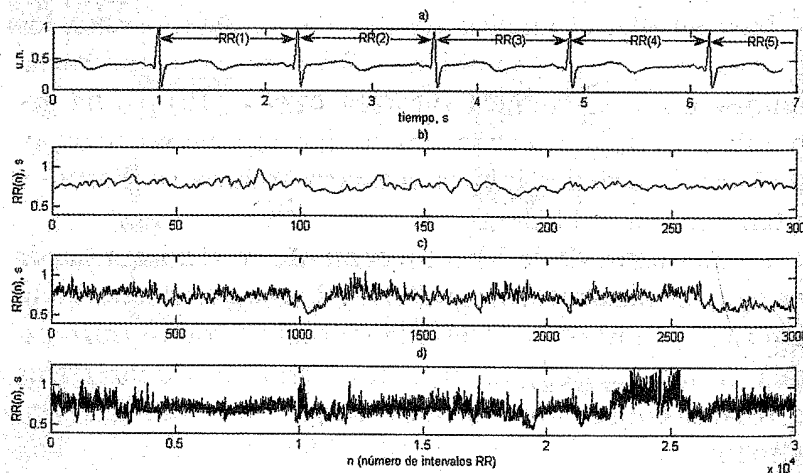


Figura 2. a) Medición de cinco intervalos cardiacos consecutivos a partir de señal electrocardiográfica, éstos son denotados como RR ya que como referencia temporal para demarcarlos se utilizan las ondas R de dicha señal, las cuales corresponden a la actividad eléctrica de la contracción ventricular (u. n. indica unidades de voltaje normalizadas). b) Gráfica de 300 intervalos cardiacos consecutivos expresados en segundos. c) Gráfica de 3000 intervalos. d) Gráfica de 30000 intervalos. Nótese la presencia de fluctuaciones e irregularidad en las diferentes escalas de análisis.

obtener información con valor pronóstico en pacientes con enfermedades cardiovasculares, o en aquellos que presumiblemente padezcan alteraciones en los mecanismos de control del SNA [12,13].

También ha resultado un reto interesante la indagación de las irregularidades y no estacionalidad en las fluctuaciones de los intervalos cardiacos. Estas características se evidencian marcadamente al realizar mediciones que involucren varias horas de actividad cardiaca. En este contexto, algunos métodos de la física estadística han permitido corroborar que las fluctuaciones cardiacas más allá de involucrar ruido al exhibir dichas características, presentan una complejidad o estructura —también vélgase geometría (ver siguiente sección)— que estadísticamente se repite a lo largo de diferentes escalas temporales [7,14-15]. Esta estructura se encuentra afectada entre otros factores por los ciclos de sueño y vigilia, la actividad hormonal, el neurodesarrollo o las propiedades del tejido cardiaco. Así, parece reflejar nuevamente a mecanismos y perturbaciones fisiológicas subyacentes, pero sobre todo al grado de integración funcional de los sistemas cardiovascular y nervioso [16-17].

#### 4. ANÁLISIS FRACTAL

El término fractal fue introducido en 1975 por Benoît Mandelbrot a partir del latín *fractus*, cuyo significado se relaciona con conceptos como fragmentado e irregular. El término se propuso como parte de un enfoque geométrico para describir y agrupar aquellas formas matemáticas o naturales que no eran adecuadamente representadas por las estructuras regulares de la geometría de Euclides, o por los patrones de evolución continua de la



dinámica de Newton [18]. Desde entonces, el enfoque se ha utilizado para explorar formas o comportamientos naturales complejos, específicamente en donde se encuentre involucrada cierta aleatoriedad y el grado de irregularidad o fragmentación se repita estadísticamente a lo largo de diferentes escalas de observación.

En términos generales es posible dividir a un objeto fractal en unidades o regiones progresivamente más pequeñas, mismas que individualmente se asemejan al objeto en su conjunto. Por esto, se considera que las formas fractales exhiben la propiedad de ser matemáticamente invariantes con respecto a la escala de análisis o de observación.<sup>2</sup> Así, con el propósito de determinar la longitud de una curva fractal arbitraria<sup>3</sup> a partir de un patrón de medición  $\delta$ , se encontrará que la estimación de dicha longitud, obtenida al contar el número de patrones necesarios para cubrir la curva en su totalidad ( $N(\delta)$ ), dependerá del tamaño seleccionado para el patrón. Por lo que la medición de la longitud se incrementará al reducir el tamaño de  $\delta$  sin que ésta converja a un valor característico, como sucedería para una curva sin propiedades fractales. Matemáticamente, lo anterior se representa o reproduce adecuadamente por la siguiente ley de potencia:

$$N(\delta) \approx \frac{1}{\delta^{D_f}} \quad (1)$$

<sup>2</sup> Idealmente la propiedad de invariancia se debe cumplir para todas las escalas de análisis; no obstante, en objetos o formas naturales existen límites inferiores y superiores particulares dentro de los cuales es únicamente posible verificarla.

<sup>3</sup> Ver como ejemplo la figura 3, que representa el trazo irregular de la costa sur de Noruega.

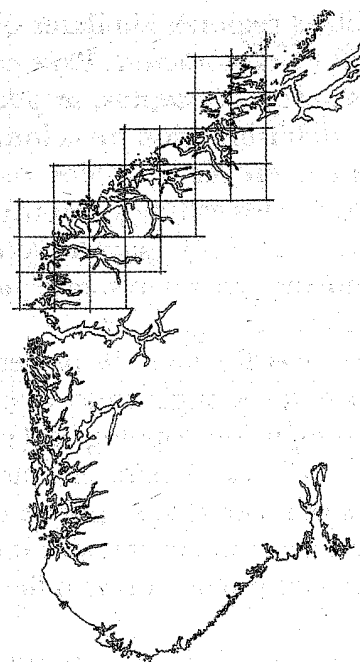


Figura 3. Trazo representando la costa sur de Noruega, derivado de un atlas digitalizado con una resolución de  $1800 \times 1200$  píxeles. También se incluye como referencia una cuadrícula con  $\sim 50$  km como longitud de lado. Nótese la irregularidad de esta curva que parece caracterizarse por la presencia progresiva de golfos (o fiordos) dentro de los golfos, al reducirse la escala de observación; propiedad de autosemejanza de esta curva reflejada en un valor no entero para la dimensión fractal  $D_f \sim 1.5$  [19]. Imagen tomada de *Fractals*, ISBN 0-306-42851-2, J. Feder, Plenum Press, Nueva York (1988).

A raíz de esta relación, las formas fractales generalmente se caracterizan por un único parámetro o exponente,  $D_f$ , también conocido como la dimensión fractal. En términos prácticos  $D_f$  se puede estimar a partir de la pendiente en una doble representación logarítmica entre  $N(\delta)$  y  $\delta$  [19]. De esta manera  $D_f$  cuantifica la relación

entre las presumibles regiones similares observadas a las diferentes escalas de exploración. Para comprender en términos prácticos estos conceptos, se puede considerar la dificultad en la determinación de la longitud de costas o fronteras ilustrada en los ejemplos recuperados por Mandelbrot a partir de los estudios empíricos de Richardson realizados en 1961 [18], para describir ciertas características de curvas irregulares que no habían sido claramente identificadas (figura 4).

En objetos o formas fractales  $D_f$  presenta, por lo general, valores no enteros sugiriendo que estrictamente ésta excede a la dimensión topológica (1 para líneas, 2 para planos o superficies, 3 para esferas u otros volúmenes finitos). Es por esto que se puede considerar que  $D_f$  ofrece una buena caracterización indicando hasta donde la forma fractal puede cubrir o llenar una región determinada.<sup>4</sup>

La imagen de la figura 5 corresponde a la pintura número 23 del artista Jackson Pollock, realizada en 1948. Las obras abstractas de este pintor se han caracterizado por presentar, interesantemente, la propiedad de invariancia o fractalidad mencionada con anterioridad [21, 22].

Como ejemplo de formas fractales encontradas en fisiología es posible mencionar al árbol traqueobronquial [24], el árbol vascular [25], y a las estructuras dendríticas o arborización neuronal (figura 6) [26].

<sup>4</sup> Mientras más exceda  $D_f$  a la dimensión topológica, en mayor medida la forma invade una región o espacio euclidiano [20].

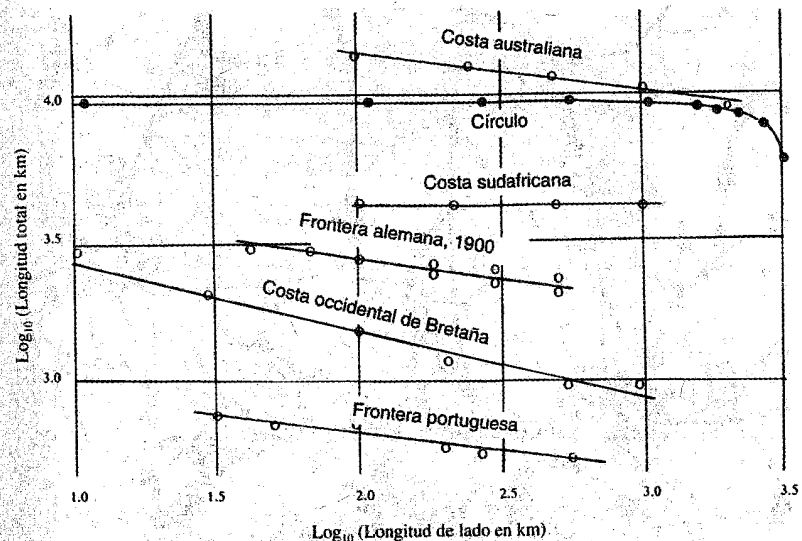


Figura 4. Variaciones en la estimación de la longitud total de costas o fronteras,  $N(\delta)$ , en función de la utilización de un patrón o segmento de medición,  $\delta$ , expresado en kilómetros. Nótese que las longitudes totales aproximadas no se estabilizan, siguen aumentando a medida que la longitud del patrón  $\delta$  tiende a cero; por el contrario, éstas i) se ajustan adecuadamente por rectas en una doble representación logarítmica cuyas pendientes resultan con valores no enteros, ii) dependen del grado de irregularidad en la costa considerada, y iii) corresponden al parámetro o dimensión fractal,  $D_f$ , de acuerdo con el modelo de la ecuación 1. Por ejemplo, en el ajuste para la costa de Bretaña  $D_f \sim 1.3$  [18]. Las mediciones representadas en esta figura fueron recuperadas por Mandelbrot a partir de datos empíricos (Richardson, 1961), quien también decidió incluir en la figura mediciones equivalentes para un círculo hipotético con el propósito de comparar el comportamiento de las costas o fronteras con una curva claramente regular. Contrariamente con lo que ocurre en éstas, la circunferencia total aproximada del círculo converge al tender el patrón  $\delta$  a un valor característico de alrededor de 1000 km, obteniéndose una pendiente entera  $D_f \sim 1$  [19], que coincide con la dimensión topológica para líneas. Imagen tomada de *La geometría fractal de la naturaleza*, 2ª edición, B. Mandelbrot, ISBN 84-8310-549-7, Metatemáticas Tusquets, Barcelona (2003).

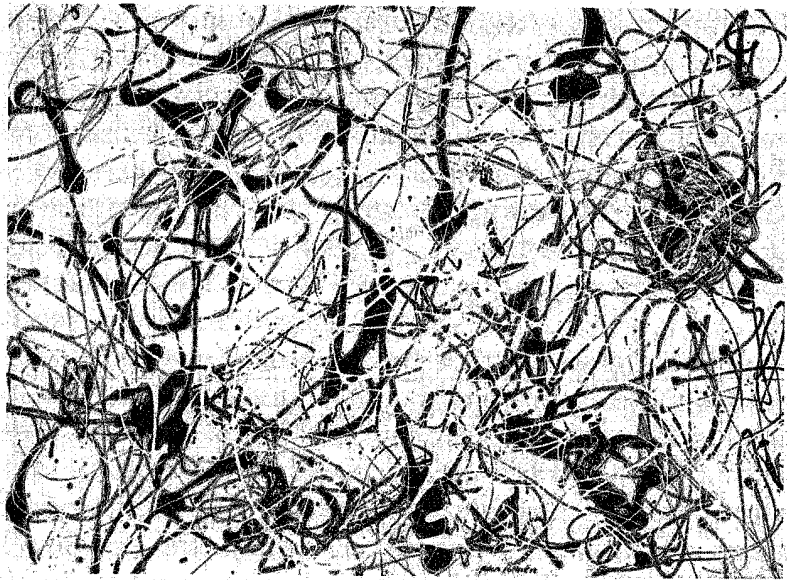


Figura 5. Pintura número 23 de J. Pollock cuyo análisis [22] reveló el siguiente valor para la dimensión fractal,  $D_f \sim 1.5$  (un valor de 2 indicaría que el área del lienzo se encontraría completamente cubierta por la pintura). La técnica no convencional que el artista seguía para sus obras consistía en dejar caer gotas de pintura en el lienzo, estando éste último sobre el piso mientras él realizaba desplazamientos en diferentes regiones del mismo. Esto introducía, interesantemente, la formación de patrones fractales, generalmente en dos regiones principales de los lienzos (la primera entre 1 mm y 5 cm, la segunda entre 5 cm y 2.5 m). Los videos del artista sugieren que la fractalidad en la primera región se produce en el proceso de caída de gotas y en la segunda por los movimientos del artista. Aquí cabe mencionar que se ha encontrado que las fluctuaciones en la marcha o caminado humano involucran un comportamiento fractal, probablemente originado en los mecanismos de control nervioso [22, 23]. La  $D_f$  reportada al inicio de este pie de figura corresponde específicamente a la primera región de la pintura número 23. Se ha encontrado que la  $D_f$  de las primeras regiones en las obras de Pollock se incrementó paulatinamente hasta  $\sim 1.7$  a lo largo de los años 1944-1954 mientras el artista perfeccionó su técnica. Esto sugiere entonces que los patrones fractales resultaban de las elecciones del artista y no necesariamente como una consecuencia física inevitable de la dispersión en la caída de las gotas [22].

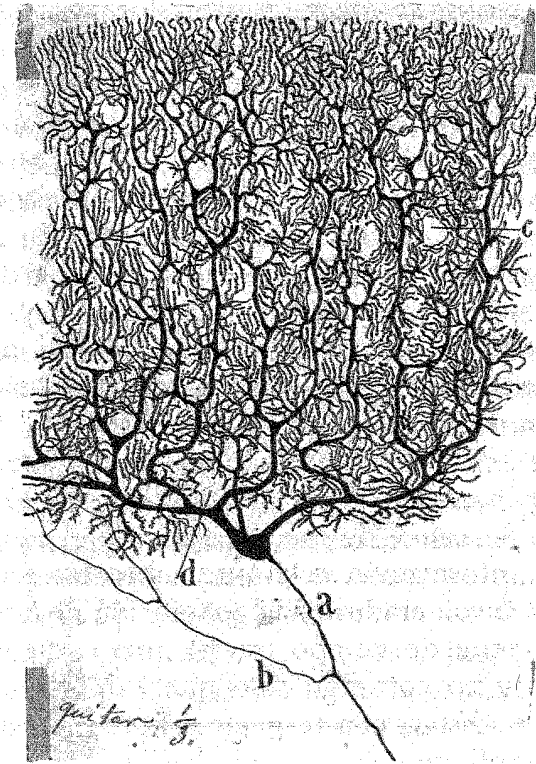


Figura 6. Ejemplo de arborización dendrítica (dibujo en tinta china por Santiago Ramón y Cajal a partir de la observación de una célula de Purkinje del cerebelo humano, 1899). Se ha encontrado, por ejemplo, que dichas estructuras *in vivo* y estando completamente desarrolladas en retina de gato presentan una dimensión  $D_f \sim 1.6$ , por lo que se consideran como formas fractales fisiológicas [26]. Este valor de dimensión fractal ofrece información relevante relacionada con el proceso subyacente de crecimiento neuronal a nivel molecular, puesto que coincide con las dimensiones encontradas en modelos y fenómenos de difusión limitada. En éstos, los factores de mayor influencia corresponden a los inherentes de la ecuación de difusión (ver capítulo 6a), y a reglas de crecimiento estocástico; específicamente campos eléctricos y gradientes químicos, conociéndose por otro lado que éstos pueden modificar las formas de las neuronas [26]. Imagen tomada de *Ciencia y arte*, 2ª edición, ISBN 84-95321-46-7, Santiago Ramón y Cajal (1852-2003), V. A. Impresores, Madrid (2004).

## 5. FLUCTUACIONES FRACTALES EN SERIES DE TIEMPO

Un enfoque fractal, siendo útil para describir formas geométricas sin una escala de longitud característica o predominante, puede ser extendido para analizar series de tiempo con fluctuaciones cuyos componentes, similarmente, no se manifiesten únicamente en una escala de tiempo específica. Así, es posible identificar en diferentes contextos series consideradas como fractales, ya que presentan fluctuaciones irregulares a través de diferentes escalas temporales y resultan invariantes estadísticamente, con respecto a la escala de análisis [14]. Éstas son originadas por procesos dinámicos que generalmente involucran interacciones no lineales ocurriendo lejos del equilibrio. Se asume de esta manera que el análisis fractal ofrece información relevante sobre los fenómenos dinámicos involucrados en la generación de las mismas.

En una serie de tiempo fractal, una característica o propiedad  $q$  no converge sino que exhibe una ley de potencia estadística con respecto a la escala  $s$  en la que ésta se cuantifique:

$$q = ps^\varepsilon \quad (2)$$

siendo  $p$  un factor de proporcionalidad, y  $\varepsilon$  un parámetro conocido como el exponente fractal o de escala que puede ser relacionado analíticamente con  $D_f$  [20].

Los antecedentes principales del análisis fractal en series de tiempo se identifican en los trabajos de Hurst y colaboradores (1965), de donde se derivó una única ley de potencia empírica para describir el comportamiento de las fluctuaciones en fenómenos naturales tan diversos como precipitaciones, temperaturas, manchas solares, descargas de ríos, sedimentos, anillos de árboles, etcétera.

Utilizando un nuevo método estadístico (*análisis de rango reescalado R/S*), los autores determinaron que dichos fenómenos pueden ser caracterizados por un tipo de exponente de escala, también conocido como exponente de Hurst  $H$ , notablemente similar ( $H = 0.73 \pm 0.09$ ) [19,27]. Puesto que  $D_f = 2 - H$ , los resultados sugirieron entonces que el trazo de las fluctuaciones de los fenómenos correspondía a una curva fractal. Pero lo que resultó más relevante fue el hecho de encontrar en fenómenos naturales como éstos un exponente de escala  $H$  mayor a 0.5; valor que se obtendría, según identificaron Hurst y colaboradores, en caso de que los mismos presentaran fluctuaciones sin dependencias estadísticas a lo largo de diferentes escalas temporales. Esto indicó, por ejemplo, que la descarga de un río involucra un comportamiento persistente (con memoria), ya que no sólo depende de las precipitaciones recientes, sino también de aquellas más remotas o tempranas: si las fluctuaciones involucran una tendencia creciente, la persistencia implicará el mantenimiento de la misma en una observación futura. Por el contrario, una tendencia decreciente sugerirá el mismo comportamiento decreciente en observaciones posteriores.

De esta manera, el análisis fractal se extendió como una conveniente aproximación para determinar, e inclusive cuantificar, el grado de irregularidad en series de fluctuaciones temporales. A pesar de que se han desarrollado diversos métodos fractales con estos fines, la mayoría tienen en común la determinación de alguna relación como la expresada por la ecuación (2) con el propósito de ofrecer un exponente de escala que ofrezca la idea sobre la posibilidad de persistencia o fractalidad, pero, sobre todo, de la regularidad —irregularidad— en las series [20].

El enfoque analítico representado por la ecuación (2) se emplea entonces en una variedad de métodos fractales para obtener exponentes de escala a partir de diferentes parámetros derivados del dominio del tiempo o de la frecuencia. Así existen métodos que utilizan parámetros estadísticos descriptivos (por ejemplo en los análisis de rango reescalado, de dispersión y de fluctuaciones sin tendencia), pero también a las representaciones logarítmicas de la densidad de potencia espectral, a partir de las que se obtiene un exponente espectral.

Otras alternativas para determinar invariancia o escalamiento a través de leyes de potencia como la expresada por la ecuación (2), utilizan el estimador de máxima similitud [28], un análisis espectral de grano grueso [29], la transformación *wavelet* o una estimación lineal por modelos autorregresivos integrados con promedios móviles [20].

## 6. ANÁLISIS DE FLUCTUACIONES SIN TENDENCIA

Uno de los métodos fractales que en mayor medida se ha utilizado para explorar series de tiempo es el *análisis de fluctuaciones sin tendencia* (o DFA por sus siglas en inglés) que fue introducido por Peng *et al.* en 1994, particularmente para el análisis de fluctuaciones en la frecuencia cardíaca un año más tarde [30], siendo una modificación del análisis de la raíz cuadrática media para datos no estacionarios. De acuerdo a información presentada en el *ISI Web of Knowledge*, hasta octubre de 2008 el artículo de Peng y colaboradores había sido citado ampliamente en casi setecientas ocasiones. Esto probablemente como consecuencia de la ventaja principal del método que en principio permite identificar la existencia de

persistencia —correlaciones de largo plazo— en series de tiempo no estacionarias; evitando la detección espuria de una supuesta fractalidad que simplemente podría ser un efecto de la no estacionalidad.<sup>5</sup> Con relación al análisis de fluctuaciones cardíacas, el método se propuso como un esquema para evaluar el grado en que los mecanismos intrínsecos de control nervioso se reflejan en la propiedad de invariancia<sup>6</sup> o escalamiento de dichas fluctuaciones, estudiándolas sin tener que controlar rigurosamente la actividad física para registrarlas y pudiendo así evaluarlas en condiciones ambulatorias.

Esencialmente, en el análisis de fluctuaciones sin tendencia la serie de datos o fluctuaciones originales es integrada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y(k) = \sum_{i=1}^k [RR(i) - \overline{RR}] \quad (3)$$

en donde  $Y(k)$  representa el  $k$ -ésimo valor resultado de la integración ( $k = 1, 2, \dots, L$ ),  $RR(i)$  es el  $i$ -ésimo valor o intervalo latido a latido, y  $\overline{RR}$  es el valor medio de toda la serie original con  $L$  intervalos o muestras en total. Posteriormente la serie integrada es dividida en segmentos independientes del mismo tamaño  $n$  que comprenden a un número de intervalos cardíacos, los cuales abarcan una escala de tiempo particular. La tendencia local en estos segmentos,  $Y_n$ , es estimada por un ajuste polinomial

<sup>5</sup> El análisis de fluctuaciones sin tendencia se ha utilizado en contextos tan diversos como análisis de ADN, fluctuaciones electroencefalográficas, marcha y actividad motora, datos meteorológicos, fluctuaciones climáticas, descargas en ríos, señales eléctricas, sistemas estelares binarios, receptores nerviosos, música, economía, etcétera.

<sup>6</sup> Condición que ya había sido identificada en estudios previos sobre fluctuaciones cardíacas, por ejemplo en el trabajo de Kobayashi y Musha [31].



(generalmente de orden 1), con el propósito de restarla localmente para reducir o eliminar las transiciones no estacionarias. Así, la fluctuación cuadrática media  $F$  en función de  $n$  puede ser calculada de la siguiente manera:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{k=1}^L [Y(k) - Y_n(k)]^2} \quad (4)$$

Este procedimiento se repite para un conjunto amplio de valores de  $n$ , obteniéndose una relación que se aproxima por el siguiente modelo o ley de potencia:

$$F(n) \approx n^\alpha \quad (5)$$

Como en otros métodos fractales, el exponente de escala  $\alpha$  se estima por la pendiente obtenida a partir de una representación logarítmica entre las variables ( $F(n)$  y  $n$ ). En el caso de fluctuaciones cardiacas, el exponente  $\alpha$  normalmente se estima para un intervalo de escalas  $n$  que abarca ya sea un corto plazo (menor a 11 intervalos cardiacos consecutivos) o, por el contrario un largo plazo (mayor a 11 intervalos). Esto a raíz de que el comportamiento a lo largo de las escalas no es estrictamente uniforme sino que, básicamente, refleja dos regiones o dinámicas fractales principales asociadas a los diferentes mecanismos o factores de control cardiaco, que operan o influyen ya sea en un corto o largo plazo. Mientras que un exponente con valor  $\alpha = 0.5$ , indica que la serie de fluctuaciones es aleatoria o no presenta correlaciones, el valor  $\alpha = 1$  refleja la presencia de correlaciones persistentes e inclusive fractalidad.<sup>7</sup> Por último,

<sup>7</sup> Correspondiendo o representando un proceso del tipo  $1/f$  por su correspondiente espectro en frecuencia.

$\alpha = 1.5$  sugiere que la serie presenta fluctuaciones más regulares cuyo comportamiento estadístico con respecto a la escala no puede ser adecuadamente descrito por una ley de potencia, tendiendo a manifestarse únicamente en ciertas escalas particulares.

En la figura 7, se ilustran las etapas del análisis de fluctuaciones sin tendencia en una serie típica de fluctuaciones cardiacas. Nótese los valores obtenidos para el exponente de escala en el corto ( $\alpha_1$ ) y largo plazo ( $\alpha_2$ ).

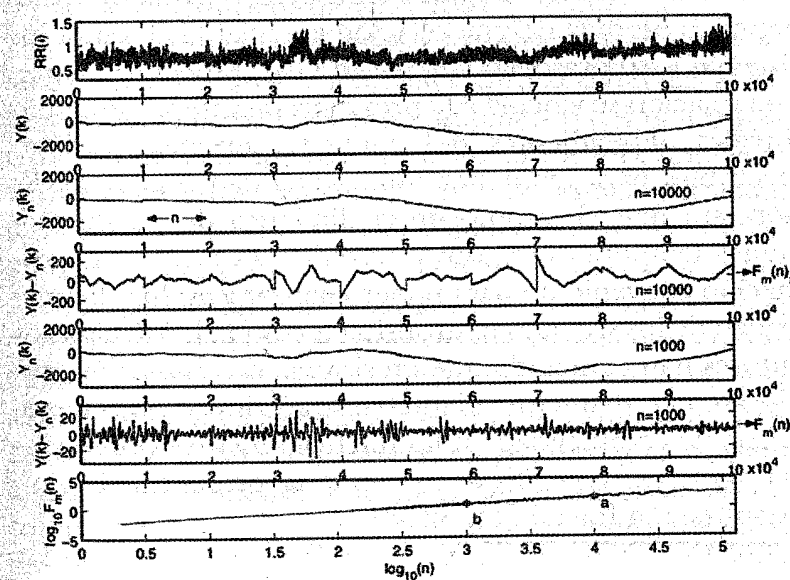


Figura 7. Etapas del análisis de fluctuaciones sin tendencia para una serie de fluctuaciones en los intervalos cardiacos (RR) de un sujeto presumiblemente sano (registrado por aproximadamente 24 horas). Se muestra como ejemplo  $Y_n(k)$  y  $F$  que se obtienen con  $n = 10000$  (a) y  $n = 1000$  (b). El valor de  $\alpha_1$  encontrado ( $4 < n < 11$ ) es igual a 1.13, y el de  $\alpha_2$  ( $11 < n < 25000$ ) es igual a 1.04. Este último indicando una estructura fractal en dichas fluctuaciones temporales.

## 7. FLUCTUACIONES CARDIACAS, FRACTALIDAD Y EL NEURODESARROLLO FUNCIONAL

Varios estudios apuntan hacia la influencia de actividades nerviosas centrales en las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca. Se ha reportado, por ejemplo, que la severidad de daño neurológico producido por diferentes causas se refleja en una significativa disminución de variabilidad cardiovascular latido a latido [16].

Tal como ya se ha mencionado, se asume que la circunstancia anterior demuestra un desacoplamiento fisiológico, o pérdida de una relación esencial [17], entre los sistemas cardiovascular y nervioso [16]. Específicamente, esta relación se vincula a la presencia de interacciones no lineales dependientes del contexto, mismas que son favorables para mantener una estabilidad funcional. Es por esto que el estudio de la dinámica de las fluctuaciones temporales se convierte entonces en una aproximación conveniente para poder analizar y evaluar la integridad de los sistemas neurofisiológicos [17]. Así, algunos autores han concluido que un sistema de regulación cardiovascular altamente adaptable se reconoce por la existencia de complejidad en las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca, específicamente por la presencia de una organización fractal [14, 32-34].

Los resultados de diversos estudios coinciden con las interpretaciones anteriores. Por ejemplo, mientras que la falta de inervación en los trasplantes cardíacos introduce cambios significativos en las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca [35], el comportamiento fractal de las mismas en el corto plazo disminuye a consecuencia de un bloqueo farmacológico de la actividad nerviosa vagal (parasimpática) [36]. Además, puesto que las transiciones entre las etapas de sueño y vigilia introducen cambios

en la fractalidad de las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca, las actividades nerviosas centrales ya sean tálamo-corticales, reticulares o del sistema límbico, igualmente parecen manifestarse en la dinámica fractal de dichas fluctuaciones [37,38]. Finalmente, recientemente se ha encontrado que la estructura u organización fractal no así la magnitud de estas fluctuaciones se conserva con la vejez, cuya interesante implicación parece ser entonces que las interacciones involucradas en la regulación neuroautonómica permanecen intactas a pesar del deterioro en otras funciones fisiológicas [39].

En este contexto ha resultado relevante el estudio a largo plazo de las fluctuaciones cardíacas fetales como una posible aproximación o seguimiento del neurodesarrollo funcional. Al respecto, se encontraron cambios en la dinámica cardiovascular durante la gestación humana tendiendo hacia una dinámica similar a la de los adultos sanos (quienes presentan fractalidad o correlaciones persistentes sin escalas predominantes). Lo anterior parece ocurrir partiendo de un contexto sin correlaciones o fractalidad en el largo plazo y con un cambio significativo alrededor de las 24 semanas de gestación (figura 8) [40]. Estas observaciones son relevantes para estudiar la naturaleza del fenómeno, indicando que el surgimiento del comportamiento fractal en las fluctuaciones cardíacas probablemente se produzca específicamente como resultado de la maduración en la actividad nerviosa; principalmente en los sistemas tálamo-cortical y reticular. Por otro lado, confirman la información potencial relacionada con el desarrollo funcional y madurez fetal que puede ser extraída al analizar dichas fluctuaciones. Esta circunstancia se sustenta también por el comportamiento en el corto plazo, ya que a raíz de los antecedentes anteriores se encontró que las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca

fetal nuevamente presentan dinámicas similares a la de los datos de adultos. Lo anterior no obstante que estas fluctuaciones manifiestan una magnitud reducida, lo que parece constituirse en la identificación —de manera no invasiva— de la existencia específica de estructura y actividad funcional en los mecanismos nerviosos de control autónomico con anterioridad a la semana 21 de la gestación (figura 9) [41].

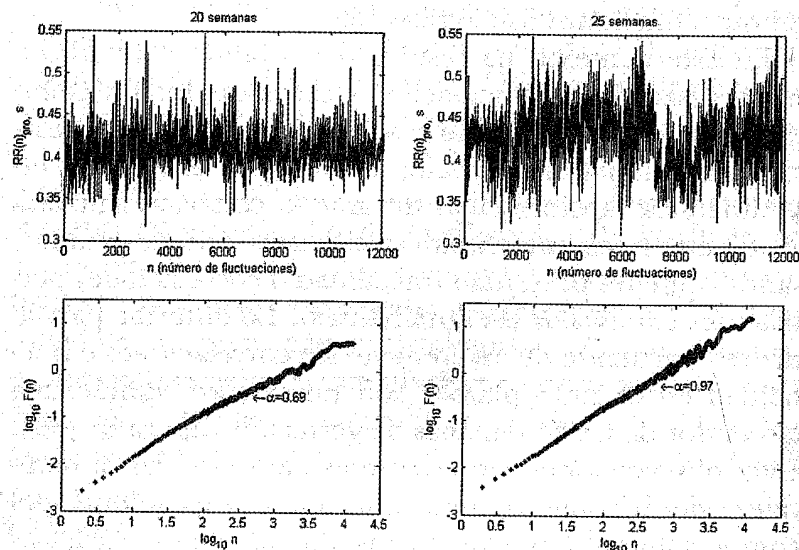


Figura 8. Surgimiento de estructura o comportamiento fractal en las fluctuaciones cardiacas fetales a largo plazo. Las fluctuaciones  $RR_{pro}$  que se presentan fueron obtenidas al promediar los valores de intervalos cardiacos consecutivos ocurridos cada dos segundos. Los exponentes de escala  $\alpha$ , estimados por el análisis de fluctuaciones sin tendencia, ilustran un cambio significativo en la dinámica cardiovascular fetal, teniendo un comportamiento más aleatorio en la semana 20 de la gestación y un comportamiento que ya muestra correlaciones de largo plazo o fractalidad en la semana 25 [40].

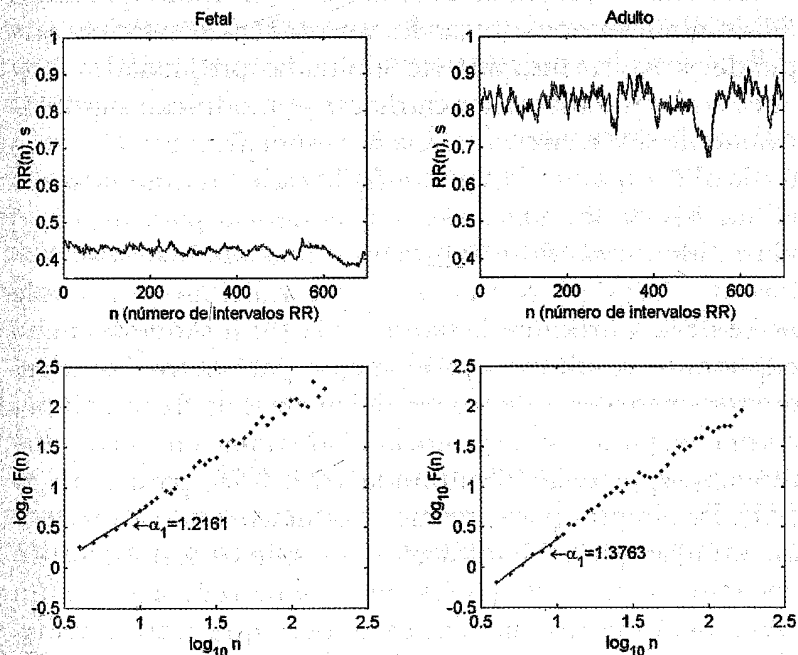


Figura 9. Comparación de la fractalidad a corto plazo en las fluctuaciones de los intervalos cardiacos consecutivos entre un feto y un adulto. Nótese cómo, a pesar de que las fluctuaciones fetales claramente presentan una magnitud reducida, el valor obtenido por el análisis de fluctuaciones sin tendencia para el exponente de escala  $\alpha_1$  resulta similar al del adulto. Esto indica la existencia de estructura e irregularidad en las fluctuaciones fetales que se atribuye al surgimiento temprano de actividad funcional en los mecanismos nerviosos de control autónomico, inclusive desde etapas previas al quinto mes de la gestación [41].

## 8. IMPORTANCIA CLÍNICA DE UN ENFOQUE FRACTAL

Varios estudios recientes sugieren la utilidad o conveniencia de una aproximación fractal para el análisis de las fluctuaciones cardiacas.

En concreto, algunos autores han reportado que antes del inicio de una taquicardia ventricular, condición que puede provocar una muerte súbita, las propiedades fractales en las fluctuaciones cardiacas se modifican significativamente. Esta circunstancia fue específicamente encontrada al comparar el exponente de escala  $\alpha$  obtenido por el análisis de fluctuaciones sin tendencia para un corto plazo, identificándose exponentes que cambian hacia valores mayores a 1 con respecto a condiciones en donde no se llega a producir la taquicardia [42]. Además dicho exponente resultó como el mejor parámetro independiente, entre otros derivados del análisis de fluctuaciones cardiacas, para predecir mortalidad en pacientes con una función ventricular disminuida ( $\alpha < 0.75$ , para  $n < 11$ ) [43]. Finalmente, este mismo exponente también parece de utilidad para identificar a los sujetos familiares de pacientes con cardiopatías que comienzan a sufrir un crecimiento ventricular anormal, pero que, críticamente, no manifiestan aún signos clínicos evidentes ( $\alpha \approx < 1.30$ ) [34].

## 9. ANÁLISIS MULTIFRACTAL DE FLUTUACIONES CARDIACAS

Buscando una mejor caracterización de la complejidad, irregularidad o inclusive la falta de homogeneidad en las fluctuaciones de la frecuencia cardiaca, éstas también se han analizado desde un enfoque multifractal [44].

A diferencia de las series —mono— fractales, cuya homogeneidad en las propiedades de escala a lo largo de las mismas permite que sean adecuadamente descritas por un único exponente, las series multifractales requieren varios exponentes de escala para describirse

correctamente. De hecho, estas series se descomponen en subconjuntos caracterizados por diversos exponentes que localmente reflejan comportamientos de escala diferentes.

Así, se ha encontrado que las fluctuaciones de la frecuencia cardiaca registradas en sujetos sanos muestran claramente propiedades de escala heterogéneas o multifractalidad. Además, resulta relevante que la presencia de ésta no se afecta por la reducción de actividad, estimulación externa u otros factores de modificación conductual;<sup>8</sup> pero sí se reduce considerablemente por la alteración de los mecanismos intrínsecos de control autonómico. Esto último en particular al suprimir la influencia parasimpática en el control cardiaco mediante bloqueo farmacológico, o como consecuencia del deterioro de dicha influencia en sujetos con insuficiencia cardiaca crónica [44-45].

Por último, puesto que la multifractalidad se relaciona directamente con propiedades no lineales en las series de tiempo, la existencia de ésta en las fluctuaciones cardiacas de sujetos sanos parece confirmar el reflejo de una dinámica no lineal. Esta circunstancia resulta de utilidad para el planteamiento de modelos con una mejor correspondencia a los mecanismos o procesos fisiológicos de control cardiovascular, que de esta manera parecen ocurrir claramente lejos del equilibrio [44, 46-47].

## 10. CONSIDERACIONES FINALES

De acuerdo a información del *ISI Web of Knowledge*, tan sólo en el año 2008 se publicaron alrededor de 16500

<sup>8</sup> Tales como la ingesta o los cambios posturales.

artículos que se relacionan o utilizan a la variabilidad de la frecuencia cardiaca. Pero, siendo una circunstancia razonable y necesaria en investigación, es conveniente mencionar que no existe aún un claro consenso sobre el significado fisiológico o importancia clínica de las fluctuaciones en la frecuencia cardiaca. Mientras que algunos sectores consideran que el análisis de éstas y otros parámetros cardiovasculares proporcionan, inequívocamente, información acerca del control autonómico de la circulación, otros identifican su relevancia como el reflejo de un complejo fenómeno —o epifenómeno— fisiológico que claramente se deriva de este control, pero que resulta impreciso para ofrecer mediciones específicas del mismo [13].

Surge así la necesidad de seguir buscando una mejor comprensión de la integración involucrada en el control cardiovascular. Esto retoma mayor conveniencia al considerar sobre todo que el análisis de fluctuaciones, no obstante la información que aparentemente ofrece sobre prognosis en patologías cardiacas, permanece sin incorporarse ampliamente a la práctica clínica [13,34].

Es en este reto donde la adopción de métodos derivados de la física estadística, como los que se presentan en este capítulo, parece ser favorables para conocer y modelar los mecanismos de origen en las fluctuaciones cardiacas, así como para proporcionar herramientas potenciales de exploración clínica. Las actividades interdisciplinarias de investigación en estas direcciones, se han empezado a considerar incluso en el ámbito de una nueva área de interés definida como *física cardiovascular* [48].

## REFERENCIAS

1. Cerejido M., *Orden equilibrio y desequilibrio, una introducción a la biología*, Editorial Nueva Imagen, México (1978).
2. Ganong W., *Fisiología médica*, 20ª edición, Manual Moderno, México (2006).
3. Bronzino J. (editor), *The biomedical engineering handbook*, cap. 1, 3-14, CRC Press, Boca Ratón (1995).
4. Rowell L. B., *Human cardiovascular control*, Oxford University Press, Nueva York, (1993).
5. Russek M., Cabanat M., *Regulación y control en biología*, CECSA, México (1983).
6. Levy M., Schwartz P., *Vagal control of the heart, Experimental basis and clinical implications*, Futura Publishing Company, Nueva York (1994).
7. Glass L. *Synchronization and rhythmic processes in physiology*, *Nature* **410**, 277-284, 2001.
8. Stauss H. M., *Heart rate variability*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, R927-R931, 2003.
9. Saul J. P., Berger R. D., Albrecht P., Stein S. P., Chen M. H., Cohen R. J., *Transfer function analysis of the circulation, unique insights into cardiovascular regulation*. *Am. J. Physiol.* **261**, H1231-H1245, 1991.
10. Hales S., *Statistical essays, containing haemastatistics*, 2ª edición, vol. II, Innys and Maney, Londres (1740).
11. Hon E. H., Lee S. T., *Electronic evaluation of the fetal heart rate. VIII Patterns preceding fetal death, further observations*, *Am. J. Obst. & Gynec.* **87**, 814-826.
12. Task-Force. *Heart rate variability. standards of measurements, physiological interpretation, and clinical use*, *Eur. Heart J.* **17**, 354-381, 1996 (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology).
13. Parati G., Mancia G., Di Renzo M., Castiglioni P., Taylor J. A., Studinger P., *Cardiovascular variability is/is not an index of autonomic control of circulation*, *J. Appl. Physiol.* **101**, 676-682, 2006.
14. Goldberger A. L., *Non-linear dynamics for clinicians, chaos theory, fractals, and complexity at the bedside*, *Lancet* **347**, 1312-1314, 1996.
15. Pikkujamsa S. M., Makikallio T. H., Sourander L.B., Raiha I. J., Puukka P., Skytta J., Peng. C.-K., Goldberger A.L., Huikuri H. V., *Cardiac interbeat interval dynamics from childhood to senescence. Comparison of conventional and new measures based on fractals and chaos theory*, *Circulation* **100**, 393-399, 1999.



16. Goldstein B., Toweill D., Lai S., Sonnenthal K., Kimberly B., *Uncoupling of the autonomic and cardiovascular systems in acute brain injury*, *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **275**, 1287-1292, 1998.
17. Buchman T. G., *The community of the self*, *Nature* **420**, 246-251, 2002.
18. Mandelbrot B., *La geometría fractal de la naturaleza*, 2ª edición, Metatemáticas Tusquets, Barcelona (2003).
19. Feder J., *Fractals*, Plenum Press, Nueva York (1988).
20. Eke A., Herman P., Kocsis L., Kozak L. R., *Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals*, *Physiol. Meas.* **23**, R1-R38, 2002.
21. Taylor R. P., Micolich A. P., Jonas D., *Fractal analysis of Pollock's drip paintings*, *Nature* **399**, 422, 1999.
22. Taylor R. P., Guzman R., Martin T. P., Hall G. D. R., Micolich A. P., Jonas D., Scannell B. C., Fairbanks M. S., Marlon C. A., *Authenticating Pollock paintings using fractal geometry*, *Pattern Recognition Letters* **28**, 695-702, 2007.
23. Hausdorff J. M., Peng C-K., Ladin Z., Wei J. Y., Goldberg A. L., *Is walking a random walk? Evidence for long-range correlations in stride interval of human gait*, *J. Appl. Physiol.* **78**, 349-358, 1995.
24. West B. J., Goldberger A. L., *Physiology in fractal dimensions*, *American Scientist* **75**, 354-365, 1987.
25. Gabryś E., Rybaczuk M., Kędzia A., *Fractal models of circulatory system, Symmetrical and asymmetrical approach comparison*, *Chaos, Solitons & Fractals* **24**, 707-715, 2005.
26. Caserta F., Stanley H. E., Eldred W. D., Daccord G., Hausman R. E., Nittmann J., *Physical mechanisms underlying neurite outgrowth, A quantitative analysis of neuronal shape*, *Phys. Rev. Lett.* **64**, 95-98, 1990.
27. Hurst H. E., Black R., Sinaika Y. M., *Long-term storage in reservoirs, An experimental study*, Constable, Londres (1965).
28. Pilgram B., Kaplan D. T., *A comparison of estimators for 1/f noise*, *Physica D* **114**, 108-122, 1998.
29. Yamamoto Y., Hughson H., *Coarse-graining spectral analysis, new method for studying heart rate variability*, *J. Appl. Physiol.* **71**, 1143-1150, 1991.
30. Peng C-K., Havlin S., Stanley H. E., Goldberger A. L., *Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series*, *Chaos* **5**, 82-87, 1995.
31. Kobayashi M., Musha T., *1/f fluctuations of heartbeat periods*, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **29**, 456-457, 1982.
32. Walleczek J. (editor), *Self-organized biological dynamics and nonlinear control*, cap. 3, 66-96, Cambridge University Press, Cambridge (2000).
33. Goldberger A. L., Peng C-K., Lipsitz L. A., *What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease?*, *Neurobiol. Aging* **23**, 23-26, 2002.
34. Mahon N. G., Hedman A. E., Padula M., et al., *Fractal correlation properties of R-R interval dynamics in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy*, *Eur. J. Heart Fail.* **4** 151-158, 2002.
35. Bigger J. T., Steinman R. C., Rolnitzki L. M., Fleiss J. L., Albrecht P., Cohen R. J., *Power law behaviour of RR-interval variability in healthy middle-aged persons, patients with recent acute myocardial infarction, and patients with heart transplants*, *Circulation* **93**, 2142-2151, 1996.
36. Yamamoto Y., Nakamura Y., Sato H., Yamamoto M., Kato K., Hughson R. L., *On the fractal nature of heart rate variability in humans, effects of vagal blockade*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **269**, R830-R837, 1995.
37. Togo F., Yamamoto Y., *Decreased fractal component of human heart rate variability during non-rem sleep*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H17-H21, 2000.
38. Bunde A., Havlin S., Kantelhardt J. W., Penzel T., Peter J. H., Voigt K., *Correlated and uncorrelated regions in heart-rate fluctuations during sleep*, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3736-3739, 2000.
39. Schmitt D. T., Ivanov P. Ch., *Fractal scale-invariant and nonlinear properties of cardiac dynamics remain stable with advanced age, a new mechanistic picture of cardiac control in healthy elderly*, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **293**, R1923-R1937, 2007.
40. Echeverría J. C., Woolfson M. S., Crowe J. A., Hayes-Gill B. R., Piéri J. F., Spencer C. J. y James D. K., *Does fractality in heart rate variability indicate the development of fetal neural processes?*, *Physics Letters A* **331**, 225-230, 2004.
41. Ortiz M. R., Aguilar S. D., Álvarez-Ramírez J., Martínez A., Vargas-García C., González-Camarena R., Echeverría J. C., *Prenatal RR fluctuations dynamics, detecting fetal short-range fractal correlations*, *Prenatal Diagnosis* **26**, 1241-47, 2006.

42. Baumert M., Wessel N., Schirdewan A., Voss A., Abbott D., *Scaling characteristics of heart rate time series before the onset of ventricular tachycardia*, *Ann. Biomed. Eng.* **35**, 201-207, 2007.
43. Huikuri H. V., Makikallio T. H., Peng C-K., Goldberger A. L., Hintze U., Moller M., *Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction*, *Circulation* **101**, 47-53, 2000.
44. Ivanov P. C., Amaral L. A. N., Goldberger A. L., Havlin S., Rosenblum M. G., Struzik Z. R., Stanley H. E., *Multifractality in human heartbeat dynamics*, *Nature* **399**, 461-465, 1999.
45. Amaral L. A. N., Ivanov P. C., Aoyagi N., Hidaka I., Tomono S., Goldberger A. L., Stanley H. E., Yamamoto Y., *Behavioral-independent features of complex heartbeats dynamics*, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 6026-6029, 2001.
46. Kotani K., Struzik Z. R., Takamasu K., Stanley H. E., Yamamoto Y., *Model for complex heart rate dynamics in health and diseases*, *Phys. Rev. E* **72**, 041904, 2005.
47. Struzik Z. R., Hayano J., Sakata S., Kwak S., Yamamoto Y., *1/f scaling in heart rate requires antagonistic autonomic control*, *Phys. Rev. E* **70**, 050901(R), 2004.
48. Wessel N., Kurths J., Ditto W., Bauernschmitt R., *Introduction to cardiovascular physics*, *Chaos* **17**, 15101, 2007.

## CAPÍTULO 21

### ASPECTOS FÍSICOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL SONIDO RESPIRATORIO

SONIA CHARLESTON VILLALOBOS, TOMÁS ALJAMA  
CORRALES, RAMÓN GONZÁLEZ CAMARENA\*  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

#### 1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la medicina, la utilidad clínica que tiene el método de *auscultación del tórax* y, particularmente, de los sonidos generados al interior de los pulmones durante el ciclo respiratorio, es hoy por hoy incuestionable. El método tiene su origen en la práctica médica ejercida por Hipócrates (460-379 a.C.), pero su fundamento científico se da sólo a partir de 1816, cuando René Teófilo Jacinto Laënnec inventa y utiliza el estetoscopio (del griego *stêthos* (pecho) y *skopeo* (observar, ver)) [1].

La auscultación por sí misma es uno de los cuatro métodos básicos de exploración física del paciente. Para realizarla, se utiliza el sentido de la audición, a partir del cual se capturan e interpretan diversos sonidos producidos dentro del cuerpo. En este sentido, el médico puede seguir dos técnicas; una de ellas, llamada *auscultación inmediata*, que consiste en colocar directamente el oído sobre la zona corporal o región torácica que interesa

\* rgc@xanum.uam.mx

escuchar; la otra técnica, denominada *auscultación mediada*, se efectúa empleando un instrumento o el estetoscopio para hacer más audibles los sonidos producidos por el paciente. La colocación del oído o del estetoscopio puede hacerse sobre la superficie del tórax, del abdomen, de una articulación, o de cualquiera otra región corporal donde se pueda generar un sonido. Así, se habla en ocasiones de auscultación torácica, abdominal, articular, etcétera o, de manera más específica, de la auscultación cardíaca, pulmonar, peristáltica, vascular, etcétera. Actualmente, en casi todos los campos de la medicina, desde la medicina general hasta las especialidades médicas, y en especial en la neumología, se toman decisiones diagnósticas basadas en gran medida en el uso del estetoscopio para identificar características acústicas de los sonidos corporales, entre ellos los sonidos respiratorios [2].

Cabe señalar que en la presente descripción se hablará únicamente de la auscultación de sonidos generados durante el proceso ventilatorio, por lo que el objeto de estudio será el sonido respiratorio. Habría que hacer un par de puntualizaciones sobre las premisas implícitas al estar auscultando; en primer lugar, el sonido está dentro del rango audible por el ser humano; es decir, entre 20 y 20 000 Hz y, en segundo lugar, se asume que los sonidos producidos en el interior del cuerpo contienen información sobre las características físicas de las estructuras y los mecanismos involucrados tanto en su generación como en su transmisión y propagación [3].

Es de resaltar cómo los instrumentos *facilitadores* de la auscultación han evolucionado desde un simple cilindro o tubo de madera (el tubo de Laënnec) hasta sistemas que contienen micrófonos, por lo que actualmente se habla de la *auscultación electrónica*. La misma auscultación

electrónica ha evolucionado hacia formas de adquisición digital y hacia nuevas formas de análisis, interpretación e incluso de representación de los sonidos respiratorios, de manera que se ha llegado a la *imagenología acústica del tórax*, gracias tanto a los avances tecnológicos como a la comprensión física del sonido y su asociación con estructuras corporales normales y anormales.

Sin embargo, y no obstante los avances tecnológicos, aún en nuestros días existen limitaciones para determinar tanto los mecanismos y la localización de los posibles generadores del sonido respiratorio, como de las características físicas de las estructuras involucradas en la transmisión hasta la superficie corporal donde se ausculta. Evidentemente la auscultación electrónica conlleva al menos cuatro ideas que se presume representan ventajas prácticas sobre la auscultación clínica convencional del sonido respiratorio; primero, lograr una valoración más cuantitativa y precisa, segundo, reducir la subjetividad propia de la auscultación con el oído, tercero, permitir la representación visual del sonido y, cuarto, aumentar el potencial diagnóstico al obtener información no accesible de manera directa con nuestro sentido de la audición.

El propósito de este capítulo es describir, por un lado, los posibles mecanismos de generación y transmisión del sonido respiratorio y, por otro, cómo la auscultación electrónica ha facilitado la obtención de información y la evaluación de dichos mecanismos.

No debe perderse de vista que la era de la auscultación electrónica y el procesamiento digital de señales respiratorias son incipientes, por lo que el camino por recorrer es aún largo. Las estimulantes palabras que el doctor Robert G. Loudon nos legó en su actualización sobre sonido respiratorio de 1988 [4], son aún más claras al respecto:

La transformación del sonido (respiratorio) a una imagen es ahora técnicamente más simple, y estamos aprendiendo a complementar nuestra percepción subjetiva con desplegados objetivos, gráficos, medibles y reproducibles, justo como los niños complementan su lenguaje oral con la escritura.

## 2. GENERACIÓN DEL SONIDO

### 2.1. Ondas mecánicas transversales y longitudinales

El sonido en general corresponde a *ondas mecánicas* generadas por la vibración de un objeto, cuya energía se trasmite y propaga a lo largo de uno o varios medios elásticos hasta el oído o los órganos encargados de la audición. Dicha vibración se origina al aplicar una fuerza suficiente para desplazar desde su posición de equilibrio alguna parte del medio elástico y se transmite paulatinamente a estructuras o medios elásticos vecinos [5-7].

Dada la naturaleza elástica del objeto, existe una fuerza restauradora que provoca que la perturbación inicial regrese al punto de equilibrio, incluso rebasándolo en sentido contrario. La consecuencia es una onda que se va transmitiendo subsecuentemente hasta el final de la estructura elástica. Si alrededor de esta estructura existe en contacto otro medio elástico, es factible su transmisión y finalmente su propagación hasta hacer vibrar la membrana del tímpano. Una cuerda en vibración transmite las perturbaciones al aire que la rodea y éste las propaga hasta el oído. Desde este punto de vista, las ondas mecánicas, y por lo tanto las ondas sonoras, sólo existen cuando se integran un sistema vibrante y un medio elástico para transmitir y propagar las ondas.

El movimiento del sistema vibrante bajo una fuerza se denomina *movimiento armónico simple* y está regido por la *Ley de Hooke*, de manera que:

$$F = -kx, \quad (2.1)$$

donde  $x$  es el desplazamiento y  $k$  la constante elástica del sistema. La manera en que se produce y se transmite la vibración permite clasificar a las ondas mecánicas en dos tipos, *ondas transversales* y *ondas longitudinales*. Las ondas transversales se generan por la aplicación de una fuerza que perturba y mueve en sentido perpendicular partículas de la estructura, como sería el caso de la cuerda en la figura 2.1. Las partículas no avanzan a lo largo de la cuerda, sino que su energía se transmite a partículas vecinas

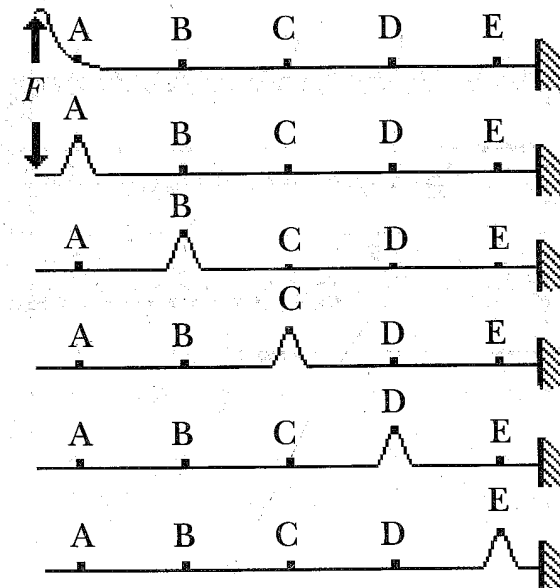


Figura 2.1. Generación y propagación de una onda mecánica transversal, al aplicar una fuerza  $F$  que perturba al sistema. Nótese cómo los puntos (A-E) no avanzan, pero sí la deformación.

y finalmente, se propaga recorriendo todo el medio. El mismo fenómeno puede observarse en dos dimensiones, como la superficie de un fluido o la membrana de un tambor, en las que la fuerza aplicada deforma localmente la superficie, pero finalmente la perturbación local se transmite de manera perpendicular con respecto a la dirección de la propagación.

Las ondas longitudinales responden a una fuerza paralela aplicada a un medio elástico en el mismo sentido de su proyección. En este caso la deformación local y la movilización de partículas del medio se desplazan parcialmente longitudinalmente con respecto al sistema, figura 2.2. Nótese como la deformación se transmite y propaga a todo lo largo del sistema pero las partículas sólo se desplazan en una magnitud proporcional a la fuerza pertur-

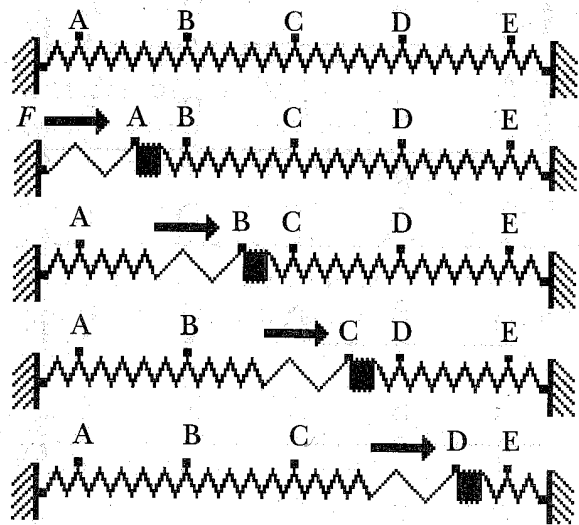


Figura 2.2. Generación y propagación de una onda longitudinal, al aplicar una fuerza  $F$  que perturba al sistema. Nótese el desplazamiento parcial en sentido longitudinal de los puntos (A-E), pero sólo la deformación se propaga hasta el final.

badora. El ejemplo clásico se observa en los resortes; sin embargo, los bloques de cualquier fluido presentan este tipo de ondas con transmisión longitudinal.

En particular las ondas sonoras en aire son ondas longitudinales debido a que las partículas del medio vibran paralelamente con respecto a la dirección de propagación. Al igual que en el caso del resorte, las moléculas del aire se mueven en la dirección de la fuerza aplicada haciendo que las moléculas se compriman en un pequeño espacio. Conforme las moléculas regresan a su posición inicial se va generando una región de menor presión que permite la expansión subsecuente de las moléculas de aire. Este fenómeno de movimientos se observa como una propagación de zonas de condensación (mayor presión) y rarefacción (menor presión) en el aire.

## 2.2. Sistemas productores de ondas mecánicas

Los sistemas que pueden producir ondas sonoras, particularmente transmitidas hacia y propagadas por el aire, se han dividido en dos tipos; los *sistemas vibrantes* y los *sistemas evacuantes* [5-7]. Los *sistemas vibrantes* cuentan con una estructura elástica que genera una serie de oscilaciones o vibraciones alrededor de un punto de equilibrio o reposo. La vibración es transmitida al medio elástico inmediato (aire) que continúa con la propagación, figura 2.3. Tal es el caso de cuerdas, péndulos, diapasones, membranas, lengüetas e incluso paredes de tubos. Estas estructuras al ser elásticas se deforman al ser sometidas a una fuerza, pero al suspender la fuerza tienden a regresar a su punto de equilibrio e incluso, cuando la suspensión es súbita, rebasan el punto de equilibrio para reiniciar una serie de deformaciones u oscilaciones. Sin embargo,



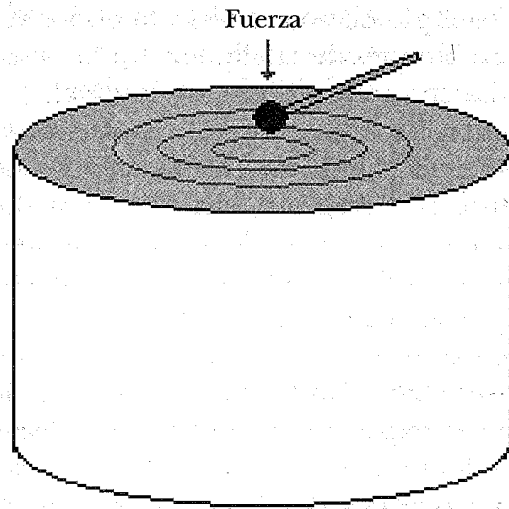


Figura 2.3. Tambor como ejemplo de sistema vibrante, productor de ondas mecánicas cuando se le aplica una fuerza. La transmisión y la propagación de las ondas mecánicas se hace longitudinalmente hacia y por el aire.

debido a fenómenos de fricción y transferencia de energía al medio que lo rodea, las vibraciones son cada vez de menor amplitud a lo largo del trayecto de propagación.

Los *sistemas evacuantes* dependen de la aplicación de fuerzas cortantes que movilizan un fluido. El movimiento del fluido puede transcurrir desde un desplazamiento por capas paralelas a la pared de la estructura (*flujo laminar*), hasta uno con movimientos totalmente irregulares (*flujo turbulento*) que generan oscilaciones transmisibles al medio elástico que lo rodea, figura 2.4. Entre estos dos tipos de flujo puede presentarse un movimiento con cierto orden, a manera de vórtices o remolinos que también generan oscilaciones transmisibles al medio vecino, y donde la relación entre el flujo y el gradiente de presión es un exponente entre 1 y 2. Algunos ejemplos de siste-

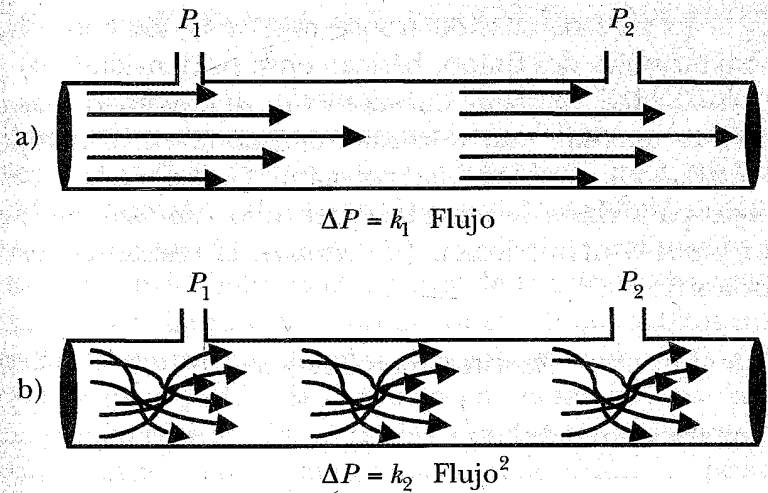


Figura 2.4. a) Flujo laminar. La perturbación no genera ondas mecánicas transmisibles y existe una relación lineal entre flujo y cambio de presión. b) Flujo turbulento. La perturbación genera ondas mecánicas y la relación entre flujo y cambio de presión es exponencial.

mas evacuantes son tubos, hélices, turbinas, fuetes, látigos y alas de avión.

Los dos aspectos que afectan la magnitud y características del flujo en un tubo son, por una parte el gradiente de presión, y por la otra todos los factores que influyen sobre la resistencia al movimiento del fluido, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo} = \Delta P / \text{Resistencia} \quad (2.2)$$

o de la forma siguiente:

$$\Delta P = \text{Resistencia} \cdot \text{Flujo} \quad (2.3)$$

Entre los factores que influyen sobre la resistencia se encuentran características del tubo como son su longitud

( $L$ ) y su área de sección transversal ( $\pi r^4$ ), así como las características del fluido, básicamente su densidad ( $\rho$ ) y su viscosidad ( $\eta$ ). Por cuestiones de simplicidad y asumiendo un flujo con velocidad constante en el tiempo (*estacionario*), con densidad constante (*incompresible*), con líneas paralelas a la superficie del tubo (*no rotacional*) y con poca o nula fricción (*no viscoso*), la resistencia está dada por:

$$\text{Resistencia} = 8L\eta / \pi r^4 \quad (2.4)$$

y, en consecuencia,

$$\Delta P = \text{Flujo } 8L\eta / \pi r^4. \quad (2.5)$$

Bajo condiciones de un tubo único de longitud conocida y liso, las características de diámetro, longitud y viscosidad del fluido se mantienen constantes, de manera que la ecuación global se plantea como:

$$\Delta P = k_i \text{Flujo}^n, \quad (2.6)$$

donde  $k_i$  es una constante que resume las características de resistencia resistiva y resistencia viscoelástica del sistema tubo-fluido; es decir, representa la pérdida de energía mecánica por efectos de fricción o viscosos. Para el flujo de tipo laminar la relación entre  $\Delta P$  y Flujo es lineal y directamente proporcional; por lo tanto,  $n$  es igual a 1. Para el caso extremo de flujo turbulento, la relación es de tipo exponencial donde  $n$  es igual a 2. Ante un flujo mixto donde existen diferentes proporciones de flujo laminar y turbulento, el valor de  $n$  estará entre 1 y 2.

### 2.3. Generación de sonido en el sistema respiratorio

Ambos sistemas, vibrantes y evacuantes existen en el tórax, tanto en su parte respiratoria —pared torácica, vías aéreas, flujo ventilatorio— como en su parte circulatoria —corazón, vasos, válvulas cardiacas y flujo sanguíneo. En el caso de las vías aéreas, dadas las ramificaciones sucesivas que se observan a partir de la tráquea hasta los acinos alveolares, es común encontrar flujos mixtos que incluyen tanto turbulencias y remolinos como flujos de tipo laminar [8-13]. Si se toman en cuenta, por un lado las características físicas de las ramificaciones iniciales, considerando a la tráquea como la generación 0, y por el otro el flujo ventilatorio de una persona que puede variar en reposo desde 0.3 L/seg hasta cerca de 10 L/seg en un ventilación forzada, la velocidad media del flujo varía de generación en generación. En consecuencia, las velocidades de flujo son muy altas en las generaciones 0-5, disminuyen sustancialmente entre la generación 6 a la 10, y se reduce aún más después de la generación 15 (ver tabla 2.1). De acuerdo con este planteamiento, y dependiendo del flujo ventilatorio, es de esperar que hasta las primeras cinco generaciones de ramificaciones predominen los flujos turbulentos, entre la seis y la diez se tenga predominio de remolinos y en generaciones posteriores hay un predominio de flujo laminar hasta llegar a los acinos alveolares, donde el flujo es difusivo con mezclado de aire generado por los latidos cardiacos (mezclado cardiogénico). La característica acústica fundamental de las turbulencias y de los remolinos es que generan ondas mecánicas que se transmiten al medio elástico vecino; mientras que el flujo laminar no lo hace y por lo tanto se asume silencioso.

Considerando al sistema respiratorio como un sistema de tubos ramificados en los que es posible observar flujos

mixtos, Röhler en 1915 propone de manera simplificada que:

$$\Delta P = k_1 \text{Flujo} + k_2 \text{Flujo}^2, \quad (2.7)$$

donde las magnitudes relativas de  $k_1$  y  $k_2$  expresan las contribuciones relativas del flujo laminar y turbulento a las pérdidas de energía mecánica (resistencia al flujo en las vías aéreas).

Una consecuencia importante de la ecuación de Röhler es que se puede estimar la resistencia de las vías aéreas a partir de conocer las constantes  $k_1$  y  $k_2$ . Ya que la resistencia en las vías aéreas se puede calcular como  $R_{va} = \Delta P / \text{Flujo}$ , sustituyendo en la ecuación (2.7):

$$R_{va} = (k_1 \text{Flujo} + k_2 \text{Flujo}^2) / \text{Flujo}, \quad (2.8)$$

Tabla 2.1

MODELO DE WEIBEL Y NÚMERO DE REYNOLDS ( $N_R$ )  
ESTIMADO PARA UN FLUJO DE 0.5 Y DE 2.0 L/SEG

Generación	Diámetro (cm)	Longitud (cm)	0.5 L/seg		2 L/seg	
			V (cm/seg)	$N_R$	V (cm/seg)	$N_R$
Tráquea	1.8	12	197	2325	790	9300
1	1.22	4.76	215	1719	859	6876
2	0.83	1.9	235	1281	941	5124
3	0.56	0.76	250	921	1002	3684
4	0.45	1.27	202	594	809	2376
5	0.35	1.07	161	369	643	1476
10	0.13	0.46	38	32	151	127
15	0.066	0.2	4.4	1.9	17.8	7.6
20	0.045	0.083	0.3	0.09	1.2	0.37

se tiene que:

$$R_{va} = k_1 + (k_2 \cdot \text{Flujo}). \quad (2.9)$$

Una forma de determinar el tipo de flujo predominante, y la posibilidad de generar ondas mecánicas que se perciban como sonido, es calculando el número de Reynolds ( $N_R$ ), el cual asume que una vez que la resistencia inercial del sistema llega a un punto crítico, entonces el flujo laminar se convierte en flujo turbulento. El número de Reynolds se calcula como:

$$N_R = (4V) / (v\pi D), \quad (2.10)$$

donde  $V$  es la velocidad del flujo,  $v$  la viscosidad cinemática del aire a 37°C (viscosidad/densidad) y  $D$  el diámetro en la ramificación específica en la que se calcula el flujo. Se estima que cuando  $N_R$  tiene un valor menor a 2000 en un tubo liso, el flujo es de tipo laminar, y cuando  $N_R$  tiene un valor mayor a 2000 en un tubo liso, el flujo es de tipo turbulento. Los remolinos pueden tener valores de  $N_R$  tan bajos como 50 y de cualquier manera generar ondas mecánicas perceptibles acústicamente.

Las estructuras vibrantes y las turbulencias disipan parte de su energía hacia el medio que los rodea a manera de ondas que pueden propagarse a cierta distancia dependiendo del grado de amortiguación a que son sometidas. Comúnmente las estructuras vibrantes disipan su energía hacia el aire, en tanto que las turbulencias pueden hacerlo hacia el mismo fluido y hacia las paredes del material por el que se mueve el fluido.

La tabla 2.1 muestra, a partir de las características físicas del modelo de Weibel, los números de Reynolds calculados en diferentes ramificaciones cuando se mantiene un

flujo medido en boca de 0.5 y 2 L/seg. Nótese cómo, dependiendo del flujo, las turbulencias son factibles en la tráquea y las ramificaciones 3 o 4; en tanto que los remolinos serían posibles en las ramificaciones siguientes y, dependiendo también de la magnitud del flujo, hasta las generaciones número 8-13. En las ramificaciones posteriores sería de esperar únicamente flujo de tipo laminar debido a que las velocidades de flujo son extraordinariamente bajas.

### 3. PROPAGACIÓN DEL SONIDO

#### 3.1. Modos de propagación de ondas mecánicas

Como se mencionó anteriormente, las ondas mecánicas se transmiten básicamente de manera transversal o longitudinal a lo largo de un medio elástico, donde los modos de propagación pueden ser lineales (cuerda), de superficie (membrana) o en volúmenes (bloques tridimensionales).

Las ondas de superficie son una variante de ondas transversales que viajan entre los límites de dos medios; por ejemplo, las ondas de mar que viajan entre el agua de mar y el aire atmosférico. La propagación en espacios tridimensionales (volumétricos) gaseosos y líquidos se da por transmisión de ondas mecánicas longitudinales, pero no transversales, en tanto que la propagación en sólidos puede ser de ambos tipos de ondas, longitudinales y transversales [5-7].

La propagación en tubos, a su vez, depende de la interacción entre las paredes del tubo y la onda sonora presente o generada en la luz del tubo. Para el caso de tubos

rígidos con poca o nula movilidad de sus paredes, la propagación es principalmente de ondas longitudinales dentro de la luz tubular; mientras que en tubos no-rígidos la propagación puede ser tanto de ondas longitudinales como transversales por la pared del tubo como de ondas longitudinales por el fluido en la luz tubular.

#### 3.2. Propiedades básicas de ondas mecánicas

La propagación del sonido implica el viaje de ondas mecánicas transversales o longitudinales. Estas ondas viajeras representan el movimiento periódico de un objeto que, si se despliega en función del tiempo, se visualiza como una onda sinusoidal [5-7].

De esta manera, durante la propagación de ondas transversales, una partícula del medio se comporta en un movimiento oscilatorio periódico de tipo sinusoidal. En el caso de la propagación de ondas longitudinales, el comportamiento sinusoidal se observa en variaciones puntuales de presión o de desplazamiento longitudinal de una partícula. Por ello, la descripción de tal movimiento periódico se puede hacer en términos de amplitud ( $A$ ), o máximo desplazamiento con respecto al punto de equilibrio; periodo ( $T$ ), o tiempo en que se completa un ciclo; y frecuencia ( $f$ ), que es el número de ciclos que se presentan en un segundo, figura 3.1(a). La frecuencia  $f$  es igual al recíproco del periodo  $T$  ( $f = 1/T$ ).

Si se tiene que la onda mecánica se está propagando, y por lo tanto es una onda viajera, se puede además graficar en función de la distancia que recorre (figura 3.1(b)) y, consecuentemente, se puede caracterizar por la velocidad de propagación ( $v$ ) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) o distancia en que se presenta un nuevo ciclo.

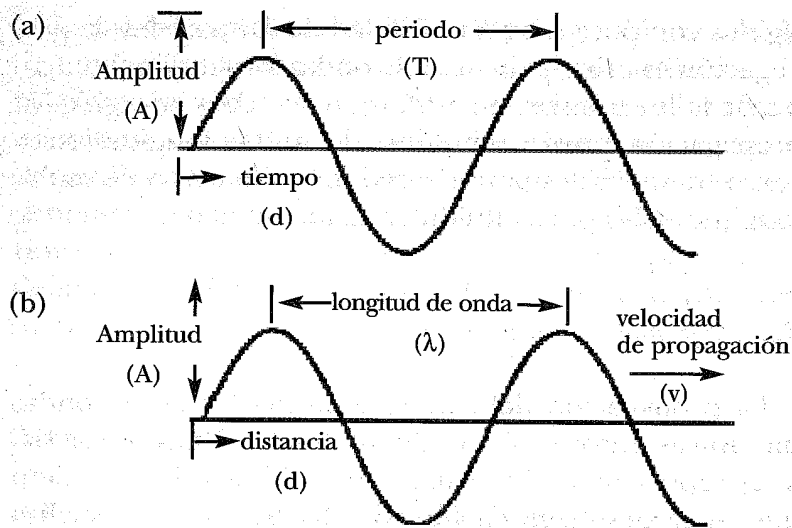


Figura 3.1. Representación del movimiento periódico de una partícula o de una onda sonora pura y parámetros que lo describen. (a) En función del tiempo y (b) en función de la distancia.

### 3.3. Energía de ondas mecánicas

El movimiento periódico de la partícula a su vez representa un cambio continuo de *energía potencial a energía cinética*, el cual sería permanente si no existiesen pérdidas o disipación de energía. Sin embargo, en el mundo real siempre existen pérdidas de manera que el movimiento se va reduciendo paulatinamente hasta llegar nuevamente al equilibrio con inmovilidad de la partícula, donde las energías potencial y cinética serían cero, mientras no exista una nueva fuente de energía que se transfiera al sistema para desplazar o realizar trabajo sobre la partícula. Considerando un sistema sin pérdidas, figura 3.2, nótese que durante el movimiento en los picos y valles de la onda sinusoidal la energía potencial

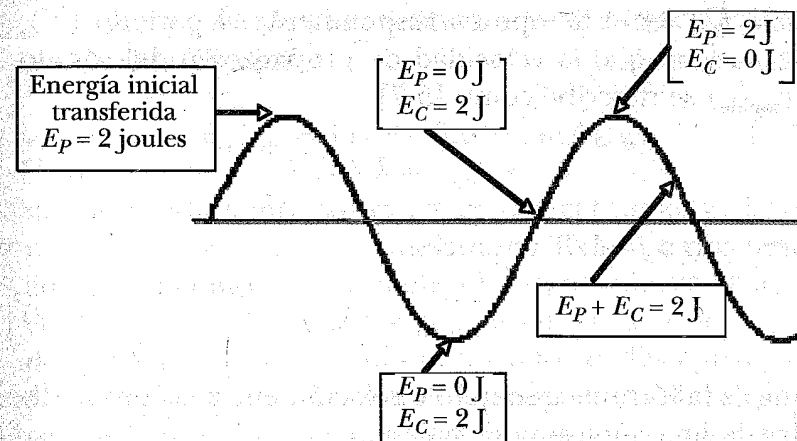


Figura 3.2. comportamiento de la energía transferida a una partícula en un sistema sin disipación energética. En el ejemplo, la energía inicial transferida es de 2 joules (J) para desplazar a la partícula hasta el pico, donde la energía potencial ( $E_P$ ) es de 2 J y la energía cinética ( $E_C$ ) es 0 J. Una vez iniciado el movimiento periódico  $E_P$  y  $E_C$  se van intercambiando.

es máxima y la cinética es cero; mientras que al cruzar por la línea de equilibrio la energía cinética es máxima y la potencial es cero. En el resto de los momentos la proporción de energía cinética y potencial varía para conservar el total de la energía transferida inicialmente al sistema.

### 3.4. Relación entre propiedades de una onda en propagación

Ya que las variables que determinan la velocidad son la distancia y el tiempo ( $v = d/t$ ), la relación general de propiedades para estimar la velocidad de propagación de una onda es equivalente a la distancia recorrida por un



ciclo ( $\lambda$ ) en el tiempo correspondiente al periodo ( $T$ ), de manera que la velocidad de propagación del sonido ( $v_{\text{sonido}}$ ) se describe como [5-7]:

$$v_{\text{sonido}} = \lambda / T, \quad (3.1)$$

pero como  $f = 1/T$  entonces:

$$v_{\text{sonido}} = f\lambda, \quad (3.2)$$

que es la fórmula general de relación entre las propiedades de una onda sonora viajera.

Por otra parte, en un medio de propagación del sonido la velocidad del sonido depende esencialmente de las propiedades físicas del medio y no de las características de la onda por sí misma. Para el caso de los gases ideales, en términos generales se establece que la velocidad de propagación del sonido es:

$$v_{\text{sonido}} = \sqrt{\gamma RT / M}, \quad (3.3)$$

donde  $\gamma$  es la constante adiabática del gas,  $R$  la constante universal de los gases (8.314 J/mol °K),  $T$  la temperatura absoluta y  $M$  el peso molecular del gas (en kg/mol). Tomando como ejemplo el caso particular del aire seco,  $\gamma$  es del orden de 1.4,  $M$  es el peso molecular promedio de los gases constituyentes (0.2895 kg/mol, eliminando el vapor de agua) y se tiene que la velocidad de propagación del sonido a cero grados centígrados es:

$$v_{\text{sonido}} = \sqrt{(1.4 * 8.314 * 273.1) / 0.2895} = 331.4 \text{ m/seg},$$

en tanto que a 20 grados centígrados la velocidad de propagación del sonido es aproximadamente 344 m/seg.

Ya que  $\gamma$ ,  $R$  y  $M$  son constantes, la ecuación (3.3) se puede simplificar a:

$$v_{\text{sonido}} = 331.4 + 0.6 * t \text{ m/seg} \quad (3.4)$$

donde  $t$  es la temperatura en grados centígrados. Debe notarse también que en aire húmedo tanto la constante adiabática como el peso molecular deben ajustarse a las condiciones de humedad y del peso molecular del vapor de agua. La tabla 3.1 muestra las velocidades aproximadas de propagación del sonido en algunos medios físicos gaseosos, líquidos y sólidos a temperaturas específicas [7, 10].

Como puede observarse, la velocidad de propagación del sonido depende de las propiedades físicas del medio en el cual viajan las ondas. Más aún, la velocidad del sonido se puede estimar a partir de las propiedades elásticas (compresibilidad volumétrica  $B$ , en newtons/m<sup>2</sup>) e inerciales (densidad  $\rho$ , en kg/m<sup>3</sup>) del medio de propagación, de manera que

$$v_{\text{sonido}} = \sqrt{B / \rho}. \quad (3.5)$$

Para el caso del agua, con una compresibilidad de  $2.2 \times 10^9$  N/m<sup>2</sup> y densidad aproximada de 1000 kg/m<sup>3</sup>, se estima una velocidad de 1483 m/seg, que concuerda con la velocidad calculada para el agua a 20°C.

### 3.5. Fenómenos físicos durante la propagación de ondas mecánicas

Hasta ahora se ha considerado que las ondas mecánicas se propagan sin disipación de energía y, por lo tanto, que las características de la onda se conservan indefini-

Tabla 3.1

VELOCIDADES APROXIMADAS DE PROPAGACIÓN DEL SONIDO EN ALGUNOS GASES, LÍQUIDOS, SÓLIDOS Y TEJIDOS BIOLÓGICOS

GASES	Temperatura (°C)	Velocidad (m/seg)
Hidrógeno	0	1270
Helio	20	927
Bióxido de carbono	0	258
Aire	0	331
Aire	20	344
Vapor de agua	35	402

LÍQUIDOS	Temperatura (°C)	Velocidad (m/seg)
Agua	0	1402
Agua	20	1482
Agua de mar	20	1522

SÓLIDOS	Temperatura (°C)	Velocidad (m/seg)
Diamante	25	12000
Vidrio	25	5640
Hierro	25	5130
Aluminio	25	5100
Oro	25	3240
Plomo	25	1600

TEJIDOS	Temperatura (°C)	Velocidad (m/seg)
Tejido blando	37	1530
Corteza de hueso	37	1900
Parénquima pulmonar*	37	25-60

\* Depende de la densidad tisular por la relación tejido aire.

damente. Sin embargo, debido a que durante el proceso mismo de transferencia de energía partícula a partícula existen pérdidas energéticas, durante la propagación se pueden observar fenómenos físicos como atenuación, interferencia entre ondas, filtrado en frecuencia, resonancia, reflexión, refracción y difracción [5-7]. Con relación a la propagación del sonido, generalmente su intensidad (definida como potencia por unidad de área en watts/cm<sup>2</sup>) se va atenuando de acuerdo con la ley del inverso del cuadrado la cual establece que, a partir de una fuente sonora, la intensidad del sonido ( $I$ ) se atenúa en proporción al cuadrado de la distancia ( $d$ ); es decir:

$$I \propto 1/d^2. \tag{3.6}$$

La ecuación (3.6) es válida considerando una propagación esférica y homogénea en todas las direcciones. Bajo estas condiciones, una fuente generadora de sonido con una potencia  $P$ , en watts, se encontraría en el centro de la esfera y el sonido se propagaría en todas direcciones, de manera que a la distancia  $d$ , en cm o m, tendría una intensidad  $I$ , en watts/cm o watts/m, proporcional al cuadrado de su distancia, figura 3.3.

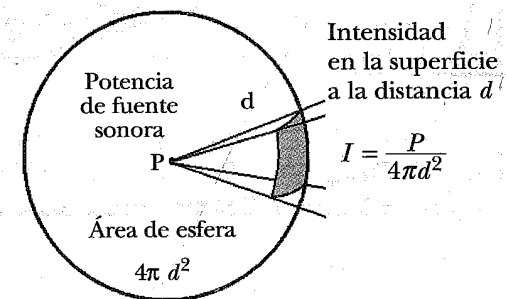


Figura 3.3. Intensidad del sonido propagándose una distancia  $d$  hasta la superficie de una esfera, considerando una fuente sonora ubicada en el centro.

De acuerdo a la ley del inverso del cuadrado, la proporción en que la intensidad se va atenuando con respecto a múltiplos de la distancia  $d$  se puede calcular como:

$$\frac{I_{md}}{I_d} = \left(\frac{d}{md}\right)^2,$$

que de manera gráfica se muestra en la figura 3.4, a partir de la cual se puede deducir que la intensidad (en watts/m<sup>2</sup>) se atenúa en una proporción igual al cuadrado de la distancia. Haciendo la conversión adecuada para la medición del sonido en decibeles (dB), se puede calcular que a la distancia  $2d$  la intensidad del sonido se reduce aproximadamente 6 dB, y a la distancia  $10d$  la intensidad se reduce 20 dB.

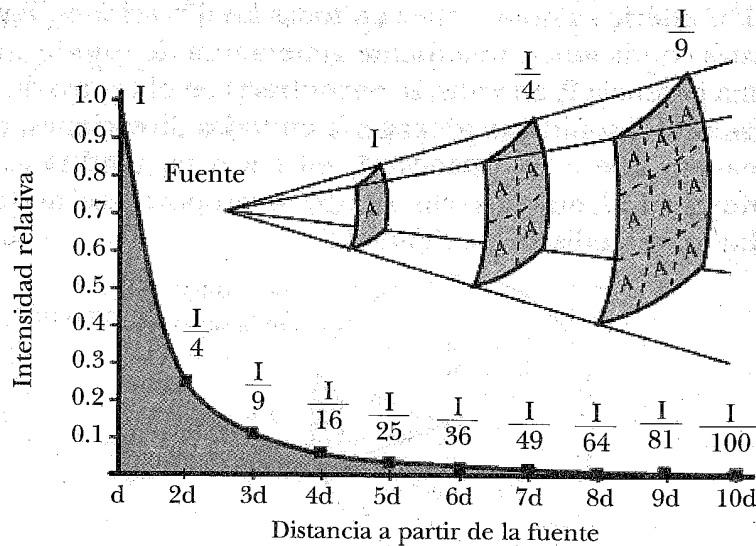


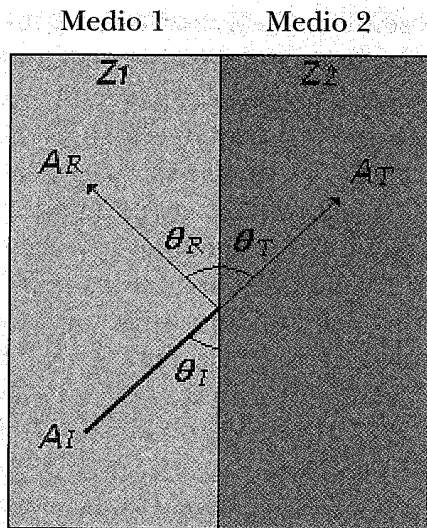
Figura 3.4. Ley del inverso cuadrado. Nótese cómo el área  $A$  aumenta cuatro veces a la distancia  $2d$ , así como la intensidad se atenúa en la misma proporción.

Ahora bien, siempre que se tienen dos medios en contacto, las ondas mecánicas pueden ser transmitidas de un medio al otro para poder continuar su propagación, o puede ser reflejada y por lo tanto permanecer sólo en uno de los medios. La proporción en que se den la transmisión y la reflexión depende del nivel de acoplamiento acústico que exista entre los medios. Si llamamos  $A_I$ ,  $A_R$  y  $A_T$  a las potencias acústicas de las ondas incidente, reflejada y transmitida respectivamente, tenemos que:

$$A_I = A_R + A_T. \quad (3.7)$$

Por  $A_I$  se entiende la potencia con que la onda incidente, y propagada por un medio 1 con impedancia acústica  $Z_1$ , impacta la superficie de un medio 2 con impedancia  $Z_2$  (figura 3.5). Dependiendo del ángulo de incidencia de la onda y de las impedancias acústicas de los medios, la onda incidente puede rebotar en la superficie del medio 2 (fenómeno de *reflexión*) o puede transmitirse hacia el medio 2, cambiando o no la trayectoria de propagación de la onda y su velocidad de propagación (fenómeno de *refracción*).

El fenómeno de reflexión obedece a la ley de reflexión, de manera que el ángulo de reflexión ( $\theta_R$ ) es igual al ángulo de incidencia ( $\theta_I$ ). Dada la reflexión, las ondas incidente y reflejada coexisten en el mismo medio y pueden presentar interferencias que, dependiendo de la fase en que coincidan, en ocasiones pueden aumentar la potencia (interferencia constructiva) o disminuirla (interferencia destructiva), figura 3.6. Dichas interferencias están relacionadas con la resonancia de un sistema, ya que la coincidencia de fases entre varias frecuencias está, a su vez, relacionada con sus respectivas longitudes de onda. Al darse coincidencias de fase en el mismo sentido



$$\theta_R = \theta_I$$

$$A_I = A_T + A_R$$

$$\frac{A_T}{A_I} = \frac{4(Z_2/Z_1)}{(1 + Z_2/Z_1)^2}$$

Figura 3.5. Comportamiento básico en la propagación de una onda al impactar sobre la superficie del medio 2, con potencia acústica  $A_I$  y ángulo  $\theta_I$ ,  $Z_1$  y  $Z_2$  representan las impedancias en los medios 1 y 2.

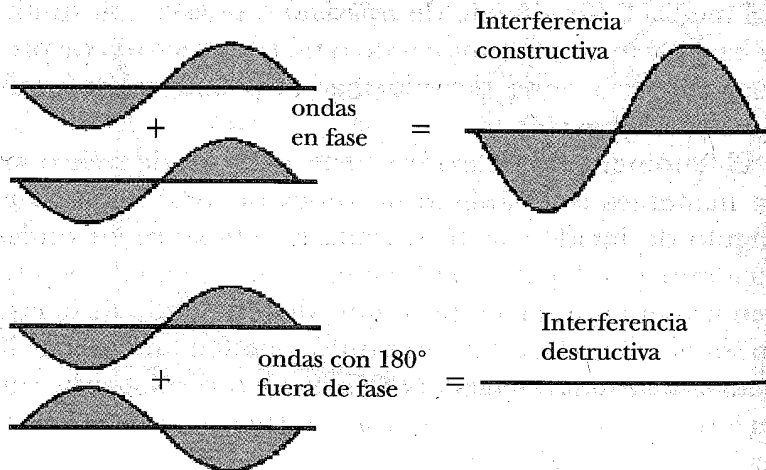


Figura 3.6. En la interferencia constructiva las ondas están en fase y las amplitudes se suman. En la interferencia destructiva las ondas se encuentran desfasadas  $180^\circ$  para hacer evidente el sentido opuesto de su desplazamiento.

(sumatorias), las frecuencias se acentúan y, por lo contrario, cuando las coincidencias son en sentido opuesto las frecuencias se atenúan.

Se dice que una frecuencia de resonancia es una frecuencia natural a la que vibra determinada estructura al ser excitada acústicamente; una frecuencia natural se identifica por la facilidad con que se provocan las vibraciones a esa frecuencia y no a otras presentes durante la excitación. De esta forma, las estructuras resonantes pueden utilizarse como filtros físicos al resaltar las frecuencias naturales y atenuar cualquier otra. La frecuencia fundamental es la mínima frecuencia en la cual se obtienen interferencias constructivas, mientras que los armónicos son múltiplos de la frecuencia fundamental.

La *resonancia* es interesante sobre todo en sistemas tubulares donde las vibraciones producidas al interior se pueden ajustar soplando con mayor o menor intensidad para generar resonancias o sus armónicos, como sucede en instrumentos musicales de viento. Más aún, debido a las reflexiones en los extremos de los tubos, la forma en que se provocan las coincidencias de fase entre ondas es diferente para tubos cerrados que para tubos abiertos, figura 3.7. Resaltamos la resonancia tubular porque las vías aéreas son un complejo sistema tubular cerrado en su extremo alveolar, pero de tubos abiertos al considerar cada una de las ramificaciones.

Por otra parte, la refracción del sonido comprende al efecto que se tiene sobre la fracción de sonido que es transmitida de un medio a otro con características físicas diferentes. Generalmente el viaje de una onda mecánica en un medio homogéneo es recto y con una velocidad constante. Sin embargo, al encontrar un medio de propagación diferente, la onda cambia de velocidad, aumentando o disminuyendo de acuerdo a las características del

segundo medio de propagación. Asumiendo un contacto plano entre los medios, si el ángulo de la onda incidente es perpendicular ( $90^\circ$  al plano de contacto), entonces cambia la velocidad pero no la dirección de propagación. Pero, si el ángulo de incidencia es diferente de  $90^\circ$ , además del cambio de velocidad se observa también un cambio en la dirección del viaje de la onda. Esta desviación en la dirección se conoce como refracción.

Imagine el lector un vehículo que al estar circulando por el pavimento (medio de alta velocidad), de pronto su rueda derecha delantera cae en lodo (medio de baja velocidad). La rueda izquierda al ir más rápido hará que el auto sea desviado hacia la derecha hasta que la rueda izquierda cae también en el lodo. A partir de entonces,

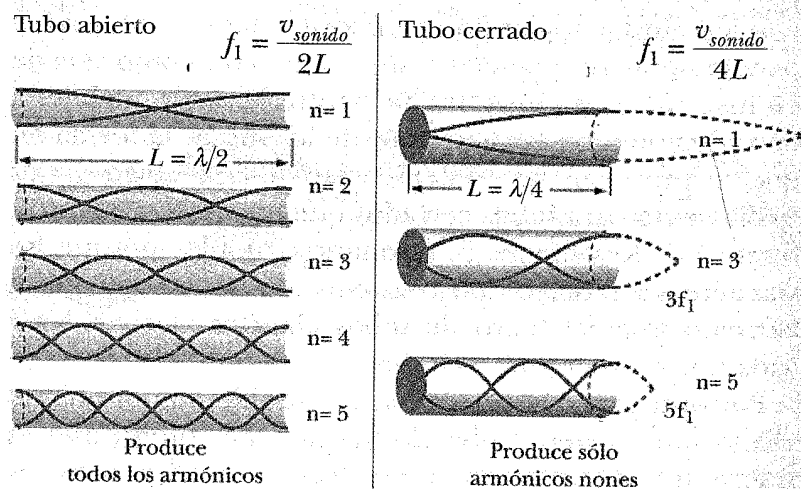


Figura 3.7. Armónicos en tubo abierto por ambos extremos y tubo cerrado por un extremo. La frecuencia fundamental ( $f_1$ ) se puede calcular a partir de la velocidad de propagación ( $v_{sonido}$ ) y ( $L$ ) la longitud del tubo. La frecuencia de armónicos es  $nf_1$ .

el auto continuará su viaje recto con las ruedas derecha e izquierda a la misma velocidad, pero ahora reducida en el lodo. La intensidad con que el segundo medio cambia el ángulo de la onda transmitida con respecto a la incidente es el índice de refracción.

Finalmente, la *difracción* se observa cuando durante la propagación de una onda dentro de un medio, ésta encuentra pequeños obstáculos que debe rodear, o pequeños orificios por los que debe pasar, figura 3.8. La capacidad de rodear o de pasar por estos obstáculos está en relación directa con la longitud de onda, de manera que a mayor longitud de onda el fenómeno es más evidente. Nótese cómo durante la difracción la onda siempre viaja en el mismo medio, de tal suerte que, a partir del obstáculo la onda continúa su viaje aparentemente sin modificación, y a partir del orificio, como si fuera una nueva fuente.

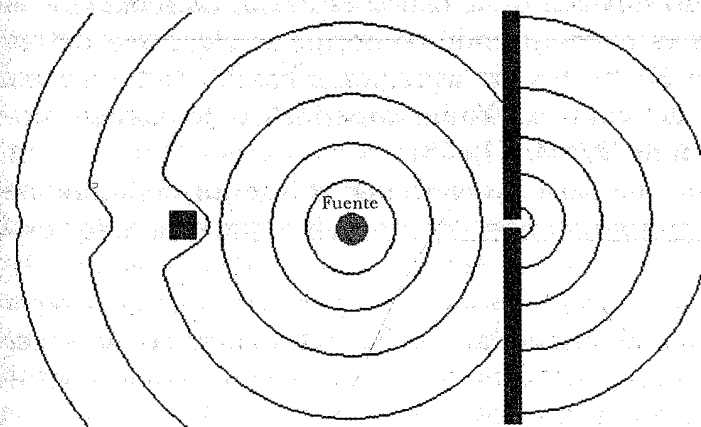


Figura 3.8. Fenómeno de difracción de ondas generadas por una fuente sonora. A la izquierda, difracción por un obstáculo en el trayecto de propagación (cuadro en negro) y a la derecha, por un orificio entre las dos barras verticales.



### 3.6. Transmisión y propagación del sonido respiratorio

El ser humano tiene la capacidad auditiva para detectar ondas sonoras que se generan en una banda de frecuencia aproximada entre 20 a 20 000 Hz; banda en frecuencia que se denomina espectro audible. Aunque las ondas mecánicas fuera de este rango no son perceptibles por el oído humano, sensores electrónicos permiten la detección tanto de las ondas en el espectro audible como también de ondas infrasónicas (por debajo de los 20 Hertz) y ultrasónicas (por arriba de 20 kHz). Así, mediante el uso de micrófonos, ahora se sabe que el sonido respiratorio capturado en la superficie del cuello sobre la tráquea (sonido traqueal) tiene un contenido en frecuencia que va desde los 20 Hz hasta los 2000 Hz, con un pico máximo de potencia para frecuencias entre 200 a 400 Hz. Sin embargo, cuando el micrófono se coloca sobre la superficie del tórax (sonido pulmonar), el contenido superior de la banda espectral no rebasa los 1000 Hz y va disminuyendo conforme se aleja uno de la tráquea. De hecho, en las regiones basales de la cara posterior del tórax el límite superior en frecuencia es del orden de 500 Hz [10-13].

Por una parte, es claro que al interior del tórax, no se genera sólo un tipo de onda, sino que el sonido respiratorio es la mezcla de múltiples ondas provenientes de múltiples fuentes sonoras, y por otra, que al parecer la estructura pulmonar modifica las características de las ondas en el trayecto de su propagación, como se evidencia al registrar el contenido espectral de la tráquea y de las bases pulmonares registradas en la espalda de un sujeto.

La estructura pulmonar tiene un comportamiento acústico más de tipo poroso, ya que consiste en una compleja secuencia de tubos (vías aéreas) que rematan en su

interior con sacos alveolares. La longitud total de las vías aéreas, a partir de los orificios (coanas) nasales varía entre 35 a 50 cm de largo, en una serie de ramificaciones cuasi-dicotómicas, donde, en general, cada ramificación hacia el interior del tórax es de menor calibre y de menor longitud. Finalmente, al nivel de los sacos alveolares, con diámetros promedio del orden de 0.3 mm, los tubos se cierran en el extremo, pero constituyen cerca de 300 millones de pequeños globos (sacos alveolares) conteniendo aire y cubiertos cada uno por agua y sangre. Toda esta estructura compleja es a su vez rodeada, primero, por un par de membranas fibrosas (pleuras) separadas por líquido (pleural); luego, por una capa de huesos y músculos; a continuación, una capa de tejido subcutáneo y, finalmente, la piel. Desde la laringe hasta los bronquiolos terminales abunda tejido cartilaginoso frecuentemente acomodado en semicírculos y la estructura ósea es de una gran complejidad morfológica, representada por costillas, esternón, vértebras torácicas, clavículas y escápulas. En consecuencia, aparte de la complejidad morfológica, podemos distinguir al menos cinco medios físicos de conducción diferente para el sonido respiratorio generado al interior del tórax: a) aire, b) líquido, c) tejido blando, d) cartílago y e) hueso.

Dadas las características de compresibilidad volumétrica y de densidad, y tomando en cuenta que se encuentran a temperatura corporal (37°C), las velocidades media de propagación para cada uno de los medios torácicos mencionados varía aproximadamente desde 350 m/seg en el aire; 1500 m/seg en líquidos corporales, tejido blandos y cartílago, y 1900 m/seg en huesos. La proporción en volumen de cada medio indica un predominio aéreo, ya que, dependiendo del nivel de inspiración, éste constituye entre un 70 a 90 % del volumen torácico total. Los medios

acuosos y el hueso quedan repartidos casi en proporciones iguales para los restantes 30 a 10%. Entre estos medios, el sonido se transmite con grandes pérdidas de energía, observándose los fenómenos descritos de absorción, reflexión, interferencias, refracción y difracción. Aun cuando no se conocen los mecanismos precisos, el resultado final es que, a mayor distancia de propagación a partir de sus fuentes, el sonido respiratorio se va atenuando, filtrando y reduciendo su velocidad. Tales efectos se distinguen al comparar el sonido traqueal con el sonido pulmonar (en pared torácica) donde el sonido es cerca de 10-20 veces menos intenso, con límite superior alrededor de los 500 Hz en lugar de 2000 Hz, y con velocidad de propagación estimada entre 25 a 60 m/seg en lugar de los ~350 m/seg observados únicamente en el aire sin tejidos.

Es de señalar que las formas de transmisión del sonido pulmonar también pueden variar dependiendo de la frecuencia de los sonidos. En particular para sonidos introducidos artificialmente al tórax se puede apreciar el comportamiento de propagación tubular en el pulmón. Así, la propagación tubular en el árbol respiratorio para excitaciones con altas frecuencias (arriba de 10 kHz) la masa de las vías aéreas (tráquea, hasta vías aéreas de 4 mm de diámetro) limita o casi elimina la movilidad (tubo rígido) y la propagación depende sólo de la propagación longitudinal en el aire dentro de las vías aéreas más su propagación por desplazamiento volumétrico (velocidad de flujo). A menores frecuencias de excitación se observa paulatinamente una mayor interacción con las paredes y consecuente movilidad de las vías aéreas, por lo que el sonido se propaga por toda la estructura (aire, tejido pulmonar y paredes tubulares), provocando un decremento en la velocidad de propagación. De esta manera,

a altas frecuencias la velocidad de propagación se estima del orden de 350 m/seg, mientras que a bajas frecuencias ésta puede ser del orden de 25 a 50 m/seg.

Es de notar que la arquitectura del tejido o parénquima pulmonar es realmente compleja por los millones de sacos aéreos entre los que se hace la transmisión del sonido con grandes pérdidas energéticas. Sin embargo, la transmisión del sonido respiratorio hacia pleuras, músculos torácicos, costillas y piel es en medios más homogéneos con impedancias acústicas más cercanas entre ellos y, por lo tanto con menores pérdidas energéticas. Esto es una gran ventaja para poder escuchar en la superficie torácica los sonidos provenientes de fuentes sonoras en medio del parénquima pulmonar. Sin embargo, las consolidaciones pulmonares (edema, abscesos, tumores, fibrosis, etc.), así como las rarefacciones (por pérdida del parénquima como en el enfisema) tendrán claras consecuencias en la transmisión y propagación del sonido.

Los médicos se han manejado clínicamente para detectar estas alteraciones en las propiedades del sonido por medio del estetoscopio, para lo cual se requiere un gran entrenamiento, pero con las limitaciones propias de nuestra capacidad auditiva. Por fortuna, el desarrollo de la tecnología permite en la actualidad una mayor precisión en la adquisición de los sonidos respiratorios, en su análisis y en su procesamiento, con posibilidades de incrementar el conocimiento sobre sus mecanismos de generación, transmisión y propagación. Finalmente, los principios físicos descritos en los incisos previos son la base para comprender las perspectivas diagnósticas y de seguimiento de enfermedades pulmonares, así como de desarrollo de nuevas tecnologías.

#### 4. CONCEPTOS TEÓRICOS BÁSICOS EN EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS SONIDOS RESPIRATORIOS

El análisis de señales fisiológicas requiere realizar diversas etapas para la adecuación y extracción de información de la señal de interés, conocidas en general como etapas de procesamiento. El diagrama a bloques de la figura 4.1 presenta las diferentes etapas en el procesamiento de una señal fisiológica. En los párrafos siguientes se

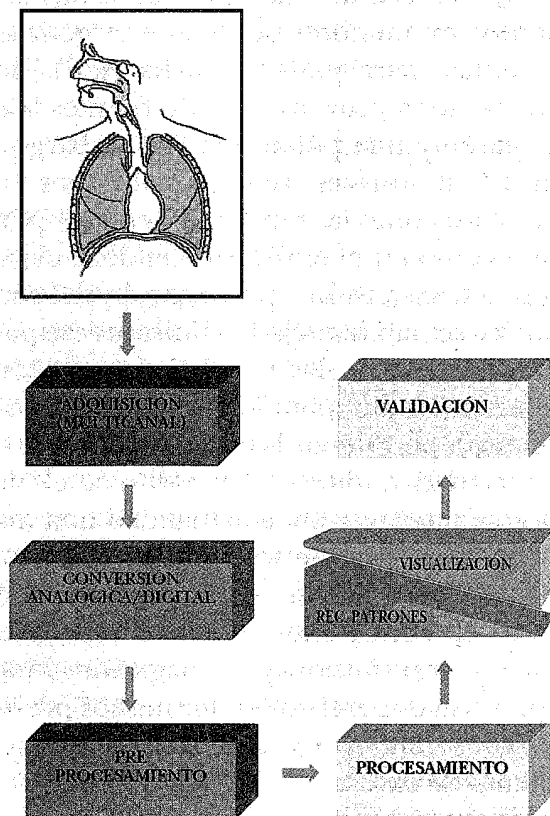


Figura 4.1. Diagrama de bloques de las etapas de procesamiento de una señal fisiológica (sonido respiratorio).

explicarán, en forma general, los conceptos principales en cada una de las etapas y en particular, se establecerán las técnicas de procesamiento más relevantes que se han utilizado para el análisis del sonido respiratorio, por el grupo de investigadores de la UAM, Unidad Iztapalapa.

##### 4.1. Adquisición multicanal

Los fenómenos fisiológicos en el cuerpo humano se manifiestan de diferentes formas, por ejemplo: la actividad cerebral se asocia con la presencia de energía eléctrica y magnética en la superficie del cuero cabelludo; la actividad del corazón se asocia con energía de tipo eléctrico y de tipo acústico en la superficie del tórax; mientras que la actividad pulmonar se asocia con energía de tipo acústico en la superficie del tórax. En consecuencia, de acuerdo al fenómeno fisiológico que se pretende analizar es indispensable definir el tipo de transductor que permita transformar o adecuar el tipo de energía asociada al fenómeno. En el caso particular de los sonidos respiratorios, su registro se realiza mediante la versión electrónica del estetoscopio que consiste de un micrófono sub-miniatura acoplado al interior de una campana de *nylamid*, figura 4.2a. Los micrófonos sub-miniatura poseen una respuesta en frecuencia plana en el rango de 30-3000 Hz [14]. Es importante establecer que la salida del estetoscopio electrónico es una señal eléctrica que existe para todo tiempo  $t$ ; es decir, es una señal de tipo continuo o analógica que requiere ser representada en un dominio diferente (*conversión analógica-digital*).

Otro aspecto importante en la adquisición de la información relacionada con un fenómeno fisiológico es definir el área sobre el cuerpo humano donde se requiere efectuar el registro. Para el caso de los sonidos respiratorios

el grupo de investigación de la UAMI ha propuesto el realizar registros multicanales mediante 25 estetoscopios electrónicos distribuidos sobre la pared posterior del tórax humano, figura 4.2b, que permiten obtener simultáneamente la actividad acústica desde las bases hasta los ápices pulmonares; es decir, es posible contar con información respiratoria espacio-temporal [14].

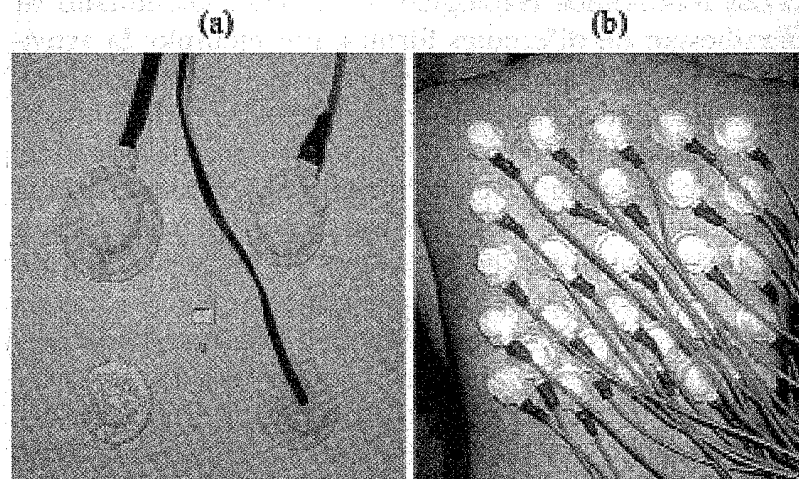


Figura 4.2. (a) Prototipos de estetoscopio electrónico y micrófonos sub-miniatura (centro). (b) Adquisición multicanal en la superficie posterior del tórax.

#### 4.2. Conversión analógica-digital

En la actualidad el análisis de señales fisiológicas se realiza principalmente en computadoras o mediante instrumentos basados en microprocesadores específicamente dedicados a la aplicación. Las señales de tiempo continuo no pueden ser manipuladas por estos instrumentos y es

necesario efectuar su conversión desde un formato analógico a un formato digital.

La *conversión analógica-digital* permite representar a la señal fisiológica en un dominio de tiempo discreto evitando el dominio original de tiempo continuo. La salida del estetoscopio electrónico, que existe para todo tiempo  $t$ , se representa mediante valores de amplitud de la señal original en un número finito de instantes de tiempo, con muestras equidistantes. A esta forma de representar a la señal original se le conoce como *señal discreta* o *serie de tiempo*. En la figura 4.3 se muestra el diagrama a bloques de la conversión analógica-digital de la señal de sonido respiratorio; a la salida del convertidor se muestra un segmento de la señal representada mediante muestras. Los parámetros importantes de esta etapa son la frecuencia de muestreo (el inverso del tiempo entre dos muestras), la longitud del registro y el número de bits de la tarjeta de conversión analógica-digital.

A continuación se expondrán algunos conceptos teóricos de sistemas lineales, que serán necesarios más adelante en este capítulo, y de conversión analógica-digital

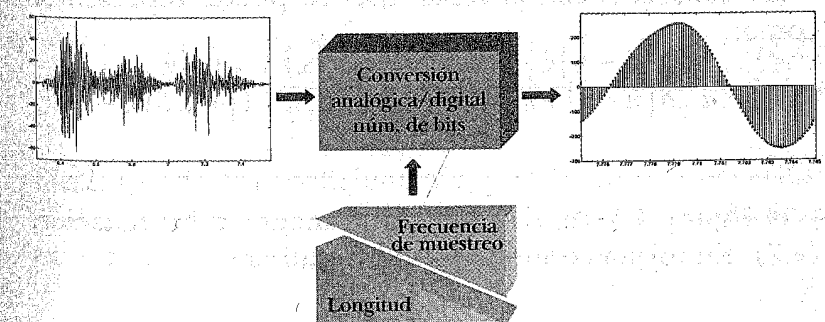


Figura 4.3. Proceso de conversión de una señal analógica en una señal discreta.

para entender los parámetros involucrados en ella, sin profundizar en forma rigurosa en los diversos aspectos teóricos. Para profundizar en los diferentes temas, se le sugiere al lector revisar las referencias [15, 16].

Consideremos la señal que se muestra en la figura 4.4. La primera observación que se puede establecer es que la variable independiente tiempo, denotada por  $n$ , es una variable que pertenece a los números enteros; la segunda observación es que la señal se constituye de cuatro muestras con amplitud diferente de cero,  $a_i$ . La señal  $x[n]$  se puede expresar matemáticamente como la suma ponderada de cuatro señales, es decir:

$$x[n] = \sum_{i=1}^4 x_i[n] \quad (4.1)$$

donde por ejemplo  $x_1[n] = \delta[n+2]$ , con la señal discreta impulso unitario definida como:

$$\delta[n] = \begin{cases} 1 & \text{para } n = 0 \\ 0 & \text{para } n \neq 0 \end{cases}$$

En consecuencia, la señal  $x[n]$  se puede representar como:

$$x[n] = a_{-2}\delta[n+2] + a_{-1}\delta[n+1] + a_1\delta[n-1] + a_3\delta[n-3] \quad (4.2)$$

y la figura 4.5 representa gráficamente a la ecuación (4.2). En forma condensada y generalizada:

$$x[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} a_k \delta[n-k] \quad (4.3)$$

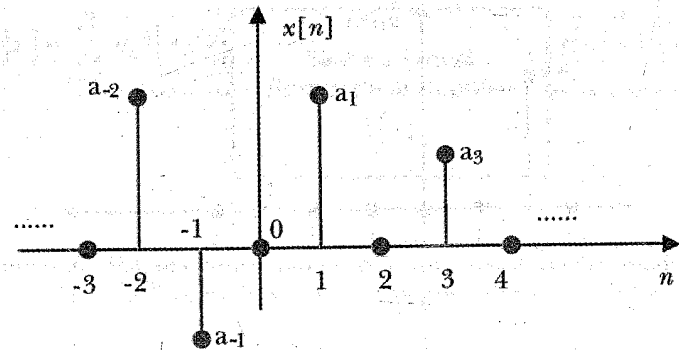


Figura 4.4. Señal de tiempo discreto, el tiempo es una variable de tipo entera.

Podemos concluir que cualquier señal de tiempo discreto  $x[n]$  se puede representar como la suma de impulsos unitarios ponderados y recorridos.

El resultado anterior es importante ya que si consideramos a  $x[n]$  como la señal de entrada a un sistema lineal que se caracteriza por una respuesta al impulso  $h[n]$  y además, que un sistema lineal es una transformación  $T\{\cdot\}$  que se aplica a la señal de entrada, figura 4.6, entonces la salida del sistema  $y[n]$  es:

$$y[n] = T\{x[n]\} = \sum_{k=-\infty}^{\infty} a_k T\{\delta[n-k]\} \quad (4.4)$$

Sustituyendo los coeficientes  $a_k$  por  $x[k]$  en la ecuación (4.4), el valor que toma la señal discreta en la  $k$ -ésima muestra, la salida del sistema corresponde a:

$$y[n] = T\{x[n]\} = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k] T\{\delta[n-k]\} \quad (4.5)$$



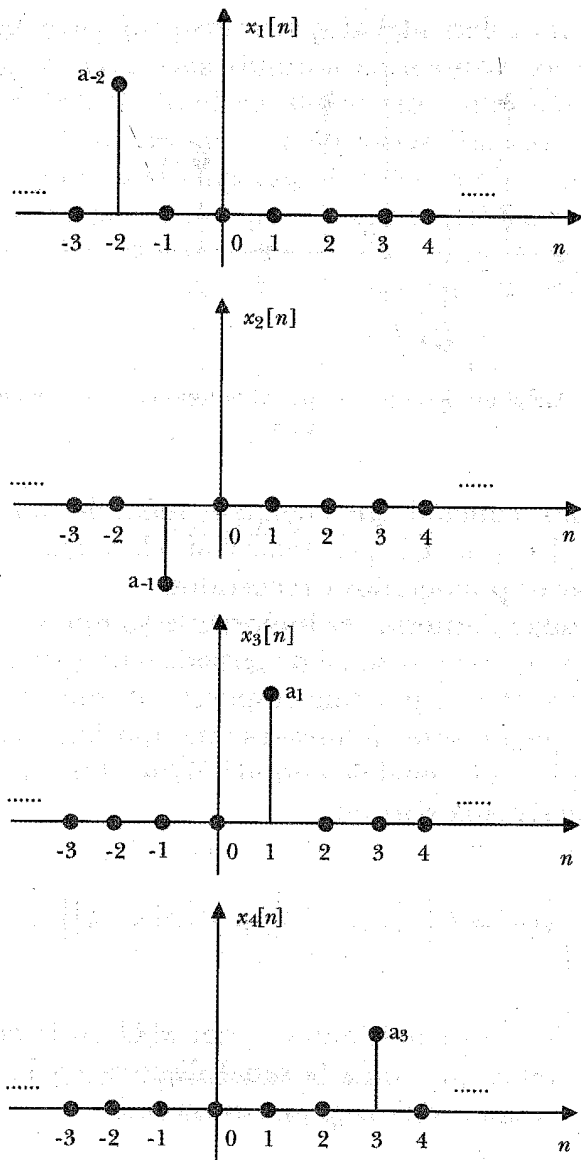


Figura 4.5. Representación de una señal de tiempo discreto como la suma de impulsos recorridos y ponderados por los coeficientes  $a_i$ .

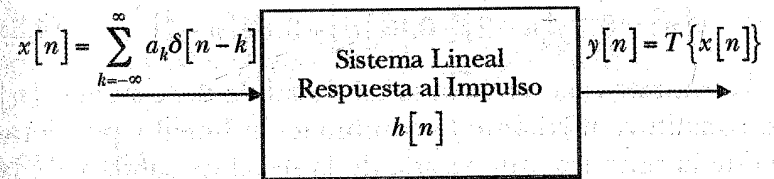


Figura 4.6. Sistema lineal aplicado a una señal representada como la suma de impulsos unitarios ponderados y recorridos.

donde a  $T\{\delta[n-k]\}$  se le conoce como la respuesta al impulso del sistema  $h[n-k]$ . Por consiguiente, la salida de un sistema lineal e invariante al corrimiento es:

$$y[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k]h[n-k] = x[n] \cdot h[n] \quad (4.6)$$

En otras palabras, conociendo la respuesta al impulso del sistema se puede determinar la señal de salida para cualquier señal de entrada [15]. A la ecuación anterior se le conoce como la *convolución* de la señal de entrada con la respuesta al impulso del sistema.

Una representación alternativa para la salida de un sistema discreto lineal e invariante al corrimiento es mediante la *ecuación de diferencias*:

$$y[n] = \sum_{q=0}^N a_q x[n-q] - \sum_{p=1}^M b_p y[n-p] \quad (4.7)$$

donde la muestra actual de la señal de salida  $y[n]$  está en función de muestras pasadas y ponderadas de la misma señal de salida y de las muestras presente y pasadas, ponderadas, de la señal de entrada  $x[n]$ . Por ejemplo, considere la siguiente relación:

$$y[n] = 0.3y[n-2] - 0.8x[n] + 0.6x[n-1] \quad (4.8)$$

La muestra actual de la señal de salida del sistema  $y[n]$  se constituye mediante la combinación lineal y ponderada de la muestra antepasada de la señal de salida y de la muestra presente y pasada, ponderadas, de la señal de entrada. Es importante señalar que el objetivo al diseñar sistemas lineales para procesar señales fisiológicas es determinar en la ecuación (4.7) las muestras de la señal de entrada y salida que deben incluirse en la ecuación de diferencias así como los coeficientes que las ponderan.

A partir de la señal de salida de un sistema lineal e invariante al corrimiento, expresada mediante una ecuación de diferencias, se puede determinar la respuesta a impulso del sistema  $h[n]$ . Para el ejemplo de la ecuación (4.8) se tiene:

$$h[n] = T\{\delta[n]\} \quad ,$$

en consecuencia

$$h[n] = 0.3h[n-2] - 0.8\delta[n] + 0.6\delta[n-1] \quad .$$

La *convolución* de la señal de entrada con la respuesta al impulso del sistema y mediante la *ecuación de diferencias* son representaciones en el *dominio del tiempo discreto*. Sin embargo, podemos representar la señal de salida en un dominio diferente, el *dominio de la frecuencia*. Si aplicamos la *transformada Z*, transformación que es el símil de la *transformada de Laplace* para señales de tiempo continuo, a la señal de salida del sistema de la ecuación (4.7), entonces:

$$Y(z) = TZ\{y[n]\} = \sum_{q=0}^N a_q TZ\{x[n-q]\} - \sum_{p=1}^M b_p TZ\{y[n-p]\}$$

$$Y(z) = \sum_{q=0}^N a_q z^{-q} X(z) - \sum_{p=1}^M b_p z^{-p} Y(z) \quad ,$$

por lo tanto:

$$\frac{Y(z)}{X(z)} = H(z) = \frac{\sum_{q=0}^N a_q z^{-q}}{\sum_{p=0}^M b_p z^{-p}} \quad , \quad (4.9)$$

donde la transformada  $Z$  de una señal se define como

$$Y(z) = TZ\{y[n]\} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} y[n] z^{-n} \quad ,$$

con  $z$  una variable del tipo complejo.

Si evaluamos en  $z = e^{j\omega}$ , donde  $\omega$  es una variable que corresponde a la frecuencia angular y que pertenece a los números reales, entonces:

$$Y(z)|_{z=e^{j\omega}} = Y(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} y[n] e^{-j\omega n} \quad , \quad (4.10)$$

ecuación que corresponde a la transformada de Fourier de tiempo discreto de la señal de salida del sistema. Es decir,  $Y(e^{j\omega})$  es la representación de la señal de tiempo discreto  $y[n]$  en el dominio de la frecuencia digital  $\omega$ . En consecuencia, un sistema lineal discreto e invariante al corrimiento se puede representar de las formas indicadas en la figura 4.7 mediante su respuesta al impulso, su función de transferencia y su respuesta en frecuencia.

La transformada de Fourier de tiempo discreto tiene varias propiedades; sin embargo, con el propósito de establecer el concepto de frecuencia de muestreo consideremos sólo las siguientes propiedades:

- Es una función de  $\omega$  con período de  $2\pi$ .
- Las frecuencias  $\omega = 0$  y  $\omega = 2\pi$  se asocian a los valores de frecuencia más bajos.
- La frecuencia  $\omega = \pi$  corresponde al valor de frecuencia más alto.
- La magnitud es una función par con respecto de  $\omega = \pi$ .

Para ejemplificar las propiedades de la transformada de Fourier de tiempo discreto, consideremos la versión discreta de una señal coseno  $x[n] = \cos(\omega n)$ . Si  $\omega = \pi/2$ , la gráfica correspondiente a la magnitud de la transformada de Fourier de tiempo discreto de la señal  $x[n]$  se muestra en la figura 4.8. Es importante identificar que la espiga ubicada en  $\omega = 3\pi/2$  es debido a que la magnitud es una función par con respecto de  $\omega = \pi$  y que las espigas en  $\omega = -\pi/2$  y  $\omega = -3\pi/2$  se generan por la periodicidad de la transformada de Fourier de tiempo discreto.

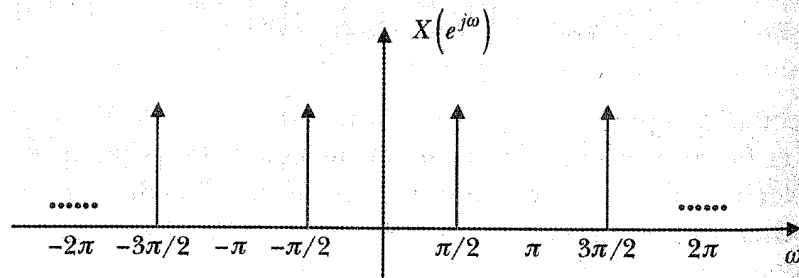


Figura 4.8. Magnitud de la transformada de Fourier de tiempo discreto de una señal coseno, con  $\omega = \pi/2$ .

Una vez establecidos los conceptos teóricos necesarios, iniciemos con la conversión de una señal analógica a una señal digital, considerando el muestreo de la señal de información  $x(t)$ . El primer paso es multiplicar  $x(t)$  por un tren de impulsos  $s(t)$  de la forma:

$$x_s(t) = x(t)s(t)$$

donde

$$s(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(t - nT)$$

$x_s(t)$  es la señal muestreada y aún pertenece al dominio del tiempo continuo y  $s(t)$  es una serie de impulsos espaciados cada  $T$  segundos; únicamente se toma la información de la señal  $x(t)$  en los tiempos  $\dots -T, 0, T, 2T, \dots$ , etcétera, obteniendo la transformada de Fourier de tiempo continuo de  $x_s(t)$ :

$$F\{x_s(t)\} = F\left\{\sum_{n=-\infty}^{\infty} x(nT)\delta(t - nT)\right\}$$

$$X_s(j\Omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x(nT)e^{-j\Omega nT}$$

Si únicamente consideramos los valores definidos a los tiempos  $nT$ , entonces podemos escribir la siguiente ecuación:

$$X_s(j\Omega) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x(nT)e^{-j\Omega nT} \quad (4.11)$$

Si comparamos la ecuación (4.11) con la ecuación de la transformada de Fourier de tiempo discreto descrita por la ecuación (4.10), observamos que se puede establecer la siguiente relación:

$$X_s(j\Omega) = X(e^{j\omega}) \Big|_{\omega=j\Omega} \quad (4.12)$$

Es decir, la relación entre la frecuencia digital  $\omega$  y la frecuencia analógica  $\Omega$  es mediante  $T$ , el período de muestreo. Por lo tanto, el rango de la frecuencia analógica se puede establecer como  $-(\pi/T) \leq \Omega \leq (\pi/T)$ .

La expresión anterior indica que utilizando un período de muestreo  $T$ , la máxima frecuencia analógica  $\Omega$  que se puede representar en el dominio discreto es  $\Omega_{\max} = \pi/T$ . En consecuencia, se pueden establecer las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} \omega_{\max} &= \pi = \Omega_{\max} T \\ \pi &= 2\pi f_{\max} \left( \frac{1}{f_s} \right) \\ f_s &= 2f_{\max} \end{aligned} \quad (4.13)$$

donde  $f_s$  es la frecuencia de muestreo y corresponde al inverso del período de muestreo. En otras palabras, cuando se convierte una señal analógica que presenta una frecuencia máxima  $f_{\max}$ , es necesario por lo menos utilizar una frecuencia de muestreo que corresponda al doble de la  $f_{\max}$ . En la práctica se acostumbra utilizar una frecuencia

de muestreo de tres a cuatro veces la frecuencia máxima de la señal. Para profundizar en los aspectos teóricos del teorema del muestreo revise la referencia [15].

Con relación a la longitud de la señal adquirida, el tiempo total de adquisición es igual a  $TN$ , donde  $N$  es el número de muestras adquiridas. En el caso de los sonidos respiratorios, y para propósitos de capturar sonidos anormales que contienen frecuencias altas, en nuestro grupo de investigación se utiliza una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se adquieren varios ciclos respiratorios con una etapa de apnea inicial y una final, lo que genera 15 segundos de información adquirida [17].

Las tarjetas de conversión analógica-digital (CAD) han evolucionado rápidamente en el sentido de un mayor número de bits, mayor número de canales de adquisición, así como una mayor frecuencia de muestreo. El número de bits es un parámetro importante para obtener una señal digital que represente fielmente en magnitud a la señal analógica. Asuma que sólo se tienen dos bits de conversión, cada valor convertido se representa con una de las siguientes combinaciones: 00, 01, 10, 11; es decir, sólo se tienen cuatro niveles para codificar la magnitud de la señal de entrada. Si el voltaje a escala completa que permite el CAD es de 0 a 5 volts, entonces la resolución del CAD es de 1.66 volts/paso. En la adquisición de señales fisiológicas se selecciona una tarjeta con un mayor número de bits para incrementar la resolución y poder detectar pequeños cambios en la señal. En el caso de los sonidos respiratorios el grupo de investigación de la UAMI utiliza actualmente una tarjeta CAD de 12 bits, la cual da 4096 niveles de codificación para la señal de estudio.

### 4.3. Pre-procesamiento

En general, un fenómeno fisiológico genera variaciones temporales que se conocen, desde el punto de vista de la ingeniería, como señal o serie de tiempo. Una señal es una función de una variable independiente, el tiempo. Cuando un micrófono se coloca sobre la superficie del tórax de un sujeto se adquieren varias señales acústicas, entre otras tenemos la señal respiratoria, la cardiaca, la abdominal, etcétera. En consecuencia, si el interés es el análisis de la señal respiratoria es necesario eliminar la participación de las otras señales; se requiere efectuar un pre-procesamiento de la señal adquirida conocido como filtrado digital determinista. El concepto asociado con el filtrado determinista se puede establecer como la transformación que genera un sistema lineal que actúa sobre la señal adquirida para generar una señal que representa de mejor forma al fenómeno fisiológico que se pretende analizar.

Debido a que existen dos tipos de filtros deterministas y con el propósito de establecer sus principales diferencias, consideremos nuevamente a la función de transferencia de un sistema lineal:

$$\frac{Y(z)}{X(z)} = H(z) = \frac{\sum_{q=0}^N a_k z^{-q}}{\sum_{p=0}^M b_p z^{-p}} \quad (4.13)$$

Dos casos son importantes:

1. Si  $N = 0$  entonces la función de transferencia del sistema lineal es:

$$\frac{Y(z)}{X(z)} = H(z) = \frac{\sum_{q=0}^N a_k z^{-q}}{\sum_{p=0}^M b_p z^{-p}} \quad (4.14)$$

Obteniendo la TZ inversa:

$$\frac{Y(z)}{X(z)} = H(z) = \frac{a_0}{\sum_{p=0}^M b_p z^{-p}}$$

$$Y(z) \sum_{p=0}^M b_p z^{-p} = a_0 X(z) \quad (4.15)$$

$$\sum_{p=0}^M b_p z^{-p} Y(z) = a_0 X(z)$$

Es decir, se trata de un sistema con una salida en función de la muestra actual ponderada de la señal de entrada y de muestras pasadas ponderadas de la misma señal de salida. Como se puede observar en la ecuación (4.15) la función de transferencia  $H(z)$  está constituida por  $M$  polos distribuidos en el plano complejo  $Z$  y  $M$  ceros en el origen. A este tipo de sistemas se le conoce como sistema de únicamente polos o filtro de *respuesta al impulso infinita* (RII) y al parámetro  $M$  se le conoce como el orden del filtro.

2. Si  $M = 0$  y asumiendo  $b_0 = 1$ , entonces la función de transferencia del sistema lineal es:



$$\frac{Y(z)}{X(z)} = \sum_{q=0}^N a_q z^{-q}$$

$$Y(z) = X(z) \sum_{q=0}^N a_q z^{-q} \quad (4.16)$$

$$Y(z) = \sum_{q=0}^N a_q z^{-q} X(z)$$

Obteniendo la transformada Z inversa:

$$y[n] = \sum_{q=0}^N a_q x[n-q]$$

Es decir, se trata de un sistema con una salida cuya muestra actual queda en función de la muestra actual y pasadas ponderadas de la señal de entrada. Como puede observarse, la función de transferencia en la ecuación (4.16) se describe mediante  $N$  ceros distribuidos en el plano complejo  $Z$  y  $N$  polos en el origen. A este tipo de sistema se le conoce como filtro de *respuesta al impulso finita* (RIF). El parámetro  $N$  representa el orden del filtro.

Una diferencia importante entre los filtros mencionados es que el filtro RIF presenta un comportamiento de fase lineal, mientras que en los filtros RII no se puede asegurar tal comportamiento. En la figura 4.9 se observa el resultado de aplicar los dos tipos de filtro a una señal de ECG que presenta una interferencia conocida como movimiento de la línea de base. El filtro RII elimina el

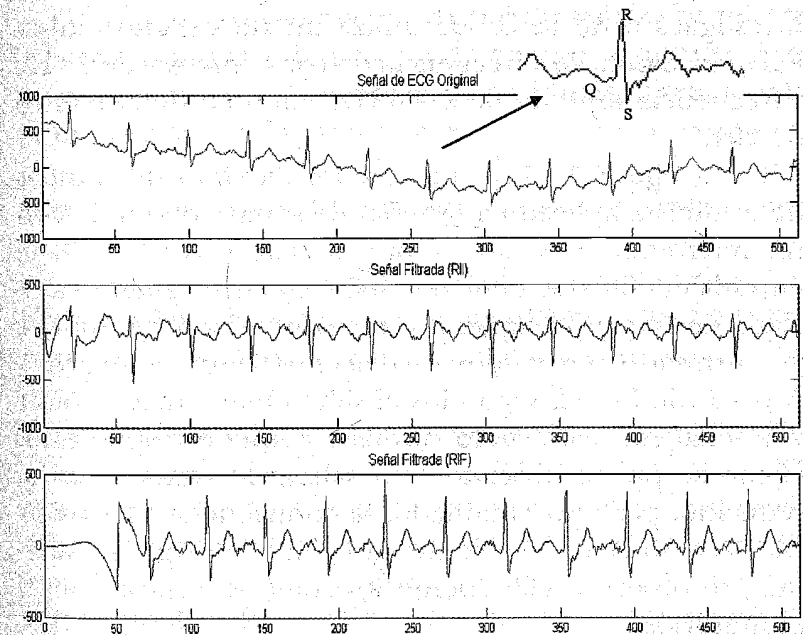


Figura 4.9. Resultado del filtrado de un ECG vía filtros RII y RIF.

movimiento de línea de base; sin embargo, debido a su comportamiento de fase no-lineal, distorsiona los componentes QRS de la señal de ECG. En contraste, el filtro RIF genera un resultado sin distorsión de este componente.

Es importante mencionar que el filtrado determinista asume que las señales de interferencia no comparten anchos de banda o frecuencias con la señal de interés, situación que no corresponde a las señales adquiridas por los micrófonos colocados sobre la superficie torácica. Debido a que el problema de filtrar señales que comparten anchos de banda no es sencillo, algunos autores prefieren analizar la señal del sonido respiratorio en una

banda donde exista principalmente esta señal. En consecuencia, para el caso de sonidos respiratorios el grupo de investigación de la UAMI utiliza un filtro determinista RIF pasa-banda con frecuencia de corte inferior de 75 Hz y frecuencia superior de 2 000 Hz, con un orden de filtro de 201.

En la figura 4.10 se muestra un ejemplo de filtrado determinista aplicado a la señal de sonido obtenida con un micrófono colocado sobre la pared torácica. A la entrada del filtro se tiene una señal con un segmento asociado de apnea (el sujeto no respira) de 3 a 5.2 segundos y constituido por ruidos cardiacos (triángulos negros). A partir de los 5.2 segundos el sujeto empieza a respirar y la señal contiene ruido cardiaco y sonido respiratorio. Como se puede observar a la salida del sistema se ha reducido, pero no eliminado, la contribución del ruido cardiaco, lo cual es evidente en la etapa de apnea y además, se observan claramente los sonidos inspiratorios y espiratorios.

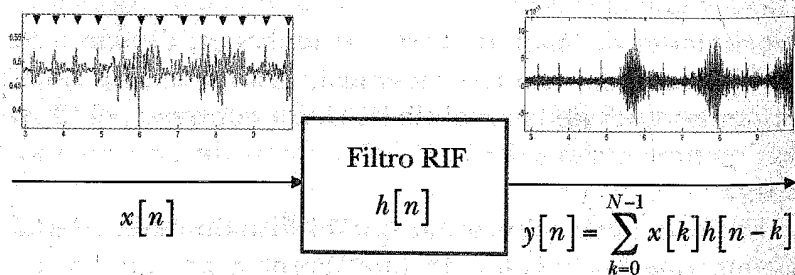


Figura 4.10. Filtrado de la señal del sonido respiratorio en la banda de 75 - 2 000 Hz.

#### 4.4. Procesamiento

El término procesamiento digital de señales se refiere a la manipulación de la serie de tiempo adquirida para propósitos de extracción de información, la obtención de la información de la relación entre dos o más señales o para generar una representación alternativa de la serie de tiempo, entre otras. En esta sección se establecerán elementos esenciales de las técnicas de procesamiento más utilizadas en el análisis de los sonidos respiratorios. Las técnicas de procesamiento que se abordarán en los siguientes párrafos se desarrollan en los dominios del tiempo, la frecuencia y tiempo-frecuencia.

En la figura 4.11 se muestra una señal de sonido respiratorio, adquirida de la cara posterior del tórax en un sujeto sano, con una longitud de registro de 4.3 segundos en el dominio del tiempo discreto; es decir, la amplitud  $x[n]$  versus el tiempo de evolución del ciclo respiratorio. ¿Qué tipo de información se puede obtener de esta señal en el dominio del tiempo? En la serie de tiempo se pueden

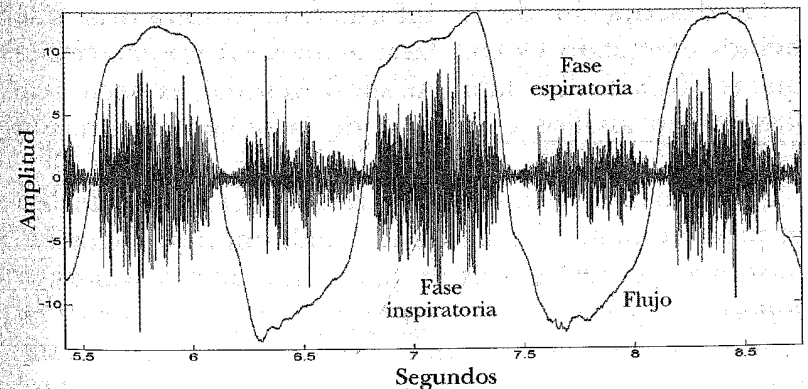


Figura 4.11. Fases inspiratoria y espiratoria de la señal de sonido respiratorio (en azul) de un sujeto sano, en función del flujo (en rojo).

identificar claramente dos actividades en función de sus variaciones de amplitud. Por ejemplo, utilizando la señal de flujo respiratorio como señal de referencia, la información acústica relacionada con la fase inspiratoria se presenta de 5.54 a 6.12 segundos y la información correspondiente a la fase espiratoria se presenta de 6.12 a 6.76 segundos. Como puede observarse, la señal de sonido en la fase inspiratoria presenta una mayor amplitud en comparación con la amplitud de la fase espiratoria, comportamiento que se cumple para las señales adquiridas en la superficie del tórax y no se cumple para señales adquiridas a nivel de tráquea.

En la figura 4.12a se presenta una señal adquirida en un sujeto enfermo, ¿cuál es una diferencia evidente entre esta señal y la señal de la figura 4.11? Una posible respuesta es que se observa una señal con más transiciones como las indicadas por las flechas, lo cual corresponde a sonidos agregados o adventicios. Dependiendo del tipo de enfermedad pulmonar, las transiciones pueden ser sonidos adventicios, crepitantes, silbantes, quejidos (*squawks*), roncantes, etcétera.

La descripción de la información respiratoria que hemos efectuado es con base a nuestras observaciones que realizamos directamente sobre la señal; es decir, realizamos un análisis cualitativo de la señal acústica. Sin embargo, considerando que nuestro propósito es efectuar un análisis de los sonidos respiratorios con base en el procesamiento digital de la señal, entonces necesitamos efectuar un análisis de tipo cuantitativo; esto es, *se requiere representar las características de la señal mediante un conjunto de valores numéricos*. Por ejemplo, podríamos establecer si el comportamiento en la frecuencia de la fase inspiratoria es diferente al comportamiento en la frecuencia de la fase espiratoria. Iniciemos nuestra descripción

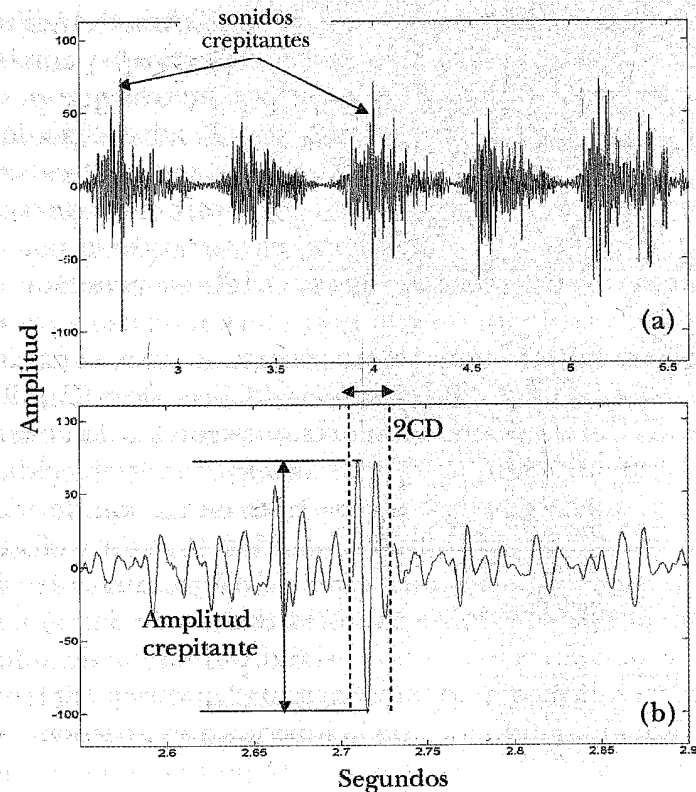


Figura 4.12. (a) Señal de sonido respiratorio de un sujeto enfermo, (b) expansión en tiempo de la señal respiratoria.

objetiva con la técnica que representa a los sonidos adventicios mediante su comportamiento en el tiempo.

#### 4.4.1. Análisis de los sonidos respiratorios mediante su expansión en el tiempo (TEWA)

Un intento en la caracterización de los sonidos adventicios presentes en señales pulmonares adquiridas en sujetos enfermos es mediante su expansión en el tiempo

discreto. En 1977 Murphy y col. propusieron el *Análisis de la forma de onda mediante la expansión en el tiempo* y con base en la expansión se establecieron parámetros que permiten identificar y definir el tipo de sonido adventicio denominado crepitante [18]. Uno de los parámetros es el ancho de la deflexión inicial (IDW), otro es la duración de 2 ciclos (2CD) y finalmente, el ancho de la máxima deflexión (LDW). En la figura 4.12b se presenta una expansión en tiempo de la información acústica presentada en la figura 4.12a. Como puede medirse, el parámetro IDW es de 2.5 milisegundos y 2CD es de 6.25 milisegundos. Con base en los valores anteriores y de acuerdo con la clasificación de sonidos adventicios establecida en [18], se puede concluir que se trata de un sonido crepitante grueso. Si generalizamos la idea anterior y efectuamos la *parametrización* mediante TEWA de una colección de señales de sonido respiratorio (banco de datos) constituida por el registro de actividad pulmonar de sujetos sanos y enfermos, podemos imaginar que es posible una clasificación automática de la información acústica.

#### 4.4.2. Parámetros en la frecuencia

La *parametrización* de sonidos adventicios vía TEWA depende fuertemente de la identificación de los segmentos de la señal donde ocurre el evento. Sin embargo, dependiendo de la posición espacial del micrófono la información del sonido basal puede distorsionar significativamente la morfología del estertor crepitante [17]. Además, si dos estertores se encuentran temporalmente cercanos o se traslapan no es posible aplicar TEWA y en consecuencia, para propósitos de clasificación automática de los crepitantes es necesario utilizar otras formas de parametrizar la información acústica.

¿Qué otras formas existen para extraer información relevante de una señal biomédica? La respuesta es la representación de la información acústica en el dominio de la frecuencia. Existen diversas razones que fundamentan el realizar una transformación de un dominio a otro. El ejemplo clásico es el uso de los logaritmos, es menos costoso computacionalmente hablando realizar una suma de logaritmos y una operación de anti-logaritmo que realizar la multiplicación directa de las dos cantidades. Una de las herramientas matemáticas clásicas para realizar la transformación del dominio del tiempo a la frecuencia es la transformada de Fourier. ¿Cuál es la idea fundamental? Se requiere conocer cuáles y cuántas señales coseno de diferente frecuencia, amplitud y fase constituyen a la señal. Por ejemplo, en la figura 4.13a se presenta una señal que es el resultado de sumar dos señales coseno de frecuencias de oscilación de 10 y 100 Hz. En el dominio del tiempo la señal se puede describir de la siguiente forma: analizando visualmente a la señal se deduce que tiene una componente con variación lenta y otra con una variación más rápida, conforme el tiempo avanza. En la figura 4.13b se muestra la magnitud de la representación en la frecuencia de la señal descrita y se observa que sólo existen dos picos importantes en las frecuencias de 10 y 100 Hz. En este ejemplo, es más sencillo caracterizar a la señal en el dominio de la frecuencia. En los siguientes párrafos se establecen los conceptos teóricos involucrados en la representación espectral de una señal fisiológica.

El procesamiento de una señal fisiológica y en particular, de la señal de sonidos respiratorios se puede efectuar considerando la teoría de procesos estocásticos. Iniciemos por establecer que la señal de la figura 4.11 o 4.12a no parecen ajustarse a una función matemática

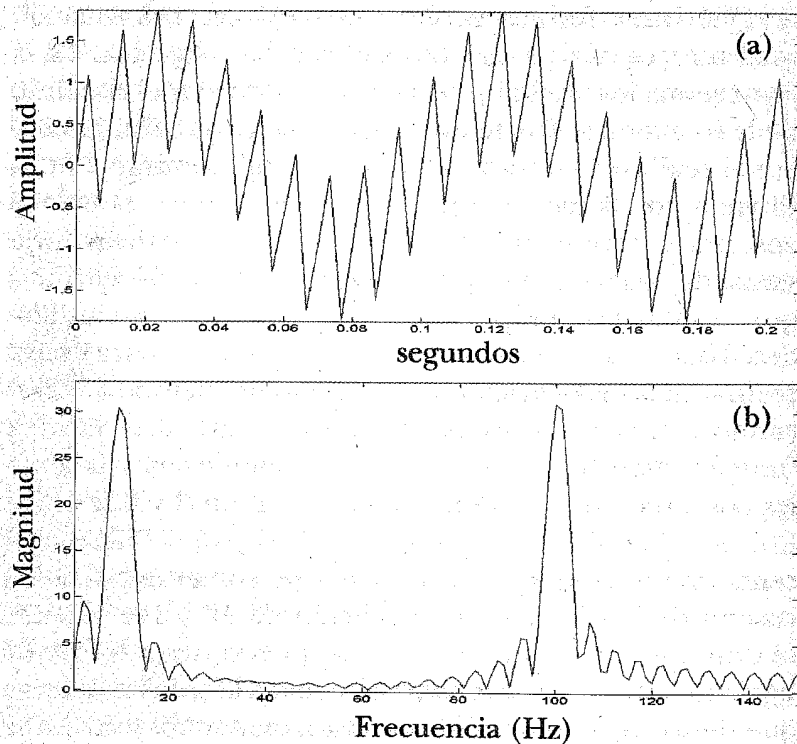


Figura 4.13. (a) Señal en el dominio del tiempo generada por la suma de dos senoïdes, (b) representación en el dominio de la frecuencia de la señal en (a).

conocida. Las señales que se pueden representar en términos de funciones matemáticas se denominan señales deterministas y son señales cuyos valores futuros se pueden conocer sin ningún error, dado que se conoce la función matemática que genera sus valores. Es evidente que el procesamiento de señales deterministas es relativamente sencillo, desafortunadamente no es el caso de las señales de sonido respiratorio. Las señales respiratorias se consideran como señales de tipo estocástico. Esta nueva clase de señales impone nuevas formas de analizar o

extraer información de la señal. En el caso de la figuras 4.11 y 4.12a se puede considerar que cada valor que toma la señal, en cada tiempo discreto, es el valor numérico asociado a la salida de un experimento; es decir, es una variable aleatoria. Por lo tanto, recordando conceptos de probabilidad y estadística relacionados con el ensamble de un experimento y condición de *ergodicidad*, la señal respiratoria se puede analizar mediante promedios estadísticos como su valor promedio, su varianza, su histograma de valores como una estimación de la función de densidad de probabilidad, su función de autocorrelación, etcétera [19].

Un proceso estocástico se caracteriza por su ensamble constituido por diferentes realizaciones del proceso, y su función de densidad de probabilidad (pdf) conjunta. A partir de la pdf conjunta se pueden obtener los diferentes momentos estadísticos que caracterizan al proceso estocástico. Consideremos la estadística de segundo orden de un proceso estocástico; es decir, la estadística que se genera al considerar la relación entre dos variables aleatorias que se definen sobre el ensamble del proceso. En el caso de dos variables aleatorias, sin importar el tiempo al que ocurren, se definen dos tipos de momentos estadísticos:

*Momentos conjuntos alrededor del origen:*

$$m_{lk} = E[X^l Y^k] = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x^l y^k f_{XY}(x, y) dx dy, \quad (4.17)$$

donde  $X$  y  $Y$  representan variables aleatorias definidas sobre el ensamble a dos tiempos diferentes. Para el caso de  $k = 0$  y  $l = 1$ , la ecuación (4.17) se reduce al valor promedio de la variable aleatoria  $X$ . Para el caso de  $k = 1$  y



$l = 1$ , la ecuación (4.17) genera la correlación que existe entre las variables aleatorias  $X$  y  $Y$ .

*Momentos conjuntos centrales:*

$$\begin{aligned}\mu_{lk} &= E \left[ (X - E[X])^l (Y - E[Y])^k \right] \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} (x - E[X])^l (y - E[Y])^k f_{XY}(x, y) dx dy.\end{aligned}$$

El momento conjunto central  $\mu_{lk}$  es un indicador de la dependencia lineal entre las variables aleatorias  $X$  y  $Y$ ; la covarianza entre las variables aleatorias.

Para un proceso estocástico se considera que su ensamble se constituye por variables aleatorias definidas en cada instante de tiempo, en consecuencia, si se desea trabajar con la estadística de segundo orden de un proceso estocástico es necesario incluir el tiempo al que se origina la relación entre dos variables aleatorias. Para el caso de la correlación y la covarianza, al incluir el tiempo se transforman en la función de autocorrelación y la función de autocovarianza, es decir:

$$\begin{aligned}R_{XX}(t, t + \tau) &= E[X(t)X(t + \tau)] = E[X_1 X_2] \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x_1(t) x_2(t + \tau) f_{XX}(x_1, x_2; t, t + \tau) dx_1 dx_2.\end{aligned}\tag{4.18}$$

$$C_{XX}(t, t + \tau) = E \left[ (X(t) - E[X(t)])(X(t + \tau) - E[X(t + \tau)]) \right].$$

Existe una situación que es frecuente encontrar en el análisis de fenómenos fisiológicos: no se cuenta con un ensamble de realizaciones y en consecuencia, el análisis se debe efectuar a partir de una sola realización del proceso. El concepto de *ergodicidad* establece que la estadística del ensamble de un proceso estocástico se puede obtener a partir de los promedios temporales de una realización. Es evidente que un proceso *ergódico* tiene una función de densidad conjunta que no depende del tiempo. A este tipo de procesos se les conoce como *procesos estocásticos estacionarios*. Para comprender el concepto de estacionariedad asumamos que estamos interesados en determinar el valor promedio de cada una de las variables definidas en el ensamble. Una posibilidad es que los valores promedios sean diferentes, otra posibilidad es que sean iguales. Si todos los momentos estadísticos de todas las variables son iguales, entonces el proceso estocástico es estacionario de primer orden, si todos los momentos estadísticos generados por dos variables son iguales, entonces el proceso es estacionario de segundo orden, etcétera. Por lo tanto, al asumir ergodicidad de un proceso estamos también asumiendo que el proceso es estacionario. En el análisis de señales fisiológicas es frecuente encontrar técnicas de procesamiento que asumen estacionariedad de segundo orden, sin embargo, también existen técnicas de procesamiento que asumen estacionariedad de orden más alto.

El asumir ergodicidad de un proceso tiene como consecuencia aceptar que no tenemos la función de densidad conjunta y por lo tanto, únicamente se pueden estimar los diferentes momentos estadísticos del proceso. A continuación se proporcionan los *estimadores de los momentos estadísticos* más importantes:

Valor promedio:

$$\hat{\mu} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N x[n].$$

Varianza:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (x[n] - \hat{\mu})^2.$$

Función de autocorrelación:

$$\hat{R}_{XX}(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{N-k} x[n] x[n+k].$$

Función de covarianza:

$$\hat{C}_{XX}(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{N-k} (x[n] - \hat{\mu})(x[n+k] - \hat{\mu}),$$

donde  $N$  representa la longitud de la señal y  $n$  al tiempo discreto.

En la sección de pre-procesamiento se introdujo el concepto de representación en el dominio de la frecuencia para una señal determinista. Sin embargo, como ya se mencionó la señal de sonido respiratorio presenta una morfología compleja y se considera de tipo estocástico, aún así es posible calcular su representación en la frecuencia mediante la estimación de su espectro de potencia. Se puede demostrar que el estimador para el espectro de potencia de una señal estocástica es [19]:

$$\hat{S}_{XX}(\omega) = F\{\hat{R}_{XX}(k)\}, \quad (4.19)$$

donde  $F\{\cdot\}$  representa la transformada de Fourier de tiempo discreto y  $\hat{R}_{XX}$  es el estimador de la función de autocorrelación del proceso. Además, se puede demostrar que el resultado proporcionado por la ecuación (4.19) se puede obtener mediante la magnitud al cuadrado de la transformada de Fourier del proceso estocástico, es decir:

$$\hat{S}_{XX}(\omega) = \frac{|X(e^{j\omega})|^2}{2N}.$$

En la figura 4.14a se presenta el ancho de banda correspondiente a señales acústicas respiratorias, cardiacas y gástricas, al aplicar la ecuación (4.20).

Con relación al análisis de los sonidos respiratorios, a partir del espectro de potencia se ha obtenido información del contenido espectral de señales adquiridas en diversas zonas pulmonares para propósitos de clasificación que han permitido responder a preguntas como: ¿es un sonido traqueal o un sonido pulmonar?, ¿es un sonido respiratorio proveniente de un sujeto sano o enfermo?, etcétera. Por ejemplo, en la figura 4.14b se presenta (línea azul) el contenido en frecuencia de una señal de sonido traqueal *versus* el contenido de una señal pulmonar (línea roja). Como se puede observar el sonido traqueal presenta un mayor contenido en frecuencia que el sonido pulmonar.

A partir del espectro de potencia es posible extraer información de los sonidos respiratorios, mediante la selección de ciertas frecuencias denominadas frecuencias

percentilares; procedimiento que se conoce como parametrizar la información. El procedimiento es como sigue: se obtiene el área total bajo la curva del espectro de potencia, ecuación (4.20), y se ubican las frecuencias a las cuales se obtiene un cierto porcentaje del área total del espectro. Por ejemplo,  $f_{25}$  es la frecuencia a la que se obtiene el 25% del área total del espectro de potencia en

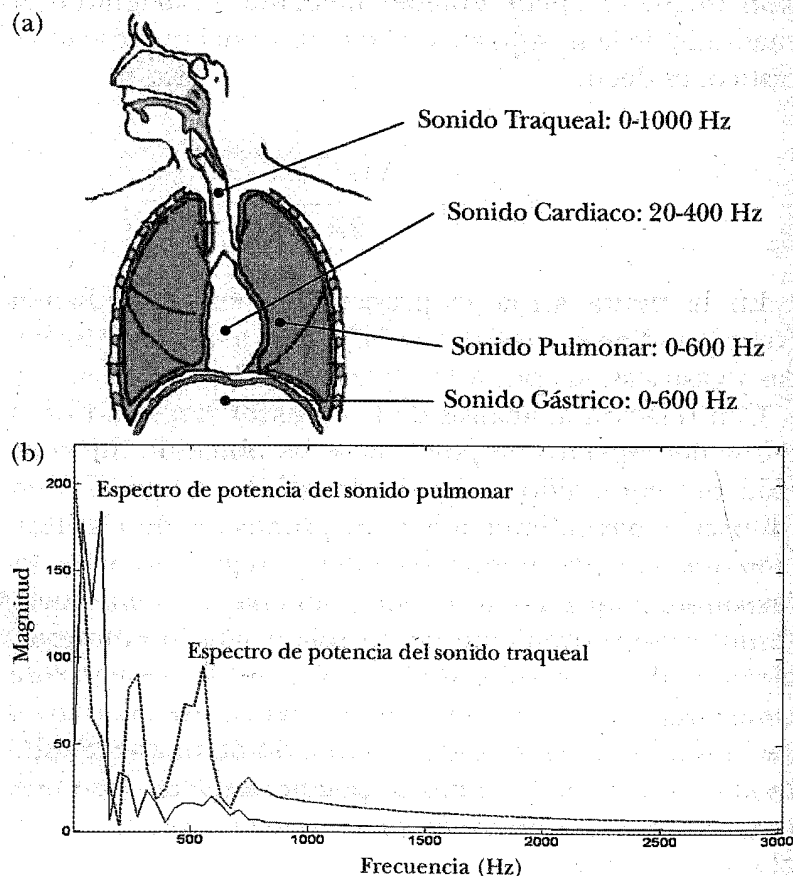


Figura 4.14. (a) Caracterización en el dominio de la frecuencia de diferentes señales fisiológicas acústicas. (b) Espectro de potencia de los sonidos pulmonar y traqueal.

el percentil 25. En la figura 4.15 se muestran las frecuencias percentilares que se han utilizado para formar un vector de parámetros que permita distinguir diferentes tipos de sonidos respiratorios a través de un proceso de clasificación.

En los párrafos anteriores se estableció la forma de determinar el espectro de potencia de una señal estocástica; sin embargo, existe una alternativa que se basa en el modelado paramétrico de la señal de sonido respiratorio. En la siguiente sección se abordará este tema.

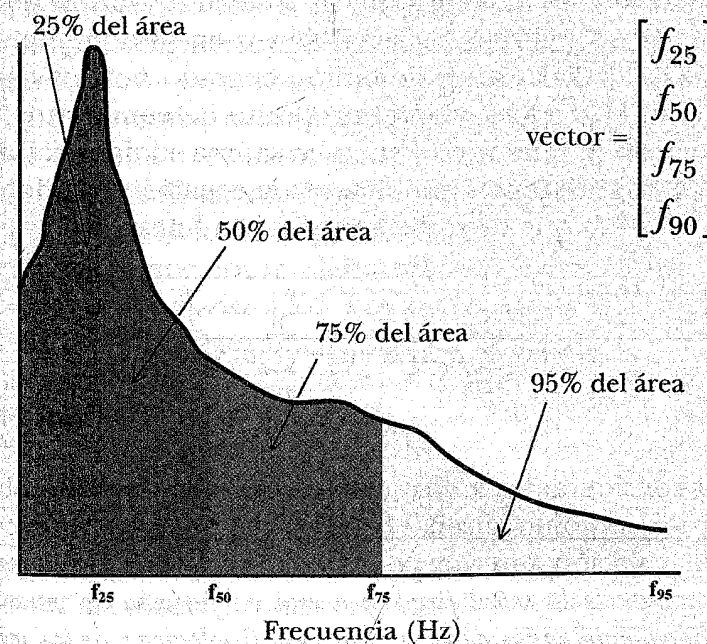


Figura 4.15. Parametrización del espectro de potencia (EP) de los sonidos respiratorios, mediante frecuencias percentilares.

#### 4.4.3. Modelado paramétrico de la señal de sonido respiratorio

El objetivo del modelado paramétrico de una señal generada por un fenómeno fisiológico es representar su estadística mediante un conjunto de coeficientes. Por ejemplo, en el caso del reconocimiento automático de voz, la señal se segmenta en ventanas de tiempo de corta duración y cada segmento se representa mediante 16 parámetros. Los parámetros obtenidos se pueden utilizar para propósitos de clasificación automática de los diferentes fonemas que constituyen la señal de voz. Es decir, en lugar de analizar a la señal de voz en su dominio original se analiza en un dominio generado por los coeficientes del modelo. Con el propósito de comprender el modelado paramétrico y su aplicación a sonidos respiratorios, consideremos nuevamente la ecuación de diferencias en (4.7) que describe a un sistema lineal:

$$y[n] = \sum_{q=0}^N a_q x[n-q] - \sum_{p=1}^M b_p y[n-p].$$

Si consideramos a  $x[n]$  como una señal de ruido blanco y a  $y[n]$  como la señal fisiológica a modelar, entonces de la ecuación anterior podemos interpretar que *la muestra actual de la señal fisiológica está en función de muestras pasadas ponderadas de la misma señal fisiológica y de las muestras presente y pasadas ponderadas del ruido blanco*. Es importante considerar que existe una diferencia significativa con respecto de la interpretación que se estableció en la sección de procesamiento de la ecuación (4.7); ahora tanto la señal de entrada como la señal de salida son procesos estocásticos. En consecuencia, dada una señal

fisiológica el objetivo del modelado paramétrico es determinar los coeficientes  $a_q$  y  $b_p$  de la ecuación de diferencias. Tomando en consideración que la señal a modelar es un proceso estocástico y que su procesamiento se efectúa mediante promedios estadísticos, el cálculo de los coeficientes se debe realizar utilizando un *criterio de optimización*.

Iniciemos nuestro análisis teórico recordando que existen dos tipos de sistemas, aquellos en que la muestra actual de la señal de salida depende únicamente de muestras pasadas ponderadas de la misma señal de salida y de la muestra actual de la señal de entrada, conocidos como *modelos autorregresivos* (AR), y aquellos donde la salida depende de la muestra actual y pasadas ponderadas de la señal de entrada, conocidos como *modelos de promedio móvil* (MA). En el modelado de señales fisiológicas se acostumbra utilizar modelos AR ya que, independientemente del modelo de origen de la señal asociada al fenómeno fisiológico, los modelos AR han demostrado generar buenos resultados [20]. Los parámetros de un modelo AR se pueden determinar si consideramos que estimamos la muestra actual de la señal a modelar de la siguiente forma:

$$\hat{y}[n] = - \sum_{p=1}^l b_p y[n-p]. \quad (4.21)$$

El error al estimar la muestra actual de la señal de salida es:

$$e[n] = y[n] - \hat{y}[n] = y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p],$$

donde  $e[n]$  es un proceso de ruido y también un proceso estocástico. En consecuencia, el error cuadrático medio en el modelado de la señal fisiológica es:

$$E[e^2[n]] = E[(y[n] - \hat{y}[n])^2] = E\left[\left(y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p]\right)^2\right], \quad (4.22)$$

donde  $E[\cdot]$  es el operador valor esperado. Es evidente que para modelar adecuadamente a  $y[n]$  se requiere que el error cuadrático medio sea mínimo en la ecuación (4.22). Es decir, hay que derivar la ecuación (4.22) con respecto de los coeficientes  $b_p$  e igualar a cero el resultado, por lo tanto:

$$\frac{\partial E[e^2[n]]}{\partial b_p} = E\left[\frac{\partial \left(y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p]\right)^2}{\partial b_p}\right]$$

$$\frac{\partial E[e^2[n]]}{\partial b_p} = E\left[2\left(y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p]\right) \sum_{i=1}^l y[n-i]\right].$$

Igualando a cero la ecuación anterior:

$$E\left[\left(y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p]\right) \sum_{i=1}^l y[n-i]\right] = 0$$

$$E\left[\sum_{i=1}^l y[n] y[n-i]\right] + E\left[\sum_{p=1}^l \sum_{i=1}^l b_p y[n-p] y[n-i]\right] = 0 \quad (4.23)$$

$$\sum_{p=1}^l \sum_{i=1}^l b_p E[y[n-p] y[n-i]] = -\sum_{i=1}^l E[y[n] y[n-i]],$$

$$\text{donde } [y[n-p] y[n-i]] = R_{YY}(p-i) = R_{YY}(i-p)$$

es la función de autocorrelación entre las variables aleatorias, definidas sobre el ensamble, a los tiempos  $n-p$  y  $n-i$ . En este caso se asume que el proceso a modelar es estacionario y por lo tanto  $R_{YY}(p-i) = R_{YY}(i-p)$ , lo que significa que el momento estadístico correspondiente a la función de autocorrelación es independiente del tiempo. Entonces, la ecuación (4.23) puede escribirse como:

$$\sum_{p=1}^l \sum_{i=1}^l b_p R_{YY}(p-i) = -\sum_{i=1}^l R_{YY}(i). \quad (4.24)$$

Si escribimos la ecuación anterior en forma matricial:

$$\begin{bmatrix} R_{YY}(0) & R_{YY}(1) & R_{YY}(2) & \cdots & R_{YY}(l-1) \\ R_{YY}(1) & R_{YY}(0) & R_{YY}(1) & \cdots & R_{YY}(l-2) \\ R_{YY}(2) & R_{YY}(1) & R_{YY}(0) & \cdots & R_{YY}(l-3) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ R_{YY}(l-1) & R_{YY}(l-2) & R_{YY}(l-3) & \cdots & R_{YY}(0) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ \vdots \\ b_l \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_{YY}(1) \\ R_{YY}(2) \\ R_{YY}(3) \\ \vdots \\ R_{YY}(l) \end{bmatrix}$$

$$[R_{YY}]_{l \times l} [b]_{l \times 1} = [R_{YY}]_{l \times 1} \quad (4.25)$$



Es decir, para determinar los coeficientes de un modelo AR se requiere resolver un sistema lineal de ecuaciones con  $l$  incógnitas, los coeficientes, dado que se puede determinar la función de autocorrelación de un proceso estocástico estacionario.

Una vez que se tienen los parámetros del modelo AR es posible efectuar tareas de procesamiento como el generar el espectro de potencia de alta resolución de la señal o efectuar un reconocimiento de patrones. El espectro de potencia, con base a los coeficientes del modelo AR, se puede obtener si consideramos lo siguiente:

$$e[n] = y[n] - \hat{y}[n] = y[n] + \sum_{p=1}^l b_p y[n-p] \quad (4.26)$$

$$y[n] = -\sum_{p=1}^l b_p y[n-p] + e[n].$$

Obteniendo TZ de la ecuación (4.26), donde  $y[n]^{TZ} \Rightarrow Y(z)$  y  $e[n]^{TZ} \Rightarrow E(z)$ , se tiene:

$$Y(z) = \frac{E(z)}{\sum_{p=0}^l b_p z^{-p}} \Rightarrow H(z) = \frac{1}{\sum_{p=0}^l b_p z^{-p}} \Rightarrow H(e^{j\omega}) = \frac{1}{\sum_{p=0}^l b_p e^{-j\omega p}}$$

Se puede demostrar que el espectro de salida de un sistema lineal con entrada estocástica es:

$$S_{YY}(\omega) = |H(e^{j\omega})|^2 S_{XX}(\omega), \quad (4.27)$$

donde  $H(e^{j\omega})$  es la respuesta en frecuencia del sistema y  $S_{XX}(\omega)$  es el espectro de potencia de la señal de entrada al sistema lineal [19, 20]. Recordando que el espectro de potencia de una señal es la transformada de Fourier de la función de autocorrelación y que la función de autocorrelación de una señal de ruido blanco es una función delta con magnitud igual a la varianza del proceso de ruido ubicada en  $\omega = 0$ , entonces el espectro de potencia de una señal estocástica es:

$$S_{YY}(\omega) = \frac{\sigma_e^2}{\sum_{p=0}^l b_p e^{-j\omega p}}, \quad (4.28)$$

donde  $\sigma_e^2$  es la varianza del ruido del modelo. En la figura 4.16 se muestra el espectro de potencia de una señal de sonido respiratorio traqueal con base a los parámetros del modelo de la ecuación (4.28).

Para el caso de los sonidos respiratorios, en nuestro grupo de investigación se determinan sobre el espectro de potencia, obtenido a partir de un modelo AR con 6 coeficientes, 6 frecuencias percentilares [21]. Con las frecuencias percentilares se construye un vector, conocido como vector de características, que se considera como la entrada a un sistema que permite efectuar tareas de clasificación de los sonidos respiratorios, ver figura 4.17.

En el reconocimiento automático de patrones de señales fisiológicas estocásticas una alternativa es conformar el vector de características directamente con los coeficientes del modelo AR. En el caso específico de los sonidos respiratorios se ha realizado la clasificación automática de la información acústica de sujetos sanos y de sujetos

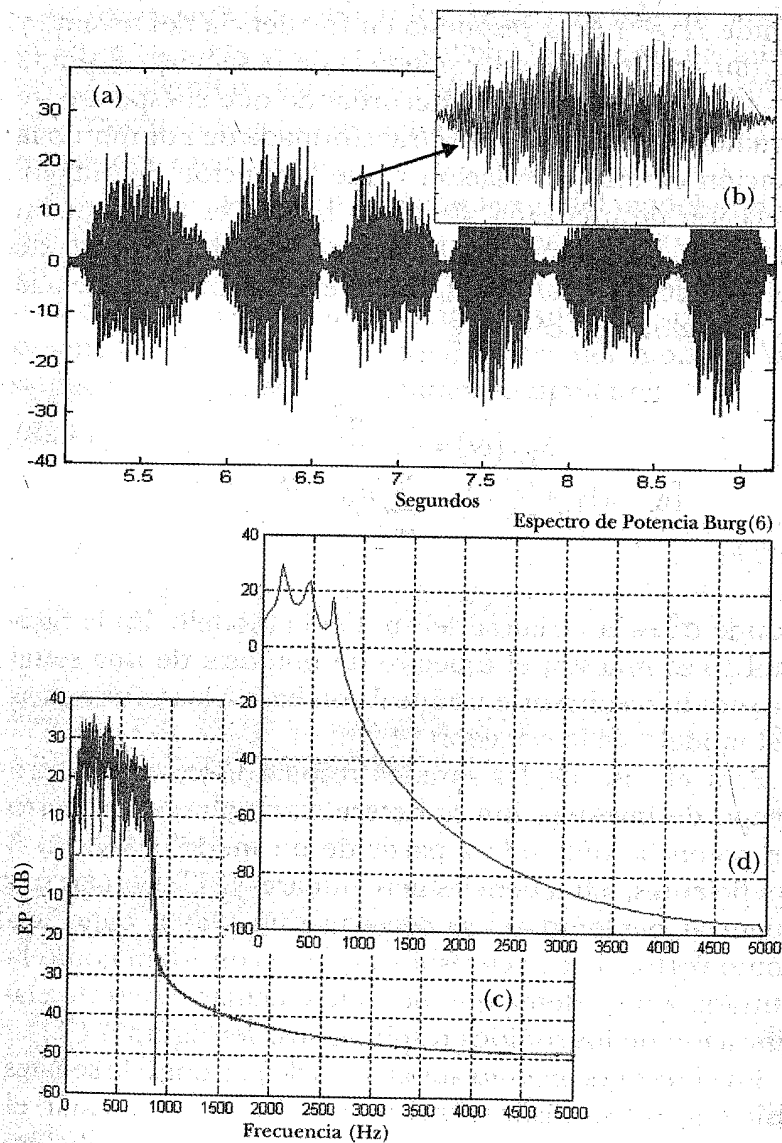


Figura 4.16. (a) Señal de sonido traqueal, (b) fase inspiratoria segmentada de (a), (c) espectro de potencia vía la transformada de Fourier y, (d) espectro de potencia vía modelo AR de orden 6.

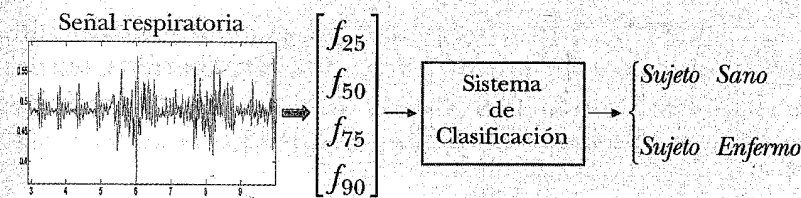


Figura 4.17. Reconocimiento de patrones de señales respiratorias con base en la construcción de un vector de características mediante frecuencias percentilares.

con neumopatía intersticial difusa mediante la parametrización de la fase inspiratoria de la señal de sonido respiratorio [21, 22]. En este caso, con el propósito de asumir estacionariedad del proceso, cada una de las fases inspiratorias se dividió en 30 ventanas temporales y cada ventana temporal se parametriza mediante un modelo AR con 6 coeficientes. En consecuencia, el vector de características se constituyó de 180 coeficientes, ver figura 4.18.

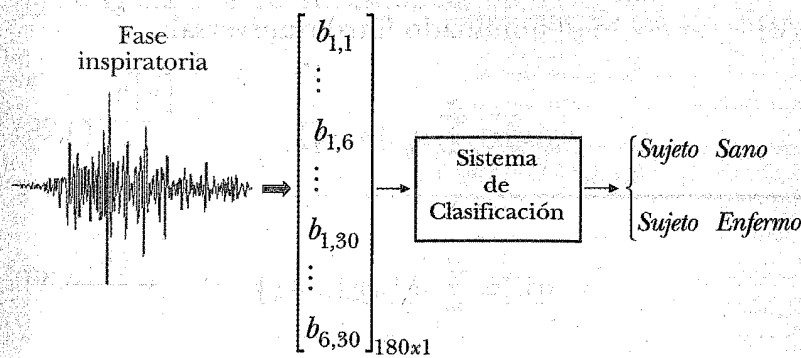


Figura 4.18. Reconocimiento de patrones de señales de sonidos respiratorios con base en los coeficientes de un modelo AR de orden 6. Para asumir estacionariedad, la fase inspiratoria se dividió en treinta ventanas temporales.

Existen otras formas de parametrizar la información de los sonidos respiratorios; sin embargo, la idea es la misma, representar la información del fenómeno fisiológico en un conjunto de parámetros [21].

#### 4.4.4. Filtrado adaptable del sonido respiratorio

Una de las líneas de investigación importante en sonidos respiratorios, aun cuando se podría considerar como un pre-procesamiento de la señal, se enfoca a reducir las señales de interferencia mediante la aplicación de *filtros adaptables*; el énfasis se ha dado a la reducción de interferencias acústicas cardiacas [23, 24]. La ventaja de los filtros adaptables es que conservan información de la señal de interés en las bandas de frecuencia que comparten con las señales de interferencia. La ecuación (4.29) corresponde a la ecuación de diferencias de un filtro determinista, mientras que la ecuación (4.30) corresponde a un filtro adaptable lineal con respuesta al impulso finita (RIF), también denominado filtro transversal:

$$y[n] = \sum_{q=1}^N a_q x[n-q] \quad (4.29)$$

$$y[n] = \sum_{q=1}^N a_q[n] x[n-q]. \quad (4.30)$$

Es evidente que en el segundo caso, los coeficientes del filtro  $a_q$  dependen del tiempo discreto  $n$  y su correspondiente respuesta al impulso se modifica con el tiempo para ajustarse a las características estadísticas de la señal de

entrada. Los coeficientes del filtro adaptable  $a_q$  se determinan minimizando la función de costo o índice de desempeño:

$$J = \sum_{n=N-1}^{L-1} |d[n] - y[n]|^2, \quad (4.31)$$

donde la señal  $d[n]$ , en notación de la teoría de filtrado adaptable, corresponde a la señal a procesar; en el caso de los sonidos respiratorios corresponde a la señal adquirida en la superficie del tórax. Además,  $y[n]$  en la ecuación (4.31) es la señal de salida del filtro adaptable,  $L$  es la longitud total de las señales y  $N$  es el orden del filtro. La figura 4.19 muestra el esquema conocido como cancelación de interferencias. Al sustituir la ecuación (4.30) en (4.31) se observa que  $J$  es una función cuadrática de los coeficientes  $a_q$  y en consecuencia, para determinar el mínimo de la función se calcula el vector gradiente de  $J$  y se iguala a cero el resultado. La minimización de la

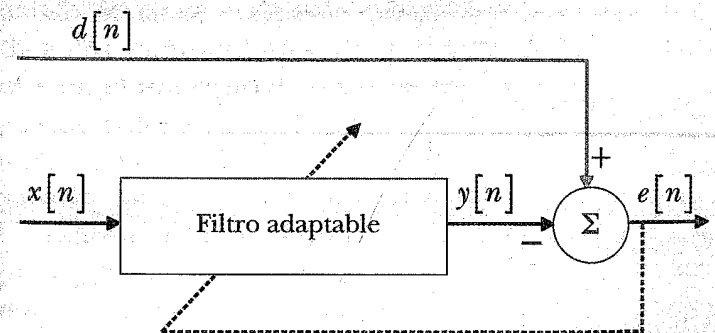


Figura 4.19. Esquema de cancelación de interferencias con base en un filtro adaptable RIF.  $d[n]$  representa la señal adquirida mientras que  $x[n]$  representa una realización de la señal a minimizar su efecto en  $e[n]$ .

ecuación (4.31) con respecto de  $a_q$  genera la ecuación iterativa:

$$\hat{a}_q[n+1] = a_q[n] + \mu e[n]x[n], \quad (4.31)$$

donde  $\mu$  es el parámetro de paso que impacta en la velocidad de convergencia del algoritmo y en consecuencia, en la rapidez para seguir los cambios estadísticos de la señal  $d[n]$ . Además, la señal de error  $e[n] = d[n] - y[n]$  y  $x[n]$  es la señal de referencia; es decir, en el caso de los sonidos respiratorios  $x[n]$  corresponde a un segmento de ruido cardiaco. En la figura 4.20 se muestra el resultado de aplicar un filtro adaptable a la señal adquirida en un sujeto sano y como se puede observar se reduce la contribución del ruido cardiaco [23]; se incluyen marcas en color rojo, tanto en la señal original como en la señal filtrada, para facilitar la visualización del desempeño del filtro adaptable.

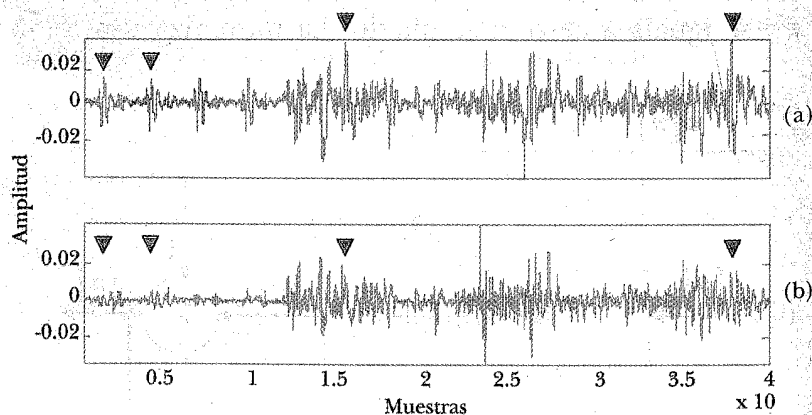


Figura 4.20. (a) Señal respiratoria adquirida, (b) resultado del filtrado adaptable. Las felchas en color rojo en ambas gráficas indican la posición de algunos de los ruidos cardiacos, donde es evidente la atenuación.

#### 4.4.5. Representación tiempo-frecuencia de los sonidos respiratorios

En algunas aplicaciones es fundamental el determinar el tiempo al que se generan los diversos componentes en frecuencia de una señal. Para entender este nuevo concepto comparemos la información de la señal de la figura 4.13a con la figura 4.21a. En la señal de la figura 4.13a las señales coseno aparecen en todo el tiempo mientras que en la figura 4.21a en los primeros 0.2 segundos aparecen dos componentes, de 0.2 a 0.4 segundos sólo se presenta el componente de más baja frecuencia y el componente de más alta frecuencia se presenta de 0.4 a 0.7 segundos. El contenido en frecuencia en la figura 4.21b no contiene el comportamiento temporal de la señal y únicamente muestra que existen dos componentes, a 10 y 100 Hz. Por otro lado, la nueva representación de la señal mostrada en la figura 4.21c, en el dominio tiempo-frecuencia, es una imagen donde el eje  $x$  representa el tiempo, el eje  $y$  la frecuencia, mientras que el eje  $z$  representa la magnitud de los componentes presentes en la señal. Con base en la paleta de color, el rojo más intenso indica los componentes de mayor magnitud y por lo tanto, en el intervalo de 0 a 0.2 segundos se observan dos zonas de color rojo centradas en 10 y 100 Hz, aproximadamente. En el intervalo de 0.2 a 0.4 segundos aparece sólo una zona en rojo alrededor de los 10 Hz, el resto de la representación tiempo-frecuencia en ese intervalo de tiempo y hacia los 150 Hz presenta coeficientes de menor energía en el rango de colores amarillos y azules. ¿Cómo se interpreta la información en el intervalo de 0.4 a 0.6 segundos?

La forma clásica de obtener la representación tiempo-frecuencia, figura 4.21c, es vía la transformada de Fourier

de tiempo corto (TFTC). En la ecuación (4.33) se presenta la transformada de Fourier de tiempo continuo mientras que en la ecuación (4.34) se presenta la expresión matemática de la TFTC:

$$X(j\Omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-j\Omega t} dt \quad (4.33)$$

$$\text{TFTC}(\tau, j\Omega) = \int_{-\infty}^{\infty} [x(t)w^*(t-\tau)]e^{-j\Omega t} dt, \quad (4.34)$$

donde  $x(t)$  es la señal a transformar,  $e^{j\Omega t}$  representa el kernel o las funciones base de la transformación, y  $w(t)$  es la ventana de análisis. La TFTC en contraste con la  $X(j\Omega)$ , donde  $X(j\Omega)$  sólo depende de la frecuencia  $\Omega$ , depende de dos parámetros: la posición temporal de la ventana de análisis  $w(t)$ , que permite el análisis de  $x(t)$  alrededor del tiempo  $\tau$  y la frecuencia  $\Omega$ . La idea es obtener la transformada de Fourier en ventanas de tiempo de longitud pequeña y construir la imagen tiempo-frecuencia concatenando los resultados individuales. Sin embargo, en la práctica no es posible definir una ventana de tiempo muy corta debido a que, a pesar de generar una buena resolución en tiempo, la resolución en frecuencia se deteriora, a este compromiso se le conoce como principio de incertidumbre [25].

La TFTC permite un análisis tiempo-frecuencia; sin embargo, las funciones base o de representación de información en la ecuación (4.34) siguen siendo funciones seno y coseno de longitud infinita, lo que limita un análisis tiempo-frecuencia con mayor resolución. En este sentido se han propuesto diferentes alternativas de gene-

ración de la representación tiempo-frecuencia como la transformada de Wigner, Choi-Williams, bilineal y, en forma más reciente, el *empirical mode decomposition* (EMD) [25-27].

En nuestro grupo de investigación se ha analizado y se ha llegado a la conclusión de que la mejor representación tiempo-frecuencia para los sonidos respiratorios es la proporcionada por el EMD [27]. En la figura 4.22 se muestra la representación tiempo-frecuencia de un sonido adventicio conocido como crepitante grueso y sintetizado mediante un modelo matemático [27]. La figura muestra el resultado obtenido por la técnica clásica de TFTC y por el EMD. Como puede observarse en la figura, existe una mejor definición del comportamiento tiempo-frecuencia del crepitante por EMD, figura 4.22c, que por TFTC, figura 4.22b.

#### 4.5. Reconocimiento de patrones de sonidos respiratorios

En la subsección 4.4.3 se estableció que uno de los objetivos al parametrizar la señal acústica pulmonar es efectuar tareas de reconocimiento de patrones. En la figura 4.17, mediante el vector de características formado por los parámetros del modelo AR, se *clasifica* a la señal acústica como proveniente de un sujeto sano o enfermo. En el procesamiento de señales fisiológicas, una de las formas de obtener el *sistema de clasificación* de la figura 4.17 es mediante *redes neuronales artificiales* (RNA). En términos generales, una red neuronal es un procesador de información distribuido en forma paralela. Una RNA involucra numerosos elementos de procesamiento de información, llamados *neuronas artificiales*; éstas se utilizan para simular el funcionamiento de una neurona biológica y se interconectan para formar la red neuronal artificial.



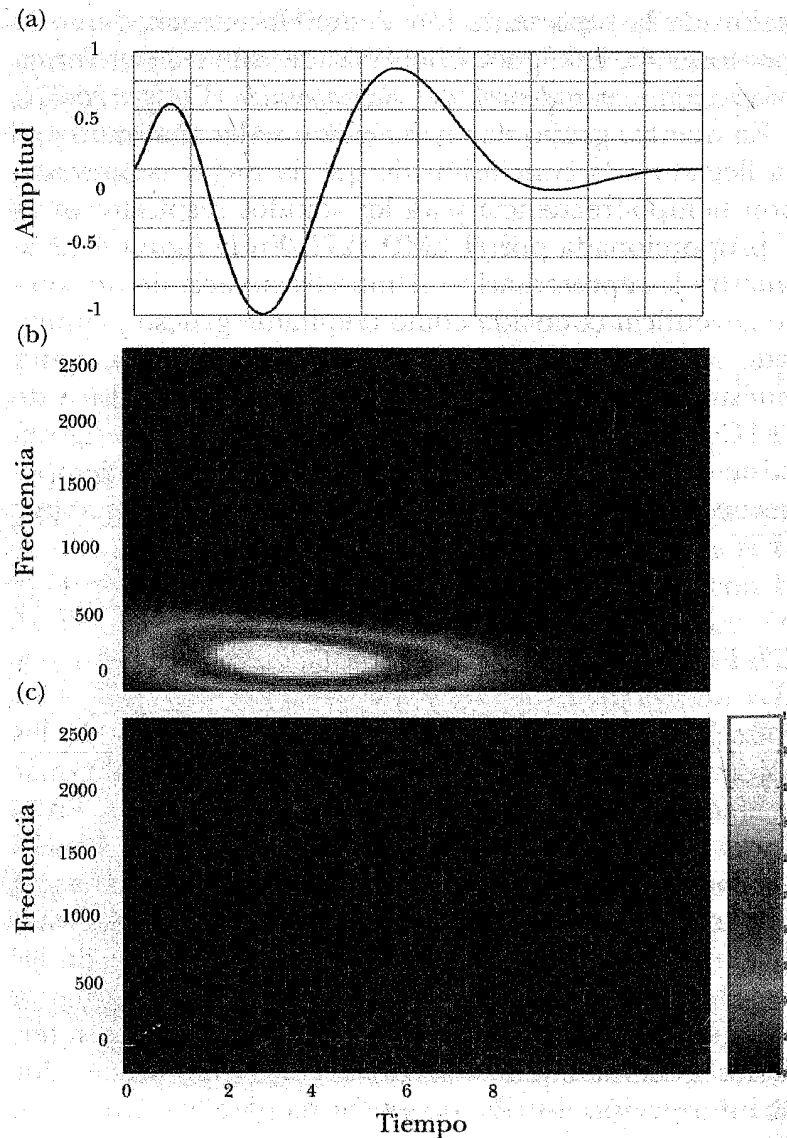


Figura 4.22. Representación tiempo-frecuencia de un sonido crepitante: (a) Señal adquirida, (b) representación tiempo-frecuencia mediante TFTC y (c) representación tiempo-frecuencia mediante EMD.

Las neuronas procesan la información a la entrada de la red, vector de características, o información local. La mayoría de las RNA poseen algún tipo de *regla de entrenamiento* mediante la cual se pondera la conexión entre neuronas; las conexiones interneuronales conocidas como *pesos sinápticos* se utilizan para almacenar *conocimiento*. Es decir, la RNA aprende de ejemplos y exhibe cierta capacidad para *generalizar* la información proporcionada por los datos de entrenamiento.

Con el propósito de comprender el funcionamiento de una RNA, sin profundizar en los aspectos teóricos, consideremos que una neurona está constituida por los elementos mostrados en la figura 4.23. Cada neurona recibe información a partir del vector de características o de otras neuronas  $\vec{x}$ , además cada entrada a la neurona es multiplicada por un factor de ponderación (pesos)  $\vec{w}$  y los productos entrada-peso son sumados. Finalmente, la salida del sumador pasa a través de una función de activación  $\phi$ , generalmente del tipo no lineal, que genera la salida de la neurona  $y_k$ , figura 4.24.

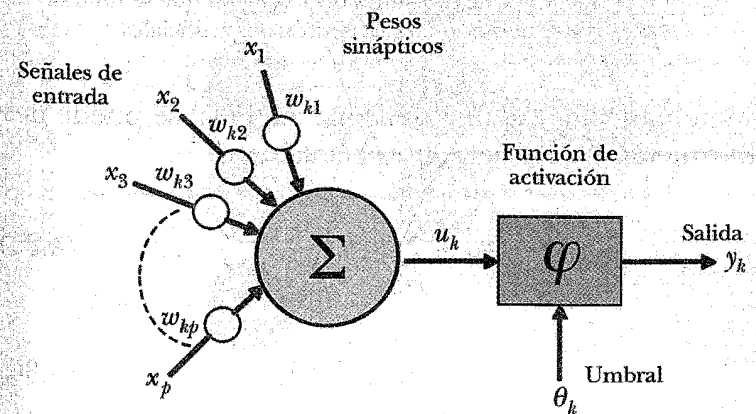


Figura 4.23. Elementos que constituyen a una neurona de una red de neurona artificial.

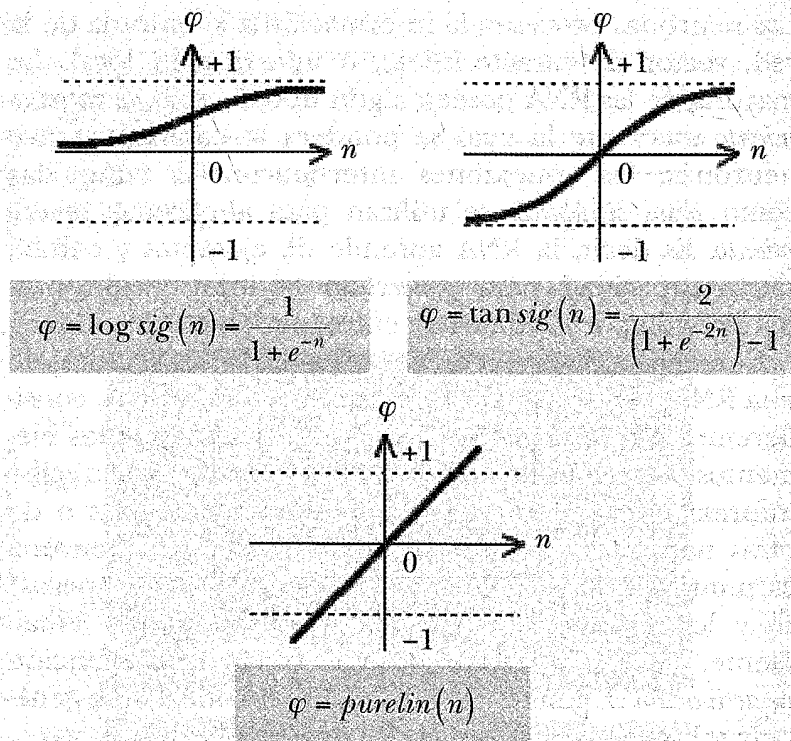


Figura 4.24. Ejemplos de funciones de activación que se utilizan en la construcción de redes neuronales artificiales.

Matemáticamente una neurona artificial se puede describir mediante las siguientes ecuaciones:

$$u_k = \sum_{j=1}^p w_{kj} x_j \quad (4.35)$$

$$y_k = \varphi(u_k - \theta_k), \quad (4.36)$$

donde  $x_j$  son los valores a la entrada de la neurona y  $w_{kj}$  son los pesos asociados con la neurona  $k$ -ésima. Además,

$u_k$  es la suma de los productos entrada-peso y  $y_k$  es la salida de la neurona  $k$ -ésima. El umbral  $\theta_k$  disminuye o incrementa el valor de entrada a la función de activación.

Las neuronas se interconectan para formar capas que posteriormente constituyen a la RNA. Para cierto tipo de RNA, la topología consiste de un conjunto de nodos de entrada, una o más capas ocultas y una capa de salida. Este tipo de redes se denominan *perceptrones multicapa*, figura 4.25.

En la figura 4.26 se presenta la taxonomía de seis redes neuronales que se utilizan frecuentemente para la clasificación de patrones. La taxonomía se divide inicialmente con base al tipo de entradas que aceptan las redes, esto es,

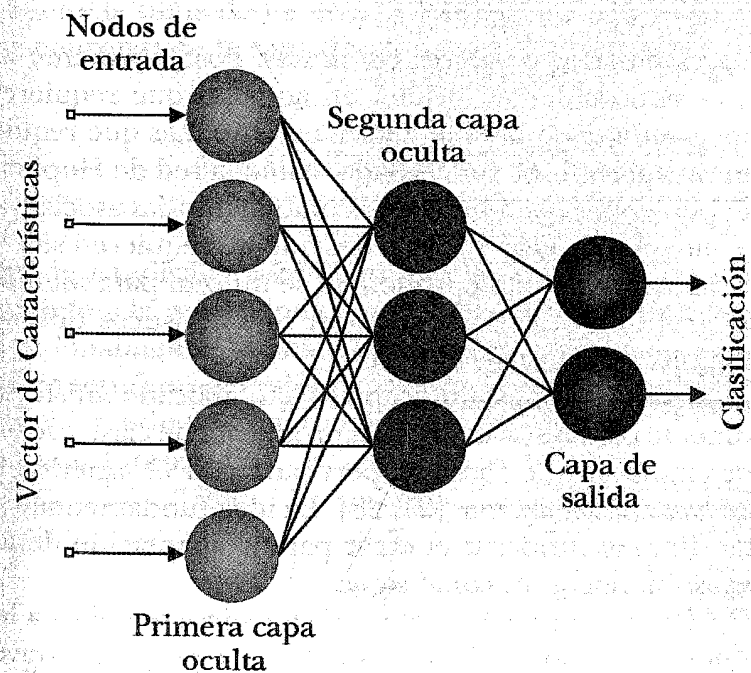


Figura 4.25. Topología de un *perceptrón multicapa* con dos capas ocultas.

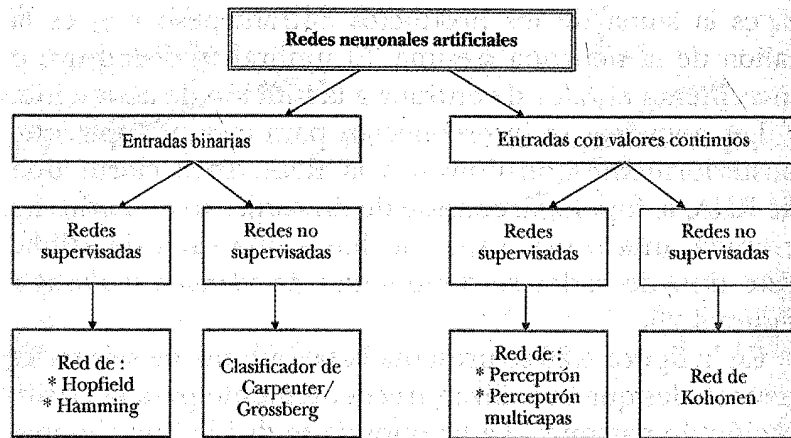


Figura 4.26. Clasificación de redes neuronales artificiales.

valores binarios o valores continuos. Posteriormente las redes neuronales se dividen en aquellas que requieren supervisión en la fase de entrenamiento. Las que requieren un aprendizaje supervisado, como la red de Hopfield y el perceptrón, son utilizadas como memorias asociativas o como clasificadores. Las redes que no requieren supervisión, como la red de Kohonen, se utilizan para identificar grupos (*clusters*) de vectores característicos que corresponden a un misma clase.

Los perceptrones multicapa se han aplicado satisfactoriamente para resolver diversos problemas de clasificación, entrenándolos de forma supervisada con el *algoritmo de retropropagación del error* [21, 28]. La idea fundamental del algoritmo al propagar el error para la adaptación de los pesos sinápticos, es como sigue:

a) Un patrón o vector de características se aplica a los nodos de entrada de la red y su efecto se propaga a través de la capas hacia la salida. Finalmente, un conjunto de salidas se produce como la respuesta actual de la red.

b) Los pesos sinápticos se ajustan con base al error entre la respuesta actual de la red y la respuesta deseada. El error se propaga hacia atrás de la red y se actualizan los pesos de las diferentes capas.

Los pesos sinápticos  $w_{ji}$  de la RNA se obtienen minimizando una función de costo. Si  $d$  es la salida actual y  $y$  es la respuesta deseada de una neurona en la capa de salida, entonces el error  $e$  en la neurona  $j$ -ésima, en la iteración  $n$ -ésima, se define como:

$$e_j(n) = d_j(n) - y_j(n). \quad (4.37)$$

Al aplicar un patrón de entrenamiento a la RNA, se obtiene la suma de los errores cuadráticos generado por las neuronas de la capa de salida, es decir:

$$\varepsilon(n) = \frac{1}{2} \sum_{j \in C} e_j^2(n), \quad (4.38)$$

donde  $n$  indica el  $n$ -ésimo patrón de entrenamiento presentado a la red y  $j$  indica una neurona de salida específica. Finalmente, la función de costo a minimizar se define en términos del valor promedio de la ecuación (4.38), considerando un conjunto de entrenamiento de tamaño  $N$ , de la forma:

$$J = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \varepsilon(n). \quad (4.39)$$

En el *proceso de aprendizaje* se tiene como objetivo determinar los pesos  $w_{ji}$  de cada neurona de la RNA que

minimicen la función de costo de la ecuación (4.39). En forma similar al procedimiento establecido en el modelado paramétrico de una señal, es necesario obtener las derivadas parciales de la ecuación (4.38) con respecto de los pesos  $w_{ji}$ .

Nótese que  $(\partial \varepsilon(n)) / (\partial w_{ji}(n))$ , utilizando la notación de la figura 4.23 y aplicando la regla de la cadena, se puede expresar en términos de:

$$\frac{\partial \varepsilon(n)}{\partial w_{ji}(n)} = \frac{\partial \varepsilon(n)}{\partial e_j(n)} \frac{\partial e_j(n)}{\partial y_j(n)} \frac{\partial y_j(n)}{\partial u_j(n)} \frac{\partial u_j(n)}{\partial w_{ji}(n)}, \quad (4.40)$$

donde:

$$u_j(n) = \sum_{i=0}^p w_{ji}(n) x_i(n) \quad (4.41)$$

$$y_j(n) = \varphi_j(u_j(n)). \quad (4.42)$$

En la ecuación (4.41) el parámetro  $p$  indica el número total de entradas que se aplican a la neurona  $j$ -ésima. En el procedimiento de minimización de  $J$  es necesario determinar cada una de las derivadas parciales de la ecuación (4.40). Nótese por ejemplo, que de esta ecuación el término  $(\partial u_j(n)) / (\partial w_{ji}(n))$  se puede obtener de la ecuación (4.41) como:

$$\frac{\partial u_j(n)}{\partial w_{ji}(n)} = x_i(n).$$

Se puede demostrar que [29]:

$$\frac{\partial \varepsilon(n)}{\partial w_{ji}(n)} = -e_j(n) \varphi_j'(u_j(n)) x_i(n). \quad (4.43)$$

Los pesos de la RNA se ajustan iterativamente con base a un valor proporcional del gradiente descendente, de la forma:

$$\Delta w_{ji}(n) = -\eta \frac{\partial \varepsilon(n)}{\partial w_{ji}(n)}, \quad (4.44)$$

donde  $\eta$ , controla la velocidad de descenso del gradiente y en consecuencia, la razón de aprendizaje [29].

Es posible derivar las expresiones para el ajuste de los pesos en las capas ocultas para las cuales no existe una señal deseada  $d$ . Se recomienda al lector revisar la referencia [29] para profundizar en el tema del algoritmo de retropropagación.

Para obtener un buen desempeño del clasificador es importante considerar aspectos como: ¿cuándo terminar el proceso de entrenamiento? y ¿es adecuada la generalización de la red? Para responder a estas preguntas los vectores de características se dividen en vectores de entrenamiento, prueba y validación de acuerdo al método de validación cruzada. Con relación a la fase de entrenamiento existen tres condiciones para decidir cuándo detenerla:

1. Se alcanza un error predeterminado.
2. El ajuste sucesivo de los pesos es mínimo.
3. La RNA clasifica adecuadamente todos los vectores de características de entrenamiento.

El concepto de *generalización* de la RNA está relacionado con las salidas correctas de ésta en la clasificación de vectores de características que no han sido procesados por la red en la etapa de entrenamiento y que pertenecen al conjunto de prueba. La generalización de una red depende de tres elementos importantes: el tamaño del conjunto de vectores de características de entrenamiento, la topología de la RNA, y la complejidad del problema de clasificación. Para seleccionar la mejor RNA de un conjunto de arquitecturas posibles es necesario evaluar el error alcanzado con el conjunto de validación durante el proceso de entrenamiento. Normalmente, el error de validación decrece durante la fase inicial de entrenamiento, al igual que el error obtenido con el conjunto de entrenamiento. Sin embargo, si la red comienza a sobreajustar los vectores de características, el error se incrementa con el conjunto de validación. Si esto último sucede para un número de iteraciones se sugiere detener el entrenamiento.

Posteriormente, y una vez seleccionada la mejor arquitectura, la generalización se evalúa con el conjunto de prueba. En la figura 4.27 se presenta la curva de aprendizaje de una RNA y se observa que con el conjunto de entrenamiento la red se desempeña muy bien; sin embargo, el error se incrementa al evaluar la red con los conjuntos de validación y prueba.

En la clasificación de sonidos respiratorios se ha utilizado una RNA, formando los vectores de características con las frecuencias al 25, 50, 75, 90, 95 y 99 por ciento del área total bajo la curva del espectro de potencia. Se concatenaron los valores de las frecuencias percentiles de 25 canales de sonido respiratorio adquirido para formar el vector de características de entrada de la RNA, con dimensión de  $150 \times 1$ . La topología de la RNA fue de 150

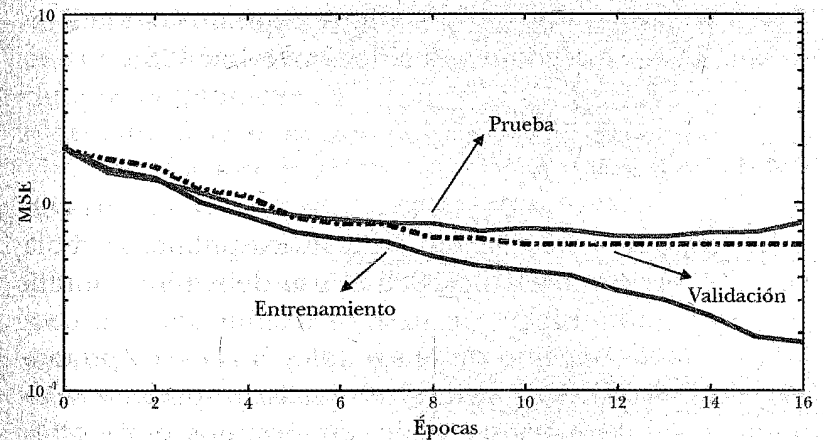


Figura 4.27. Error cuadrático medio (MSE) de las curvas de entrenamiento, prueba y validación para una RNA.

nodos de entrada, 20 neuronas en la primera capa oculta, 10 neuronas en la segunda capa oculta y una neurona en la capa de salida; en esta aplicación únicamente se intenta clasificar si la información acústica proviene de un sujeto sano o enfermo.

Para el caso de la clasificación del sonido respiratorio (sano o enfermo) mediante los parámetros del modelo AR se procedió de la forma siguiente: las fases inspiratorias de cada uno de los 25 canales adquiridos se dividieron en 30 ventanas de tiempo y en cada ventana, se aplicó un modelo AR de cuarto orden. Los coeficientes del modelo AR se concatenaron para formar vectores de características de dimensión  $100 \times 1$ . La topología de la RNA que generó el menor MSE se constituyó de la forma siguiente: 100 nodos de entrada, 20 neuronas en la primera capa oculta, 10 neuronas en la segunda capa oculta y una neurona en la capa de salida. El grupo de investigación de la UAMI ha generado otras aplicaciones con



base a la clasificación de los sonidos respiratorios mediante una RNA. Se recomienda al lector revisar [28].

#### 4.6. Visualización

El grupo de investigación en acústica pulmonar de la UAMI propuso en el año 2002 el uso de sistemas multicanales de adquisición de sonidos respiratorios en conjunto con el concepto de imagenología acústica pulmonar [30]. La idea es facilitar el análisis espacial y temporal de la información acústica en términos, entre otras características, de la magnitud de los sonidos con relación a la posición del micrófono y a la fase respiratoria. La visualización de los sonidos respiratorios mediante imágenes acústicas es de ayuda para estudiar de forma no invasiva la relación de la distribución de los sonidos con la ventilación pulmonar, tanto en sujetos sanos como en enfermos. El objetivo de la imagenología acústica es la exploración y evaluación de los patrones acústicos generados espacialmente por los sonidos respiratorios en diferentes condiciones respiratorias.

Es importante mencionar que la intensidad del sonido respiratorio se ha relacionado con el grado de ventilación de una zona pulmonar [31]. De hecho, se acepta clínicamente que una zona bien ventilada produce un sonido respiratorio de magnitud considerable. La imagen acústica obtenida por el procesamiento de los sonidos adquiridos de forma multicanal proporciona una imagen de tipo *funcional* que se correlaciona con la imagen estándar en la valoración de la ventilación, la imagen centellográfica.

En nuestro grupo de investigación se captura el sonido respiratorio mediante un arreglo de micrófonos de cinco renglones por cinco columnas, figura 4.2b, con una dis-

tancia entre sensores que se ajusta a las características antropométricas del sujeto, con el propósito de cubrir sus campos pulmonares. Para generar la imagen acústica 2D o de superficie se utiliza un interpolador determinístico [14, 32]. La interpolación es un proceso que permite determinar valores intermedios de una curva, una función o una superficie, a partir de información parcial conocida. En el caso de los sonidos respiratorios, es necesario estimar los datos entre los micrófonos en el arreglo propuesto de  $5 \times 5$  sensores. Dado que existen varios tipos de funciones de interpolación, por ejemplo la lineal, el *spline* cúbico, la Hermite, etcétera; es importante seleccionar el interpolador adecuado para representar la información acústica. Una de las formas de realizar esta selección es insertar sensores adicionales al arreglo de  $5 \times 5$  sensores de tal forma que los valores interpolados para las posiciones de los sensores añadidos generen un error cuadrático medio entre la información acústica medida y la interpolada. Este procedimiento permitió definir que el interpolador Hermite es el más adecuado en la generación de las imágenes acústicas respiratorias [14].

Una de las funciones matemáticas conocidas para la interpolación determinística, es decir, la que necesariamente pasa por los datos, son los polinomios algebraicos de la forma:

$$P_n(x) = a_0 + a_1x + \dots + a_nx^n, \quad (4.45)$$

con  $n \in \mathbb{Z}^+$ ,  $a_0 \dots a_{ni}$  constantes por determinar, y  $x$  valores en 1D en el intervalo  $[a, b]$ . Sin embargo, dadas las limitaciones para ajustar un solo polinomio a un conjunto de datos, surgió la posibilidad de realizar dicho ajuste en segmentos, por pares de datos, los llamados polinomios

segmentarios. En este caso, si la función a interpolar cumple con  $f \in C^1$  en el intervalo  $[a, b]$  y los datos a interpolar  $x_i, x_{i+1} \in [a, b]$  son distintos; el único polinomio de grado  $2n + 1$  que coincide con la función  $f$  y su derivada  $f'$  en los puntos  $x_i$  y  $x_{i+1}$  es:

$$H_{2n+1}(x) = \sum_{j=0}^n f(x_j)H_{n,j}(x) + \sum_{j=0}^n f'(x_j)\hat{H}_{n,j}(x),$$

donde si  $n = 1$ ,  $H_{2n+1}(x) = H_3(x)$  corresponde al polinomio segmentario Hermite [32]. El concepto de interpolación en 1D se puede extender a 2D mediante la interpolación separable en cada dimensión.

En la figura 4.28 se indica el procedimiento de formación de la imagen acústica de superficie donde el punto de inicio es la información acústica adquirida en forma multicanal, figura 4.28a, y la selección de una ventana temporal alrededor, en este ejemplo, del máximo del flujo respiratorio. Posteriormente, con la información de magnitud promedio por cada canal se forma la matriz de datos de la figura 4.28b. Finalmente, se forma la imagen acústica mediante la interpolación 2D de la información en la matriz de figura 4.28b.

A la imagen de la figura 4.28c, correspondiente a la espalda del sujeto, se le asocia una paleta de color para la interpretación de la información. De esta forma el color negro indica un silencio acústico mientras que el rojo más intenso revela un sonido respiratorio de máxima intensidad.

Es posible visualizar en la figura 4.28c dos siluetas cuya distribución se asemeja a los campos pulmonares. Así también se observa una zona oscura al centro de la imagen que concuerda anatómicamente con la columna vertebral del sujeto.

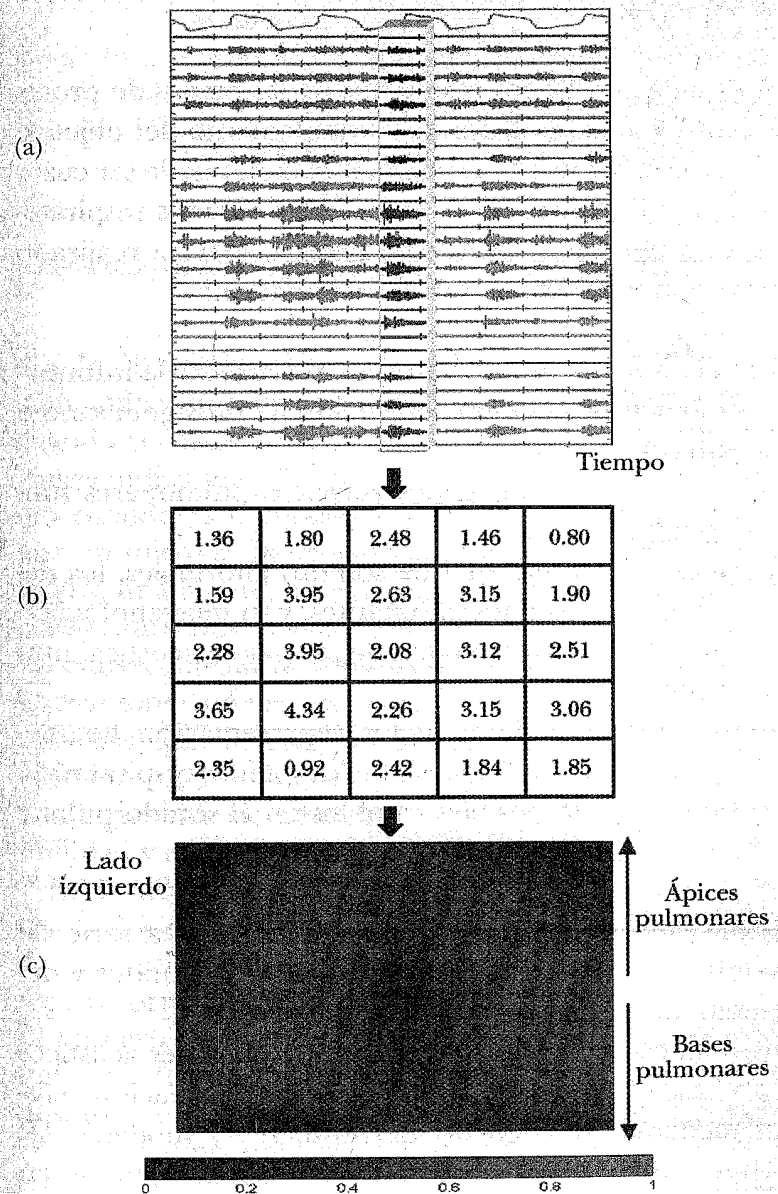


Figura 4.28. Proceso de formación de la imagen acústica de superficie, mediante la interpolación 2D de la información acústica multicanal.

#### 4.7. Validación

La validación de los resultados de las etapas de procesamiento y análisis depende evidentemente del objetivo de la investigación en curso; la validación puede ser cuantitativa o cualitativa. En el caso de los sonidos respiratorios, el grupo de investigación de la UAMI ha realizado diversas tareas entre las que se encuentran:

- a) Reconocimiento de patrones al clasificar la información acústica como proveniente de un sujeto sano o enfermo.
- b) Formación de imágenes acústicas pulmonares funcionales.
- c) Detección multicanal de sonidos anormales, los denominados sonidos crepitantes, y su imagenología.
- d) Análisis de la variabilidad de la imagen acústica intra e inter-sujetos.
- e) Identificación de la mejor representación tiempo-frecuencia para el análisis de los sonidos respiratorios.
- f) Detección de posibles cambios en el sonido pulmonar de base, en salud y enfermedad.

Para cada una de ellas se ha definido una serie de medidas de validación de los resultados obtenidos y del desempeño de las metodologías propuestas.

Para el caso del reconocimiento de patrones acústicos y con base en la parametrización de la información acústica mediante frecuencias percentilares y modelos AR monocanal y multicanal, la validación se ha realizado en términos de medidas estadísticas para la clasificación binaria. Las medidas son las siguientes:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivo verdadero}}{\text{Positivo verdadero} + \text{Negativo falso}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativo verdadero}}{\text{Negativo verdadero} + \text{Positivo falso}} \times 100$$

$$\text{Diagnóstico de desempeño} = \frac{\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad}}{2}$$

donde el término *positivo verdadero* para nuestra aplicación indica que un sujeto se ha clasificado como sano cuando verdaderamente es sano, el término *negativo verdadero* indica que el sujeto se ha clasificado como enfermo cuando es enfermo, el término *negativo falso* indica que un sujeto se ha clasificado como enfermo cuando es sano y, finalmente, el término *positivo falso*, cuando se ha clasificado como sano, pero se trata de un enfermo. En consecuencia, la sensibilidad mide la proporción de sujetos sanos que se identifican correctamente como tal, mientras que la especificidad mide la proporción de enfermos que se identifican correctamente. La medida de diagnóstico de desempeño considera la suma de sensibilidad y especificidad.

En la tabla 4.1 se muestra a manera de ejemplo los resultados obtenidos con el modelo AR monocanal para la clasificación de información acústica. Obsérvese el reglón correspondiente a la fase de validación de la RNA. El número de patrones o vectores de características (N) utilizados fue de 114 de los cuales 53 se clasificaron como positivos verdaderos (S-S), 56 como negativos verdaderos (E-E), 3 como positivos falsos (S-E), 1 como negativo falso (E-S), y 1 vector no clasificado. En consecuencia, la sensibilidad indica que existe una probabilidad del 0.98 de detectar a un sujeto sano cuando es sano. Para este

tipo de validación es necesario la participación de un médico especialista quien establece *a priori* la condición pulmonar de un sujeto con base en la auscultación pulmonar, historia clínica, pruebas de función respiratoria, imagenología y otros estudios.

Tabla 4.1.

MEDIDAS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y DESEMPEÑO PARA LA CLASIFICACIÓN DE SONIDOS RESPIRATORIOS

VC (100X1)	N	S-S	E-E	S-E	E-S	N.C.	SEN %	ESP %	DES %
Entrenamiento	912	456	456	0	0	0	100	100	100
Prueba	114	53	55	3	1	2	98.15	94.83	96.49
Validación	114	53	56	3	1	1	98.15	94.92	96.53

En el caso de la formación de imágenes acústicas pulmonares funcionales uno de los aspectos primordiales a investigar fue el tipo de interpolador determinista que constituía la mejor opción para la representación como una imagen de los sonidos respiratorios. Para validar el desempeño de los algoritmos de interpolación se utilizó un arreglo de 25 micrófonos *generadores de la imagen* acústica distribuidos en forma homogénea en la superficie torácica posterior. Adicionalmente, se incluyeron cuatro micrófonos *de validación* entre los micrófonos del arreglo anterior con el propósito de obtener medidas estadísticas entre el valor interpolado y el valor medido por el micrófono de validación. Los micrófonos de validación se localizaron en las zonas pulmonares donde el sonido respiratorio es de mayor intensidad: las zonas basales pulmonares. En el proceso de validación se determinó, por ejemplo, la varianza residual normalizada [14, 32], medida que representa la inexactitud del interpolador y que se define de la forma:

$$nr\upsilon = \frac{\sigma_r^2}{\sigma_{mes}^2},$$

donde  $\sigma_r^2$  representa la varianza del error generado entre el valor medido por el micrófono de validación y el valor interpolado y  $\sigma_{mes}^2$  representa la varianza del valor medido. En la tabla 4.2 se muestra el valor de *nrυ* para diferentes funciones interpolantes. El valor ideal de *nrυ* debe ser cero y como puede observarse de la tabla 4.2, el menor valor de *nrυ* corresponde a la función Hermite. Con base en los resultados obtenidos a partir de todas las medidas estadísticas utilizadas en el proceso de validación, se seleccionó el interpolador tipo Hermite para la generación de las imágenes acústicas.

Tabla 4.2

VARIANZA RESIDUAL NORMALIZADA (NRV) PARA LA VALIDACIÓN DE LA FORMACIÓN DE IMÁGENES ACÚSTICAS PULMONARES

Fase Respiratoria	Función Interpolante	<i>nrυ</i>
Inspiratoria	Spline	0.213
	Lineal	0.165
	Hermite	0.146
	Neville	0.287
	Vecinos Próximos	0.339
Espiratoria	Spline	0.265
	Lineal	0.213
	Hermite	0.192
	Neville	0.336
	Vecinos Próximos	0.405

Para el caso de la detección de sonidos anormales (crepitancias) y su representación por medio de una imagen, se utilizaron señales simuladas de sonido pulmonar multicanal. Es decir, mediante un modelo matemático se simularon señales de sonido anormal (crepitancias) y se

combinaron linealmente con señales de sonido respiratorio provenientes de un sujeto sano. El crear un escenario simulado con sonidos pulmonares tiene la ventaja de controlar parámetros tales como: la relación señal (*sonido crepitante*) a ruido (*sonido respiratorio de base*), el número de crepitancias, su traslape temporal, y la zona pulmonar enferma. Considerando que el objetivo es crear una imagen que sea representativa del número de sonidos crepitantes, es necesario comparar la imagen obtenida por la metodología, con una imagen patrón. Nótese que la simulación de sonidos pulmonares provenientes de un sujeto enfermo permite la generación de la imagen acústica patrón. La validación se obtiene al determinar el error entre el número de crepitantes de la imagen patrón y el número de crepitantes estimado por la metodología. En la figura 4.29 se muestra un ejemplo de la imagen patrón y la imagen generada por la estimación del número de crepitancias por canal.

Otra forma de validar las imágenes de sonidos adventicios, y que el grupo de investigación de la UAMI ha realizado, es solicitarle a un médico especialista en sonidos respiratorios que cuente el número de sonidos crepitantes en señales simuladas, aplicando su experiencia y el método clásico de TEWA. Este tipo de validación genera los datos que se muestran en la tabla 4.3, donde se reporta el valor promedio y la varianza en la estimación del número de sonidos crepitantes. En la validación se generaron señales respiratorias simuladas con cinco fases inspiratorias e insertando en cada fase, en dos posiciones sobre la pared posterior del tórax, 6 y 10 crepitancias respectivamente. Se puede observar que la metodología propuesta estimó en forma adecuada el número de sonidos, mientras que el experto presentó problemas en la detección de los sonidos anormales.

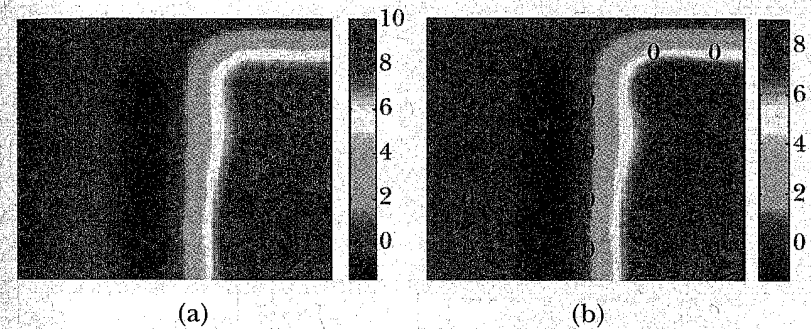


Figura 4.29. (a) Imagen patrón con un máximo de 10 crepitancias insertadas en la zona basal derecha. (b) Imagen obtenida mediante la estimación del número de crepitancias por canal.

Tabla 4.3  
CAPACIDAD DE DETECCIÓN DEL NÚMERO DE CREPITANTES  
ENTRE LA METODOLOGÍA PROPUESTA Y UN MÉDICO EXPERTO

Posición del sensor acústico	Número de crepitancias insertados	Número estimado por la metodología	Número estimado por el experto
PRC2 (n = 5 fases inspiratorias)	6	5.6 ± 0.6	2.0 ± 1.8
PLX4 (n = 5 fases inspiratorias)	10	10.2 ± 1.1	2.7 ± 1.9

En el caso del análisis de la variabilidad de la imagen acústica intra e inter-sujetos, la validación se basa en el resultado de la comparación entre dos imágenes. Existen diversas formas de medir la similitud entre dos imágenes. La medida de similitud tradicional para evaluar la proximidad del contenido de una imagen con otra es la información mutua de Cauchy-Schwartz definida en términos de la siguiente ecuación:



$$I_{CS}(X, Y) = D_{CS}(f_{XY}(x, y), f_X(x)f_Y(y)),$$

donde

$$D_{CS}(f, g) = \frac{\left( \int_{-\infty}^{\infty} f(x)^2 dx \right) \left( \int_{-\infty}^{\infty} g(x)^2 dx \right)}{\left( \int_{-\infty}^{\infty} f(x)g(x) dx \right)^2}$$

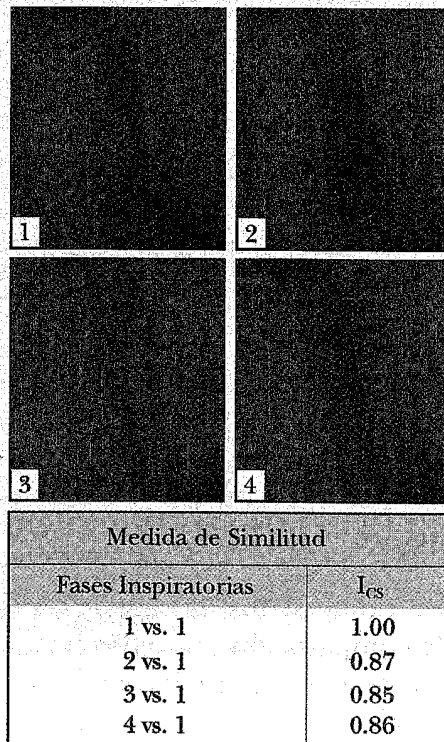


Figura 4.30. Medidas de similitud de imágenes acústicas de un mismo sujeto para cuatro fases inspiratorias.

y  $f_{XY}(x, y)$  es la función de densidad conjunta, mientras que  $f_X(x)$  y  $f_Y(y)$  representan las funciones marginales.

En la figura 4.30 se presenta la medida de similitud de imágenes acústicas obtenidas en cuatro fases inspiratorias para un mismo sujeto. Como puede observarse, de los valores de  $I_{CS}$  existe una alta repetibilidad de la distribución del sonido respiratorio en la pared torácica.

Como se ha mencionado el tipo de validación depende del objetivo del procesamiento y análisis realizado, y en el caso del procesamiento de señales e imágenes biomédicas con frecuencia se requiere de un grupo de expertos médicos cuya tarea es proporcionar información que se considere patrón o referencia para la validación de los resultados de una metodología específica.

#### REFERENCIAS

1. Laënnec R. T. H., *L'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur, fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration*, Brosson et Chaudé, París, 1819.
2. Loudon R. G., *The lung Exam. In Pulmonary signs and symptoms, Clinics in Chest Medicine*, vol. 8, núm. 2, 265-272, 1987.
3. Forgacs P., *Lung Sounds*, Bailliére Tindall, Londres (1978).
4. Loudon R. G., *Lung Sounds, Current Pulmonology* 9, 67-96, 1988.
5. Berg R. E., y Stork D., *The physics of sound*, 3ª edición., Prentice Hall (2004).
6. Rossing T. D., Moore R. F. y Wheeler P. A., *The science of sound*, 3ª edición, Addison-Wesley (2001).
7. <http://hyperphysics.phyastr.gsu.edu/hbasees/hph.html#ahph>. HyperPhysics (©C.R. Nave, 2006).
8. Grotberg J., *Respiratory fluid mechanics and transport processes, Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 3, pp. 421-457, 2001.
9. Hardy J. C. y Patterson J. L., *Monitoring the state of the human airways by analysis of respiratory sounds, Acta Astronautica*, 6, pp. 1137-1151, 1979.

10. Kraman S. S., *Lung Sounds. Seminars in Respiratory Medicine*, 6, núm. 3, 155-242, 1985.
11. Gabriely N. y Cugell D. W., *Breath sounds methodology*, CRC Press Inc. (1995).
12. Pasterkamp H., S. S. Kraman, G. Wodicka, *Respiratory sounds: Beyond the stethoscope, American Journal of Respiration and Critical Care in Medicine*, 156, 974-987, 1997.
13. ERS Task Force Report. *Computerized Respiratory Sound Analysis (CORSA): recommended standards for term and techniques*, A. R. A. Sovijärvi, J. Vanderschoot y J. E. Earis, editores *European Respiratory Review* 10, núm. 77, 581-649.
14. Charleston-Villalobos S., Cortés-Rubiano S., González-Camarena R., Chi-Lem G., Aljama-Corrales T., *Respiratory acoustic thoracic imaging (RATHI): assessing deterministic interpolation techniques, Medical & Biological Engineering & Computing*, 42, núm. 5, 618-626, Septiembre 2004.
15. Oppenheim A. V. y Schafer R. W., *Discrete-time signal processing*, Prentice Hall, Nueva Jersey (1989).
16. Kamen E. W. y Heck B. S., *Fundamentals of signals and systems using matlab*, Prentice Hall, Nueva Jersey (1997).
17. Charleston-Villalobos S., González-Camarena R., Chi-Lem G., Aljama-Corrales T., *Crackle sounds analysis by empirical mode decomposition, IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 26, núm. 1, 40-47, Enero/Febrero 2007.
18. Murphy R. L., Holford S. K., Knowler W. C., *Visual lung sound characterization by time-expanded waveform analysis, N. England. J. Med.*, 296, núm. 17, 968-971, 1977.
19. Stark H. y Woods J. W., *Probability, random processes, and estimation theory for engineers*, segunda edición, Prentice Hall, Nueva Jersey (1994).
20. Ljung L., *System identification theory for the user*, Prentice Hall, Nueva Jersey (1987).
21. Martínez-Hernández G. E., *Evaluación acústica de las neumopatías intersticiales difusas utilizando análisis multicanal*, Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Biomédica, UAM-I (2006).
22. Martínez-Hernández H. G., Aljama-Corrales T., González-Camarena R., Charleston-Villalobos S., Chi-Lem G., *Computerized classification of normal and abnormal lung sounds by multivariate linear autoregressive model, Proc. 27th Annual Int. Conf., IEEE Engineering in Medicine & Biology Society*, 1464-1467, Shanghai, China, 2005.
23. Charleston-Villalobos S., Domínguez-Robert L. F., González-Camarena R., Aljama-Corrales T., *Heart sounds interference cancellation in lung sounds, Proceedings 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1694-1697, Nueva York, EUA, 2006.
24. Hossain I., Mousavi Z., *An overview of heart sound reduction of lung sounds using wavelet transform based filter*, *Proceedings 25th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 458-461, Cancún, México, 2003.
25. Cohen L., *Time-frequency analysis*, Prentice Hall, Nueva Jersey, 1995.
26. Huang N E., *The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-Stationary times series analysis, Proc. Royal Soc. Lond. A*, 454, 903-995, 1988.
27. Reyes B. A., Charleston-Villalobos S., González-Camarena R., Aljama-Corrales T., *Analysis of discontinuous adventitious lung sounds by Hilbert-Huang spectrum, Proceedings 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 362036-23, Vancouver, Canadá, 2008.
28. Dorantes-Méndez G., Charleston-Villalobos S., González-Camarena R., Chi-Lem G., Aljama-Corrales T., *Imaging of simulated crackle sounds distribution on the chest, Proceedings 30th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 4801-04, Vancouver, Canadá, 2008.
29. Haykin S., *Neural networks: a comprehensive foundation*, Macmillan College Publishing Co., Nueva York (1994).
30. Charleston-Villalobos S., González-Camarena R., Castellanos-Abrego P., Aljama-Corrales T., *Multichannel computerized phonopneumography, 27th Annual Conference of the International Lung Sounds Association (ILSA)*, Estocolmo-Helsinki, Septiembre 2002.
31. Ploy-Song-Sang Y., *Lung sounds as indices of ventilation, Sem. Respir. Med.*, 6, 192-200, 1985.
32. Cortés-Rubiano S., *Imagenología acústica pulmonar*, Tesis de Maestría en Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa (2001).

W 281807

## CAPÍTULO 22 REDES COMPLEJAS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

OCTAVIO MIRAMONTES VIDAL\*  
*Instituto de Física*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

### I. INTERACCIONES Y REDES

En todo el universo conocido, la materia tiene una tendencia hacia la interacción. Un objeto que accidentalmente se nos cae al piso, cae debido a la interacción de su masa con la masa de la Tierra. Se trata de una interacción gravitatoria donde ambas masas se atraen mutuamente de acuerdo a como lo describe la *Ley de Gravitación Universal* de Newton. El estudio de las interacciones de tipo mecánico, eléctrico, nuclear, etcétera; son el pan de todos los días para los físicos; pero no sólo la materia inanimada interactúa entre sí, obviamente también lo hace la materia viva. Los seres vivos interactúan tanto con los objetos inanimados como con otros seres vivos. Así, un león en la sabana africana puede llegar a comerse a una cebra en un proceso que llamaríamos una "interacción ecológica". Otro ejemplo serían dos conejos que interactúan sexualmente para reproducirse.

Desde tiempo atrás, en el estudio de las interacciones se ha acostumbrado representarlas en diagramas, dibujadas en forma de redes. Estas redes están formadas por

\* octavio@fisica.unam.mx

los nodos y los enlaces. Los nodos son los objetos o entidades que interactúan y los enlaces representan las interacciones (ver figura 1).

Hasta hace relativamente poco, el estudio matemático de las redes se reducía al estudio de sus propiedades estadísticas, tales como número de nodos, número de enlaces, número promedio de enlaces por nodo, etcétera. También era común la clasificación de las redes según la topología, tales como redes distribuidas, redes ordenadas, redes desordenadas, etcétera. Se hicieron grandes avances en el estudio de las redes desordenadas, también llamadas aleatorias y en el de las redes ordenadas; pero poco se sabía de aquellas redes que están entre estos dos extremos, es decir, las redes que tienen un cierto grado de orden y un cierto grado de desorden. Además, prácticamente nada se podía hacer formalmente cuando se pretendía el estudio de la dinámica y evolución de las redes, ni de las propiedades globales que emergían del proceso de las interacciones locales. El panorama cambió radicalmente cuando, en 1998, Duncan Watts y Steven Strogatz, de las universidades de Columbia y Cornell en los Estados Unidos, publicaron un trabajo en la revista

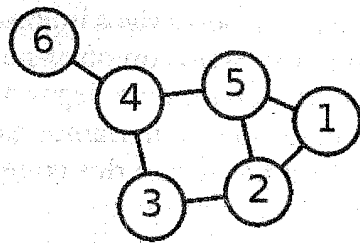


Figura 1. Ejemplo de una red. Las bolas numeradas del uno al seis representan los nodos y las líneas los enlaces entre los nodos que, a su vez, representan las conexiones o las interacciones entre los nodos. Fuente: wikimedia.org.

*Nature* [1] donde explicaron las propiedades globales de redes que no son totalmente desordenadas ni totalmente ordenadas. Ambos científicos mostraron matemáticamente el concepto de “mundo pequeño” en este tipo de redes, término de gran importancia que debemos explicar ahora mismo.

## 2. EL MUNDO PEQUEÑO EN LAS REDES SOCIALES

Se dice comúnmente que el escritor húngaro Frigyes Karinthy es el autor de un reto mediante el cual demandó que se le mostrara una sola persona en todo el mundo, la cual no estaría conectada a él mediante, al menos, otras cinco personas [2]. Esta es posiblemente la primera formulación de un problema de conexión de redes sociales conocido como “seis grados de separación”. Inspirado por el trabajo teórico sobre redes sociales de sus colegas de la Universidad de París, el psicólogo social estadounidense Stanley Milgram decidió llevar a cabo un experimento para medir la distancia promedio entre dos personas que no se conocen, midiendo el número de personas intermedias que se necesitan para conectarlos. El experimento tuvo lugar a inicios de la década de los años sesenta y sus resultados fueron publicados en la revista *Psychology Today* en 1967 [3]. Básicamente, Milgram se planteó investigar si personas seleccionadas al azar como “puntos de partida” podrían hacer contacto con una persona específica; pero desconocida, haciendo uso solamente de sus propias redes de amistades. Para ello, realizó dos estudios separados. En ambos, la persona específica se ubicaba en Boston. Las ciudades de los puntos de partida fueron Omaha, en el estado de Nebraska, y Wichita, en el estado de Kansas. Milgram envió varias cartas a cierto

número de personas seleccionadas al azar en ambas ciudades y les pidió que las cartas las hicieran llegar a una persona previamente seleccionada y desconocida para estos individuos. Las cartas debían ser “enviadas” mediante la red de conocidos, sin uso del correo normal, es decir, pasándolas de mano en mano a conocidos que estuvieran en mejor posibilidad de conocer al destinatario. Milgram encontró que se necesitaban entre dos y diez personas para completar el objetivo dando un promedio de 5.5 personas intermediarias. Dado el número tan reducido de personas que son necesarias para conectar cualquier persona en el mundo con otra desconocida, el fenómeno fue bautizado como “mundo pequeño” o “seis grados de separación”. Este experimento se ha reproducido recientemente usando medios modernos como correos electrónicos o las redes de amistades en las redes sociales de la Internet. En todos los casos se han obtenido valores promedio de entre 5 y 6 intermedios (ver figura 2).

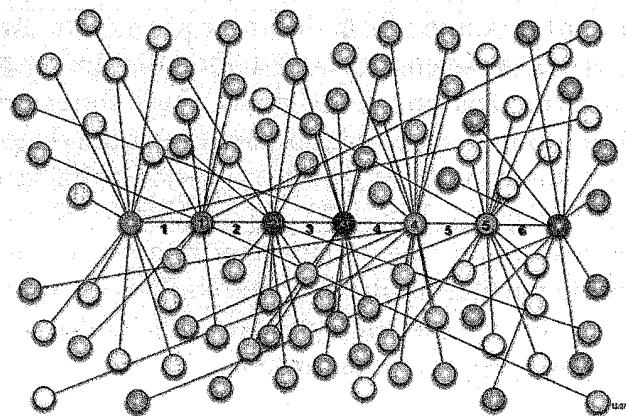


Figura 2. Ejemplo de una red social, donde se exhiben los seis enlaces que separan a dos nodos, o dos personas desconocidas entre sí.

Fuente: wikimedia.org.

¿Cuál es la explicación de este curioso fenómeno? Podemos desarrollar un argumento muy básico como primera aproximación al problema. Nuestro cerebro tiene una capacidad finita para almacenar relaciones sociales, a pesar de que nos auxiliamos con agendas y directorios telefónicos en las memorias de nuestros teléfonos móviles, el número de contactos y amistades alcanza un número no demasiado grande, por ejemplo, se ha encontrado que el número promedio de amistades en las redes sociales como *Facebook*, es de alrededor de 120 por participante; algunos con más, algunos con menos [4]. Tomemos 100 como base y hagamos el siguiente ejercicio. Uno mismo puede expresarse como  $100^0 = 1$ , es decir, un individuo. Las amistades de este individuo, que serían 100, pueden expresarse como  $100 = 100^1$ , las 100 amistades de cada una de estas amistades sería a su vez  $100^2 = 10,000$  personas y así sucesivamente hasta encontrar el número de amistades que estarían involucradas en hasta seis separaciones o sea  $100^6 = 1,000,000,000,000$  (ver tabla 1).

Tabla 1

NÚMERO DE CONEXIONES Y PERSONAS INVOLUCRADAS EN UNA RED SOCIAL DE SEIS GRADOS DE SEPARACIÓN

	Número de conexiones en la red de amistades
$100^0$	yo
$100^1$	100 amigos inmediatos
$100^2$	10,000 personas con dos conexiones
$100^3$	1,000,000 personas con tres conexiones
$100^4$	100,000,000 personas con cuatro conexiones
$100^5$	10,000,000,000 personas con cinco conexiones
$100^6$	1,000,000,000,000 personas con seis conexiones



¡Este es un número extraordinariamente grande de personas involucradas en una red social! De hecho se estima que la población mundial hasta enero del 2009 era de 6,790,062,216 personas. Con seis grados de separación, se conectaría varias veces a toda la población del planeta. Entonces esta cota superior que hemos encontrado con este ejercicio exponencial, es una primera aproximación. Pero como todo en ciencia, el problema está en los detalles. Hemos mencionado que no todo individuo tiene 100 amistades, algunos tienen menos, mucho menos y algunos tienen más. El ejercicio que hemos revisado es, de hecho, un proceso de construcción de una red donde el nodo central es uno mismo, se trata de una red jerárquica y, por ello, ordenada (ver figura 3).

Este modelo de red jerárquica es inadecuado para describir una red social donde los nodos (personas) pueden

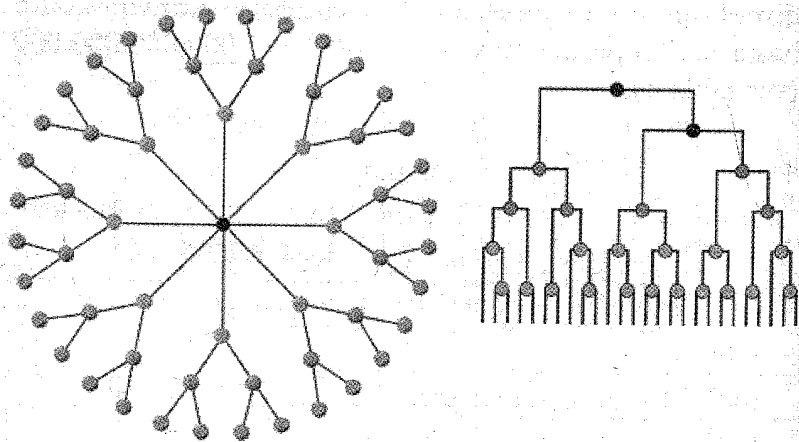


Figura 3. Dos ejemplos de redes sociales jerárquicas y ordenadas. Existe un único nodo principal que mantiene a toda la red unida. En este tipo de redes no existen atajos entre las diferentes ramas (comunidades) de la red y para que la red este completamente conectada se requiere de la presencia de este nodo principal.

tener un número individualizado de conexiones y donde dos personas pueden compartir amistades en diferentes niveles de la red, es decir pueden existir “atajos” que tanto nos sorprenden cuando conocemos por primera vez a una persona que, a su vez, conoce a una de nuestras amistades, de ahí la expresión tan conocida de “el mundo es un pañuelo” o “que mundo tan pequeño”. El estudio de redes que tienen ese tipo de atajos, es de hecho el estudio de redes que contienen un poco de desorden. Si bien la ciencia de los sistemas complejos es para muchos la ciencia que estudia el orden y el desorden, y en su estudio se han hecho muchos progresos en las décadas más recientes, la posibilidad teórica de estudiar con detalle las redes que no son ni ordenadas ni desordenadas llegó en 1998, con la contribución de Watts y Strogatz [1].

### 3. EL MODELO DE REDES COMPLEJAS DE WATTS Y STROGATZ

Consideremos las gráficas que aparecen en la figura 4. Se ha introducido un parámetro  $p$  que es la probabilidad de que un nodo cualquiera tenga uno de sus enlaces removido y reconectado al azar, el valor de  $p$  está por lo tanto en el intervalo  $[0,1]$ . En la red (a) este parámetro es cero y se trata de una red en forma de anillo con gran regularidad y orden. Cada nodo está conectado con sus vecinos inmediatos ( $r = 1$ ) y con sus dos segundos vecinos ( $r = 2$ ). En el extremo cuando  $p = 1$ , la red (c) es una red cuyos enlaces han sido totalmente reconectados al azar y es una red desordenada. En medio de estos dos extremos, tenemos una red en la que apenas unos pocos nodos han sido reconectados, por lo tanto conserva aún muchas de las propiedades de la red ordenada; pero ya tiene un cierto

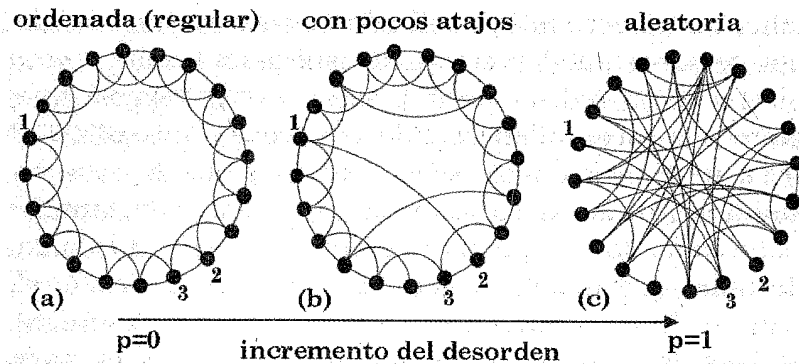


Figura 4. Modelo de Watts y Strogatz. Se introduce una probabilidad de desorden  $p$  para reconectar aleatoriamente los nodos de una red inicialmente ordenada, con ello se logra una transición suave hacia una red completamente desordenada.

grado de desorden. Justamente en este régimen, con valores típicos de  $p \sim 0.02$  suceden las cosas más insospechadas e interesantes, veamos. Si queremos viajar del nodo 1 al nodo 3, debemos recorrer al menos 4 enlaces, en el caso de la red ordenada (a). Ésta es la distancia  $l$  que los separa. En el caso de la red aleatoria (c), el proceso de reconexión ha provocado que el nodo 1 y el nodo 3 estén directamente conectados con un único enlace, entonces  $l = 1$ . En el caso de la red intermedia (b), el valor de  $l$  es 2. Para tener una idea más completa de cuál sería el valor medio de la distancia  $L$  (también llamado diámetro de la red), se promedia sobre todas las distancias entre todos los nodos de cada red, para cada valor de  $p$ . El resultado de este promedio, normalizado a  $L$  cuando  $p = 0$  es entonces  $L(p)/L(0)$  y lo graficamos en la figura 5. Para visualizar esto más fácilmente, hacemos la gráfica semi-log y observamos que la curva descrita (bolas negras) decae rápidamente aun para valores pequeños de  $p$ , alcanzando el valor mínimo cuando  $p = 1$ . Esta gráfica nos

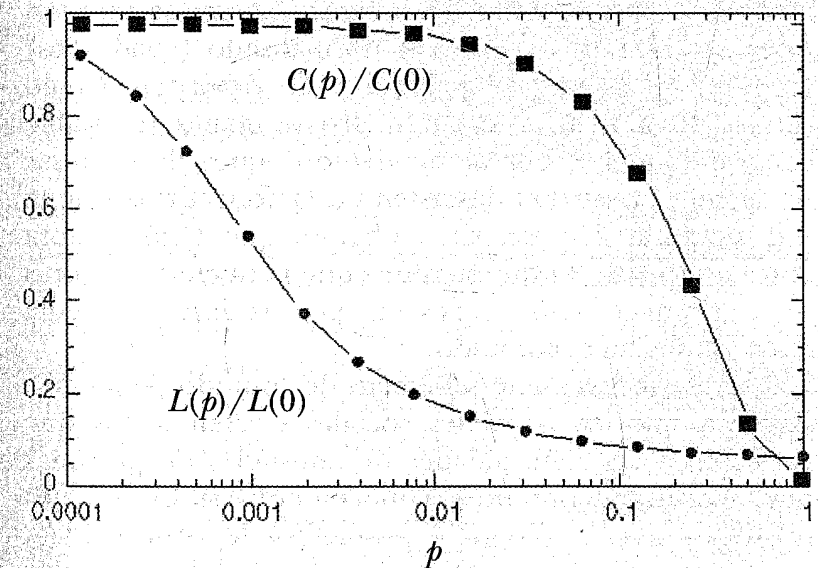


Figura 5. Conectividad local ( $C(p)$ ) y longitud media de conexión (diámetro de la red,  $L(p)$ ) en el modelo de Watts y Strogatz.

demuestra que el ejercicio de contar  $l$ , como lo hemos hecho antes arriba, es correcto y que la distancia media entre cualesquiera nodos en la red disminuye cuando aumenta el grado de desorden. Si lo que fluye por esta red es energía, materia o información, entonces significa que con un cierto grado de desorden, esos flujos se tornan más eficientes. Pero esto es sólo un aspecto interesante de este modelo, que aún no explica totalmente el fenómeno del mundo pequeño.

Definamos ahora otro parámetro que llamaremos el grado de agrupamiento  $C(p)$  y que mide el grado de conectividad en una vecindad local de un nodo cualquiera. Supongamos que un nodo  $v$  tiene  $k_v$  vecinos; entonces por lo menos  $k_v(k_v - 1)/2$  conexiones existen entre ellos. Sea  $C_v$  aquellas conexiones que en verdad existen, entonces  $C$  es el promedio de los  $C_v$  para cada

nodo  $v$ . Veamos entonces en la figura 5 como se comporta este parámetro  $C(p)/C(0)$  normalizado (cuadrados) en función de la probabilidad  $p$  de desorden. Como vemos, el valor de este parámetro se mantiene estable cerca del valor 1 por algún tiempo, antes de colapsar hacia cero cuando el desorden en la conectividad de la red aumenta. Nótese, sin embargo, que  $C(p)$  colapsa antes que  $L(p)$ , lo que significa que para ciertos valores de  $p$ , la conectividad local es alta; pero la distancia media entre nodos ha disminuido.

Éste es efectivamente el efecto de “mundo pequeño”, significa que en las redes sociales existen atajos que conectan a las comunidades de amistades de personas que, aparentemente, no se conocen entre sí. Estos atajos provocan que la distancia promedio de conectividad, entre dos individuos cualesquiera, sea de tan sólo unos cuantos pasos, los llamados “seis grados de separación”. Los parámetros  $L$  y  $C$  han sido medidos en diversas redes sociales conocidas, particularmente en el caso de la comunidad de actores [1] y se ha encontrado que, para un universo de medio millón de actores del mundo entero, la distancia de separación entre cualesquiera par de actores, es un número muy pequeño, de alrededor de 3.5 en promedio. Otras redes sociales muy estudiadas son las redes de colaboraciones científicas y éstas también son redes de tipo “mundo pequeño” [6]. Pero no todas las redes de mundo pequeño, que de aquí en adelante llamaremos *redes complejas*, son redes sociales; en la última década se ha descubierto que la gran mayoría de redes biológicas son redes complejas, e incluso algunas de tipo artificial como la *Internet*. Antes de abordar específicamente las redes complejas biológicas, discutiremos a continuación un tipo muy especial de redes, las redes libres de escala.

#### 4. REDES LIBRES DE ESCALA

Las redes libres de escala (figura 6) son aquellas en las que la distribución estadística del número de conexiones por nodo (grado) es una ley de potencias. Entonces la probabilidad de que un nodo tenga  $k$  conexiones sigue la función  $P(k) \sim k^{-\alpha}$ , donde  $\alpha$  se conoce como el exponente de escalamiento o exponente del grado de la red. El nombre “libre de escala” proviene del hecho de que al estar involucrada una ley de potencias, la distribución del grado de conectividad (número de conexiones por nodo) no tiene una escala característica, lo cual es una propiedad que comparte con los objetos fractales. Es decir que una red de este tipo se vería semejante y tendría propiedades similares independientemente de la escala con la que se vea. Una mirada rápida a las propiedades topológicas de las redes libres de escala, nos diría que, en ellas, existe un número muy pequeño de nodos que tienen muchas conexiones y un número muy grande de nodos con muy pocas conexiones. Como consecuencia, las propiedades de la red están determinadas por un número relativamente pequeño de nodos altamente conectados que se conocen como *nodos-hub*. Un aspecto muy importante que debe destacarse en este tipo de redes, es su resistencia al daño provocado por la eliminación selectiva de los nodos más conectados. Una red libre de escala, es una de las topologías de red más robustas que se pueden encontrar en donde la eliminación de nodos, hasta cierto punto, no destruye la red de interacciones.

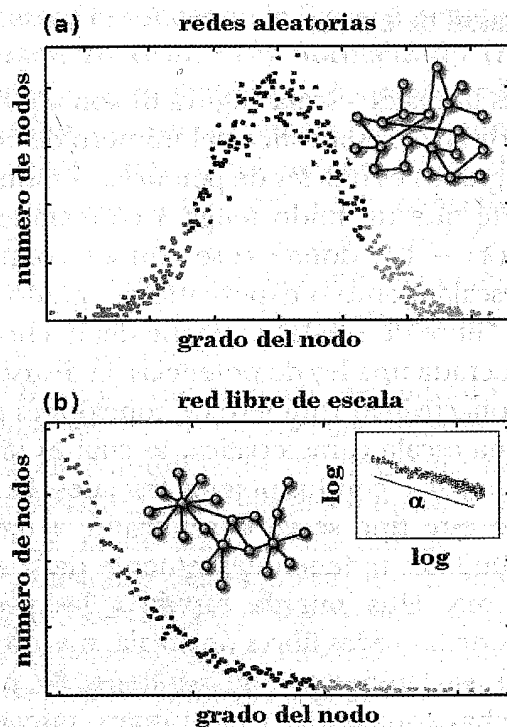


Figura 6. (a) En las redes aleatorias, las conexiones entre nodos ocurren al azar y la probabilidad de que un nodo tenga cierto número de conexiones (grado) es típicamente una distribución de Poisson. (b) En las redes libres de escala, el grado tiene una distribución conocida con "cola larga" y es típicamente descrito por una ley de potencias. En el recuadro se observa esta ley de potencias como una línea recta en escala log-log, con exponente de escalamiento  $\alpha$ .

## 5. REDES COMPLEJAS Y BIOLOGÍA

En el universo vivo, las redes de interacciones son de varios tipos. Existen redes de neuronas, redes tróficas, redes de relaciones de tipo social entre los organismos

de regulación metabólica, redes de expresión y regulación génica, etcétera. ¿Por qué la naturaleza se ha inclinado por las redes complejas, diseño aparentemente universal, para la estructura de las redes de interacciones en la materia viva? Ésta no es una pregunta fácil de responder, sobre todo a la luz de que redes artificiales de gran escala (por ejemplo las redes de telecomunicaciones), que fueron creadas por los humanos sin un diseño global inicial, han crecido hasta adquirir las mismas propiedades de redes complejas naturales. En este último caso sabemos lo que está en juego: reglas locales de conectividad que privilegian la eficiencia y la redundancia y que dan lugar a estructuras de gran escala con propiedades insospechadas que estaban ausentes en el diseño de los componentes locales y de sus interacciones. Antes de abordar nuevamente la pregunta planteada con anterioridad, revisemos algunos casos ilustrativos de redes complejas en biología.

### 5.1. Las redes de neuronas

*Caenorhabditis elegans* es un nemátodo transparente de aproximadamente un milímetro de longitud que habita comúnmente los suelos de los bosques templados. La red neuronal de este organismo está formada por 302 neuronas y está completamente mapeada, es decir, se conocen bien todas las conexiones entre estas neuronas [6 y 7] (figura 7).

Se ha encontrado que la red neuronal de *C. elegans* es de hecho una red de "mundo pequeño" [1], lo que implica que las neuronas están bien conectadas localmente; pero existen algunas, más bien pocas, conexiones entre ellas de largo alcance. El hecho que la red neuronal tenga

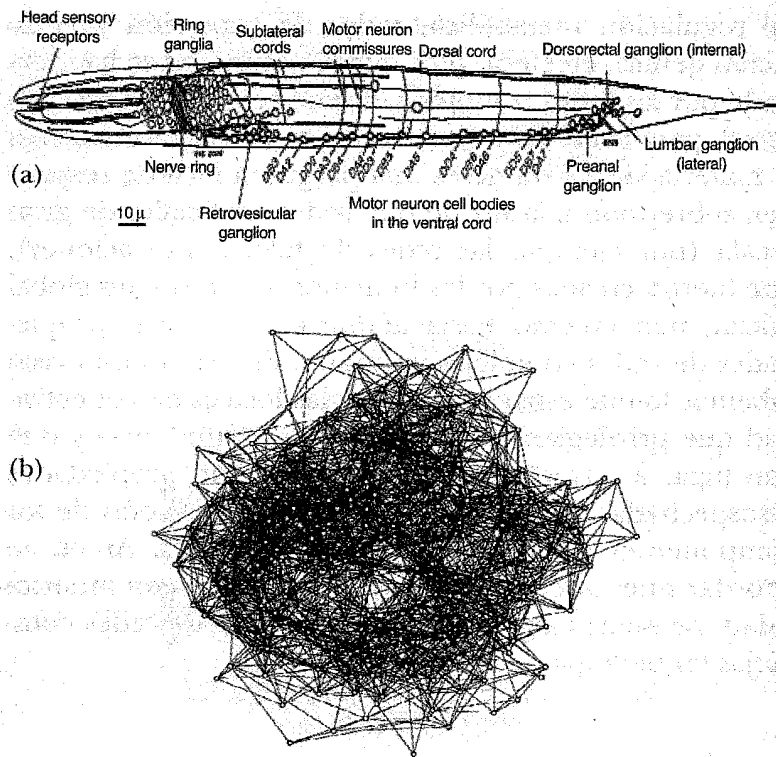


Figura 7. (a) Red neuronal de *C. elegans*. (b) Representación en red de las interconexiones neuronales. Esta topología es de mundo pequeño.

esta topología tiene sus ventajas. Si la red tiene un diámetro pequeño, significa que la longitud promedio entre cualesquiera dos neuronas de la red es en promedio corta, eso está bien si lo que circula por esas redes son señales eléctricas y en última instancia información. Entonces la información viajará de manera más rápida en el sistema de neuronas. Ésta es una red con muy pocas neuronas y tal vez por este hecho no se ha encontrado evidencia de que sea de tipo “libre de escala” [8]; pero otras redes neuronales sí lo son.

Estudios recientes en circuitos neuronales humanos han confirmado que éstos no sólo tienen topología de mundo pequeño sino que también son libres de escala [9]. Estas dos son propiedades muy deseables para un diseño neuronal pues una combinación de buena conectividad local y atajos de largo alcance le confiere a la red un cierto grado de robustez lo que, a su vez, implica que la muerte de una sola neurona no dejará al individuo disfuncional. Las redes neuronales libres de escala y de mundo pequeño confieren gran resistencia a las fallas, facilitan la sincronización de señales y agilizan un procesamiento más rápido de la información [10]; más aún, el mundo pequeño neuronal facilita la emergencia de la memoria asociativa [11]. En esta misma línea se ha demostrado que el mal de Alzheimer está relacionado con la pérdida de la característica de mundo pequeño en las redes neuronales del cerebro, especialmente con la pérdida degenerativa de los atajos y el consecuente aumento de la distancia media entre los nodos (neuronas) de la red [12].

## 5.2. Las redes epidemiológicas

Como lo hemos mencionado anteriormente, la red *Internet* es una vasta colección mundial de computadoras y otros dispositivos de comunicación (nodos) interconectados. Actualmente el número de nodos parece superar los miles de millones. Esta red mundial de computadoras tiene las características de una red compleja: mundo pequeño y libre de escala. Es una red que ha crecido adaptativamente bajo los principios de la auto-organización, nadie la diseñó globalmente, nadie la controla de manera única. Por sus enlaces viaja todo tipo de información desde distancias intercontinentales. Eso incluye la llamada



información maliciosa (*malware*) en forma de virus, gusanos informáticos y otras piezas de código indeseado. Sin entrar en detalle sobre el deliberadamente pésimo diseño de seguridad detrás del sistema operativo dominante en las computadoras personales, la *Internet* es un gran laboratorio epidemiológico para el estudio masivo de dinámicas infecciosas [13 y 14]. Se sabe por ejemplo que en esta red existe un fenómeno percolativo donde el número tan elevado de computadoras interconectadas puede provocar, presumiblemente, que el *malware* circule por la red de manera indefinida y sin posibilidades de erradicación. Más aún, el hecho de que la topología sea libre de escala y de mundo pequeño, facilita que la información, como en el caso del cerebro, fluya de manera eficiente y, con ello, las infecciones. Ésta es una pésima noticia pues implica que en las redes sociales humanas, las enfermedades infecciosas también tienen una dinámica de propagación eficiente facilitada por la existencia de conexiones de larga distancia, combinadas con una buena conectividad local en las comunidades sociales. Este hallazgo es en verdad revolucionario pues cambia radicalmente la manera en cómo se percibía la dinámica infecciosa de enfermedades, sus formas de contagio y sus posibles curas.

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas recientes que se expanden de manera rápida y que no existían hasta hace un par de décadas. Generalmente son provocadas por agentes infecciosos inicialmente desconocidos y muchos de ellos anteriormente circunscritos a animales diferentes a los humanos. El sida causado por el virus VIH es el caso más conocido. Se sabe que el VIH se originó en las poblaciones de simios centroafricanos y por algún mecanismo logró pasar a los humanos, posiblemente desde inicios del siglo xx. Sin embargo la característica de epidemia la adquirió hacia los años ochenta,

cuando fue reportado un primer caso en la ciudad de Los Ángeles. El VIH es una enfermedad de transmisión sexual y por ello, en la gran mayoría de los casos, se transmite siguiendo las pautas de las redes sociales de amistades que, como ya lo sabemos, son redes de mundo pequeño y libres de escala, las redes de contactos sexuales son también redes de este tipo [15]. Desde el descubrimiento mismo de las características de las redes sociales en los humanos, se ha producido una avalancha de estudios para estudiar con mayor detalle la dinámica de transmisión en redes de las enfermedades infecciosas [16 y 17] y especialmente para las de tipo emergente como el SARS [18] pues en algunos casos no se cuenta aún con la cura. Mucho se ha dicho que el mundo globalizado de hoy tiene una cierta responsabilidad en ello, debido a la facilidad con la que se pueden viajar grandes distancias en poco tiempo, facilitando el transporte intercontinental de las enfermedades, así como el mayor contacto entre individuos [19, 20 y 21].

### 5.3. Las redes ecológicas

Un colectivo de individuos bajo interacción define bien a un ecosistema y define también a un sistema complejo, de tal manera que ambas nociones llegan a ser indistinguibles de cierto modo y más aún cuando la dinámica de las interacciones resultan tener una topología de red compleja, como lo hemos visto en el caso de los contactos sexuales y que resulta esencial para definir la dinámica de poblaciones.

Desde luego que existe una gran variedad de redes que definen interacciones de carácter ecológico. Un caso bien estudiado son las redes que representan a las llamadas

cadena trófica que, dentro de un ecosistema, nos dicen básicamente quién se come a quien. Las redes tróficas nos revelan los flujos de energía y materia entre sus participantes, como ya lo habíamos mencionado, las redes complejas, dada su topología que combina un alto grado de conectividad local con atajos de larga distancia asegura entonces que dentro de un ecosistema los flujos de energía sean eficientes. Varios estudios muestran que las redes tróficas son de hecho redes de mundo pequeño y libres de escala [22]. El análisis de estas redes también puede revelar la fragilidad de las mismas en el contexto de la crisis ambiental que se vive debido al desarrollo humano destructivo que nos caracteriza en la actualidad. Saber con detalle qué especies son más importantes para conservar y proteger (si no es que todas), es un resultado del estudio de las interacciones ecológicas con las herramientas matemáticas de las redes complejas [23 y 24].

#### 5.4. *Las redes metabólicas y de regulación génica*

¿Son las redes complejas una constante en la dinámica de las interacciones sociales y ecológicas? Eso parece; ¿pero que sucede a nivel celular y molecular? ¿Operan a estos niveles otros principios de eficiencia diferente que requieren de otras topologías de redes? La respuesta a esta última pregunta es no. Las redes complejas también son comunes en el mundo celular y molecular. Dentro de una célula existe una intrincada relación espacio-temporal de procesos y estructuras. Existe un flujo vital de energía, materiales e información que van y vienen desde y hacia los sitios correctos, en una perfecta sincronización de eventos. ¿Cómo se lleva a cabo este exitoso proceso

tan integrado y funcional? Lamentablemente no se tiene una respuesta a esta pregunta, se conocen muchos aspectos particulares de estos procesos; pero no una descripción total a gran escala. Sin embargo, este aspecto de la ciencia celular se ha beneficiado enormemente con el enfoque de redes complejas. En un trabajo reciente se realizó un estudio comparativo de las redes metabólicas de 43 organismos diferentes que pertenecen a los tres grandes dominios taxonómicos de la vida y se encontró que, pese a la gran diferencia en los constituyentes individuales, las propiedades topológicas de esas redes mostraron similitudes sorprendentes entre ellas y no sólo eso, resultaron ser redes complejas como las otras tantas que hemos mencionado aquí. Es decir, redes de mundo pequeño y libres de escala [25]. La sorpresa no se detiene aquí, los estudios más recientes de las redes genéticas dicen lo mismo, su topología es la de una red compleja [26]

¿Por que existe esta asombrosa similitud en las topologías de las redes biológicas? Esto sugiere un principio universal de auto-organización que privilegia la robustez y la tolerancia al error típica de las redes libres de escala, con la eficiencia para el flujo de información, materia y energía, típica de las redes de mundo pequeño. Frente a esto, pareciera que estamos frente al descubrimiento de un nuevo principio de operación de la materia viva, que sin embargo es un principio compartido con la materia inanimada, regida por los principios de la física de los fenómenos complejos.

## REFERENCIAS

1. D. J. Watts y S. H. Strogatz, *Collective dynamics of 'small-world' networks*, *Nature* **393**, 440-442 (1998).
2. A-L. Barabási, *Linked: how everything is connected to everything else and what it means for business, science and everyday life*, Plume, Nueva York (2003).
3. S. Milgram, *The small world problem*, *Psychology Today*, 60-67, mayo 1967.
4. *Primates on Facebook*, *The Economist*, febrero 26, 2009. En línea: [http://www.economist.com/science/displaystory.cfm?story\\_id=13176775](http://www.economist.com/science/displaystory.cfm?story_id=13176775).
5. M. E. J. Newman, *The structure of scientific collaboration networks*. *PNAS* **98** (2), 404-409, enero 16, 2001.
6. D. G. Albertson y J. N. Thomson. *The pharynx of caenorhabditis elegans*, *Phil. Trans. R. Soc. London B*, **275**, 229-325, 1976.
7. J. G. White, E. Southgate, J. N. Thomson y S. Brenner, *The structure of the nervous system of the nematode caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **314**, 1-340, 1986.
8. L. A. N. Amaral, A. Scala, M. Barth'el'emy y H. E. Stanley. *Classes of small-world networks*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**, 11149-11152, 2000.
9. V. M. Eguiluz, *Scale-Free Brain Functional Networks*, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 018102 (2005).
10. L. F. Lago-Fernández, R. Huerta, F. Corbacho y J. A. Sigüenza. *Fast response and temporal coherent oscillations in small-world networks*, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 2758 (2000).
11. L. G. Morelli, G. Abramson y M. N. Kuperman, *Associative memory in a small-world neural network*, *Eur. Phys. J. B* **38**, 495-500 (2004).
12. C. J. Stam, B. F. Jones, G. Nolte, M. Breakspear, P. Scheltens, *Small-world networks and functional connectivity in Alzheimer's disease*, *Cereb Cortex* **17** (1), 92-9, 2007.
13. R. Pastor-Satorras y A. Vespignani, *Epidemic Spreading in Scale-Free Networks*, *Physical Review Letters*, **86** (14), 3200-3203, 2001.
14. V. M. Eguiluz, K. Klemm, *Epidemic threshold in structured scale-free networks*, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 108701, 2002.
15. F. Liljeros *et al.*, *The web of human sexual contacts*, *Nature* **411** (21) junio 2001.
16. C. Moore, M. E. J. Newman, *Epidemics and percolation in small-world networks*, *Phys. Rev. E* **61** (5), 5678-5682, may 2000.
17. M. M. Telo da Gama y A. Nunes, *Epidemics in small world networks*. *The European Physical Journal B* **50**, núms. 1-2, marzo 2006.
18. C. Y. Huang *et al.*, *Simulating SARS: small-world epidemiological modeling and public health policy assessments*, *Journal of Artificial Societies and Social Simulation*, **7**, 100-131 (2004).
19. O. Miramontes, B. Luque, *Dynamical small-world behavior in an epidemiological model of mobile individuals*, *Physica D* **168**, 379-385, 2002.
20. D. Brockmann, L. Hufnagel, T. Geisel, *The scaling laws of human travel*, *Nature* **439**, 462-465. 2006.
21. S. C. Manrubia *et al.*, *Long-range transport and universality classes in in vitro viral infection spread*, *Europhys. Lett.* **74**, 547-553, 2006.
22. J. M. Montoya, R. V. Sole, *Small world patterns in food webs*, *Journal of theoretical biology* **214**, 405-412, 2002.
23. J. M. Montoya, S. L. Pimm, R. V. Solé, *Ecological networks and their fragility*, *Nature* **442**, 259-264 (julio 20, 2006).
24. C. J. Melian, J. Bascompte, *Complex networks: two ways to be robust?*, *Ecology Letters* **5** (6 noviembre 2002).
25. H. Jeong *et al.*, *The large-scale organization of metabolic networks*, *Nature* **407**, 651-654 (5 octubre, 2000).
26. E. Balleza *et al.*, *Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms*, *PLoS ONE* **3** (6), e2456 (2008).

## CAPÍTULO 23 BIOMATERIALES

JUAN MORALES CORONA\*, ROBERTO OLAYO\*\*

*Departamento de Física  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

### I. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales tienen un papel importante en la medicina moderna con una amplia gama de aplicaciones que incluyen: dispositivos médicos, implantes artificiales, dispositivos liberadores de drogas y soportes para la regeneración de tejidos. Las estrategias para su diseño van desde materiales que sean “invisibles” al sistema biológico hasta materiales “inteligentes” que interactúan con el medio y tejido que los rodea, estimulando la proliferación o regeneración de las células, o sirviendo como guía para el crecimiento de tejido dañado [1,4]. Una de las estrategias más usadas en esta tarea es aumentar la integración cohesiva entre el implante y el tejido celular, creando una interfase fuerte entre el biomaterial y el tejido que lo rodea para aumentar la funcionalidad del implante y su vida media dentro del sistema biológico [5-9].

En la actualidad no existe una definición totalmente aceptada para el término “biomaterial”. Joon B. Park y Roderics S. Lakes [10], lo definen como un material

\* jmor@xanum.uam.mx \*\* oagr@xanum.uam.mx

sintético usado para reparar, remplazar o ayudar en el funcionamiento de un sistema vivo y que está en contacto íntimo con un tejido vivo. Castner *et al.* [11], definen el término como un material que sirve para reparar humanos. Williams en 1987 definió al biomaterial como un material usado en un dispositivo médico destinado a interactuar con un sistema biológico. Si la palabra médico es suprimida de la definición anterior el concepto es más amplio y puede abarcar un número variado de aplicaciones. N. Graña lo define de manera más completa: un biomaterial es cualquier sustancia (menos medicamentos) o combinación de sustancias de origen natural o sintético, que pueden ser usados por un periodo de tiempo, como todo o como parte de un sistema que trata, aumenta o remplace algún tejido, órgano o función del cuerpo [12].

Una definición complementaria al término biomateriales es la biocompatibilidad. La biocompatibilidad es la habilidad de un material para responder de forma apropiada al huésped en una aplicación específica. El material debe cumplir una serie de requerimientos para ser considerado como biomaterial, debe no ser tóxico, no ser trombogénico, no ser cancerígeno, no producir reacciones inflamatorias, no producir alergias, y sobre todo no afectar al sistema inmunológico.

Históricamente, hay indicios de que los pueblos romano, chino y azteca usaban el oro en trabajos dentales hace más de dos mil años. Se tienen registros históricos del uso de ojos de vidrio, dientes de madera, patas de palo, etc. En el siglo pasado, en 1937, el polimetilmetacrilato fue introducido a la industria dental. Durante la segunda guerra mundial, astillas de los parabrisas de los aviones se incrustaban en los ojos de los pilotos sin ocasionarles la pérdida del ojo, esto sugirió que algunos materiales

podrían estar en contacto íntimo con un sistema biológico sin ocasionarle daños o reacciones adversas. En 1960 se propuso el uso de polietileno de ultra alto peso molecular y acero inoxidable para el reemplazo total de cadera. Hoy día es común usar titanio y sus aleaciones, así como acero inoxidable en el remplazo de cadera y rodilla, huesos planos. También se usa el polimetilmetacrilato y la hidroxiapatita como cemento para hueso y prótesis dentales. Se usa silicón e hidrogeles para lentes intraoculares, lentes de contacto y córneas artificiales [13]. Como se puede apreciar, los biomateriales pueden ser metales, polímeros, cerámicos y compositos. Iniciaremos este capítulo sobre el estudio de los biomateriales estudiando sus propiedades de bulto y superficiales.

Desde el punto de vista biológico se ha comenzado a presentar una discusión respecto al futuro del estudio de los biomateriales, ya que nuevos campos como el de la *ingeniería de tejidos* (IT) y en general de la *medicina regenerativa* (MR) cuestionan el desarrollo tradicional en biomateriales. En el presente trabajo se presentará una descripción de biomateriales que no abordará esta polémica, principalmente porque en la actualidad los biomateriales están participando en mejorar la calidad de vida de muchos pacientes, particularmente en el área de traumatología (cadera, tendones, etcétera) y cardiovascular (marcapasos, extends, etc.) y no se ve una sustitución de estos dispositivos en el corto plazo.

## 2. ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES SÓLIDOS

Todas las sustancias pueden existir, al menos en principio, en los tres estados de agregación molecular: sólido, líquido y gaseoso. En un sólido sus átomos constituyentes



permanecen unidos en forma organizada, con poca libertad de movimiento debido a fuertes fuerzas interatómicas. La estructura atómica y electrónica y la mayoría de las propiedades físicas del sólido dependen de la naturaleza y fuerza de los enlaces interatómicos. En elementos puros, aleaciones, cerámicos y polímeros la estructura se determina en la escala atómica/molecular. Existen tres tipos de enlaces fuertes o primarios: iónico, covalente y metálico, también existen diferentes tipos de enlaces débiles o secundarios como: el enlace por puente de hidrógeno y el enlace Van der Waals [14].

## 2.1. Enlaces primarios o fuertes

Para entender las propiedades macroscópicas de los materiales en muchas ocasiones es necesario conocer cómo están unidos los átomos entre sí. Hay que saber qué tipo de fuerzas están uniéndolos y cómo están acomodados de manera espacial entre sí [15].

Las características del enlace primario son i) son enlaces bastante fuertes, ii) se rompen a temperatura de 1000 a 5000 K y iii) las cerámicas y metales están unidos exclusivamente por este tipo de enlace.

### 2.1.1. Enlace iónico

El enlace iónico es la fuerza electrostática que mantiene unidos a los iones en un compuesto iónico. Los átomos de los elementos que tienen baja energía de ionización tienden a formar cationes (con carga positiva), en tanto los que tienen alta afinidad electrónica tienden a formar aniones (con carga negativa). Los elementos con

más probabilidad de formar cationes en los compuestos iónicos son los metales, y los más adecuados para formar aniones son los halógenos y el oxígeno. En este tipo de enlace, el átomo de metal dona uno o más electrones a un átomo aceptor de electrones (no metálico). La fuerza de atracción electrostática entre el anión y el catión es lo que constituye el enlace iónico [15-17].

En sólidos iónicos compuestos de muchos iones, los iones están arreglados de tal forma que cada catión está rodeado por la mayor cantidad posible de aniones para reducir al mínimo la fuerza de repulsión entre cationes. Este tipo de empaquetamiento reduce la energía del ensemble, y permite la formación de un arreglo ordenado llamado estructura cristalina. Este tipo de enlace cambia la estructura electrónica de los átomos de tal manera que los electrones de enlace no están disponibles para el transporte de carga eléctrica y en consecuencia los sólidos iónicos son pobres conductores de electricidad y tienen una baja reactividad química. Ejemplo de este tipo de sustancia es el fluoruro de sodio (NaF) y el cloruro de sodio (NaCl).

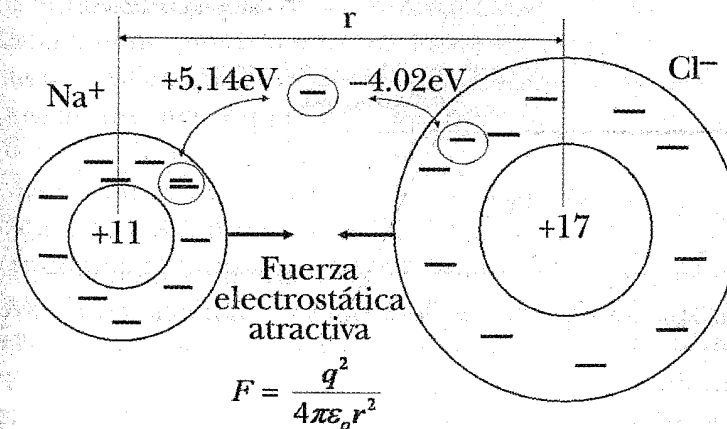


Figura 2.1. Enlace iónico en la formación del cloruro de sodio (sal).

### 2.1.2. Enlace covalente

Elementos como el carbón y el silicón tienen cuatro electrones de valencia y tienen la tendencia a donar o aceptar electrones. Por ejemplo, dos átomos de carbono, cada uno puede contribuir un electrón para formar un par; este par de electrones constituye el enlace covalente. El enlace covalente es aquel en el cual dos electrones son compartidos por dos átomos [15-17].

Algunas características de los materiales con enlace covalente son: i) materiales puros con alto módulo elástico, ii) silicatos y vidrios (piedras, ladrillos, cemento), iii) metales de alto punto de fusión (wolframio, molibdeno, tantalio y iv) la unión de la cadena principal de los átomos de carbono en los materiales poliméricos.

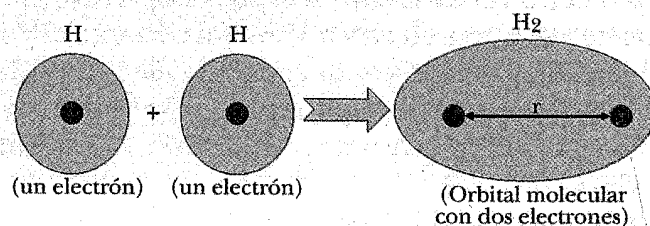


Figura 2.2. Ejemplo de un enlace covalente en una molécula de hidrógeno.

### 2.1.3. Enlace metálico

Es el principal enlace en los elementos metálicos. En este tipo de enlace los electrones de valencia con mayor energía abandonan los átomos ionizándolos. Estos electrones libres forman un "mar" de electrones que rodea a los átomos. La capacidad de movimiento del "mar" de electrones facilita la conductividad eléctrica del metal.

Los elementos con este tipo de enlace tienden a empaquetarse formando estructuras de alta densidad.

### 2.2. Enlaces secundarios o débiles

Junto a los tres enlaces fuertes mencionados anteriormente existen los enlaces secundarios, éstos también influyen sobre las propiedades de algunos sólidos especialmente sobre los polímeros. Los más importantes de estos enlaces son el enlace de Van der Waals y el enlace por puente de hidrógeno. Algunas de las características de este tipo de enlace son: i) se disocian a temperaturas de 100 a 500K, ii) aparecen principalmente en polímeros y gases y iii) unen las cadenas poliméricas entre sí, hacen que la mayoría de los polímeros sean sólidos.

### 2.3. Estructura cristalina

Los materiales sólidos se pueden clasificar en dos grandes categorías: cristalinos y amorfos. Un sólido cristalino es aquel que posee una estructura perfectamente ordenada y tiene simetría de gran alcance. Los átomos, moléculas o iones que forman la estructura cristalina ocupan posiciones bien específicas en la estructura. Debido a la distribución de estas partículas en el sólido cristalino las fuerzas netas de atracción intermolecular son máximas. Estas fuerzas son responsables de la estabilidad del cristal y pueden ser iónicas, covalentes, de Van der Waals, de puentes de hidrógeno, o una combinación de todas ellas. En el sólido cristalino el arreglo de átomos que conforman la estructura puede ser tratado como un arreglo de esferas duras. Un sólido amorfo carece de un orden definido y de un orden molecular de largo alcance.

### 2.3.1. Estructura cúbica

**Celda unitaria**, es la unidad estructural repetida del cristal. La estructura del sólido cristalino se representa mediante la repetición de la celda unitaria en las tres direcciones del espacio (ver figura 2.3). Dentro del modelo de esferas duras arregladas en este tipo de estructura cada esfera representa un átomo, ión o molécula y se denomina punto reticular.

Las esferas se pueden empaquetar de forma distinta. Cada arreglo tiene un número de coordinación diferente, este número se refiere al número de átomos (o iones) que rodean a un átomo (o ión) en una red cristalina y ofrece una medida de qué tan compactas están empaquetadas las esferas.

#### a) Empaquetamientos no compactos

**Celda cúbica simple**. Tiene una dimensión característica,  $a$ , llamada constante de red [15] y su número de coordinación es de 6, cada átomo de un punto reticular, rodeado por 6 átomos vecinos. Esta estructura tiene 8 vértices y en cada vértice  $1/8$  del átomo del vértice está dentro del cubo.

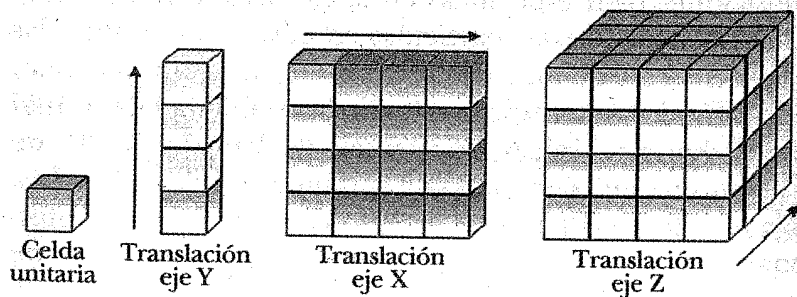


Figura 2.3. Celda unitaria y su repetición en 3D.

Los átomos por celda unitaria son:  $8 \text{ vértices} \times 1/8 = 1$ . Su parámetro de red es  $a = 2r$ , donde  $r$  es el radio del átomo. La eficiencia del empaquetamiento es del 52%.

$$\frac{V_{\text{ocupado}}}{V_{\text{celda unitaria}}} = \frac{(4/3)\pi r^3}{a^3} = \frac{\pi}{6} = 0.52.$$

#### b) Celda cúbica centrada en el cuerpo

Esta estructura tiene un número de coordinación de 8. Tiene 2 átomos por celda unitaria,  $8 \text{ aristas} \times 1/8 + 1 \text{ del centro} = 1 + 1 = 2$  átomos. La relación entre la longitud de la arista y el radio del átomo es:

$$r = \frac{\sqrt{3} a}{4}$$

La eficiencia del empaquetamiento es del 68%.

$$\frac{V_{\text{ocupado}}}{V_{\text{celda}}} = \frac{2(4/3)\pi r^3}{a^3} = \frac{\sqrt{3}\pi}{8} = 0.68.$$

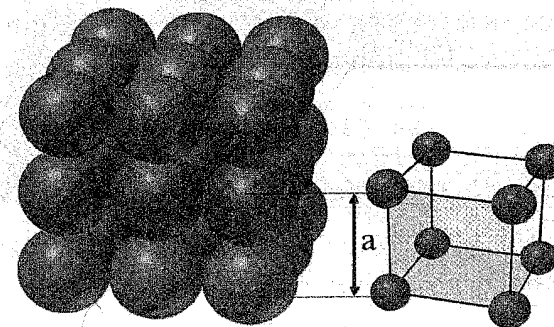


Figura 2.4. Representación de la estructura cristalina cúbica simple.

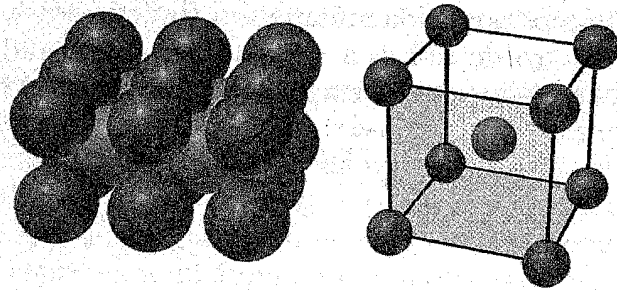


Figura 2.5. Representación de la estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo.

### 2.3.2. Empaquetamientos compactos

Los empaquetamientos compactos son arreglos más eficientes de las esferas, como por ejemplo la celda cúbica centrada en las caras y la celda hexagonal compacta (ABA).

#### a) Celda cúbica centrada en las caras

Este tipo de celda tiene un número de coordinación de 12, el número de átomos por celda unitaria es de 4 (figura 2.6), mientras que la relación entre la longitud de la arista y el radio del átomo es

$$(4r)^2 = 2a^2$$

y la eficiencia de su empaquetamiento es del 74%.

#### b) Celda hexagonal compacta (ABA)

Tiene un número de coordinación de 12, el número de átomos por celda unitaria es de 6 y tiene una eficiencia

de empaquetamiento de 74% (figura 2.7). En la figura 2.8 se muestran otros tipos de estructuras que pueden formar redes cristalinas [17].

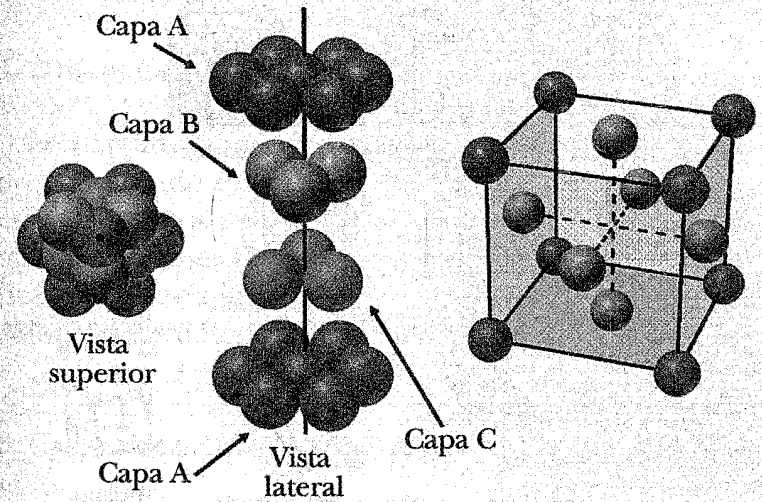


Figura 2.6. Representación de la estructura cristalina cúbica centrada en las caras.

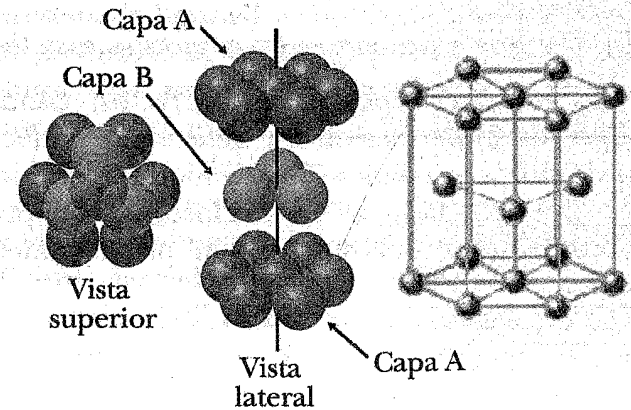


Figura 2.7. Representación de la estructura cristalina hexagonal compacta.

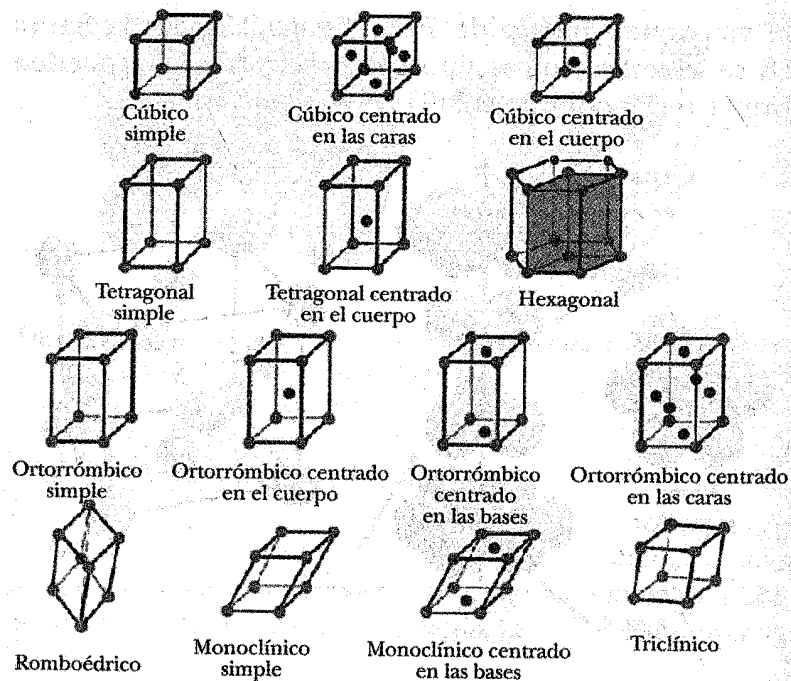


Figura 2.8. Representación de la estructura cristalina.

### 2.3.3. Defectos e imperfecciones en las estructuras cristalinas

No existen sólidos cristalinos perfectos; contienen varios tipos de imperfecciones y defectos que afectan a muchas de sus propiedades físicas y mecánicas. Estos defectos se pueden clasificar en intrínsecos, son propios del material y extrínsecos se deben principalmente a impurezas.

#### a) Defectos puntuales

Aparecen como vacancias, sustituciones o intersticios de átomos en la red cristalina. Los átomos de sustitución

o intersticiales son llamados elementos de aleación si se ponen a propósito en la estructura y se llaman impurezas si no se colocan intencionalmente.

#### b) Defectos lineales

Son creados cuando un plano de átomos es desplazado o dislocado de su posición original dentro de la red cristalina. Estos defectos son los que dan las propiedades más interesantes del material, como la deformación plástica, resistencia a la rotura, la conductividad eléctrica, color, etcétera.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

Los materiales guardan una relación fundamental entre su estructura y sus propiedades. Se llama caracterización tanto a la evaluación de la estructura como a la de las propiedades para complementar un esquema como el que presenta la figura 3.1, donde partiendo de la síntesis y/o el procesado se puede generar una estructura que dará lugar a un conjunto de propiedades generalmente macroscópicas que determinarán tanto el desempeño como el posible uso del material en condiciones específicas.

La estructura recorre todas las escalas de longitud, desde el nivel atómico ( $10^{-2}$  a  $10^0$  nm), al macroscópico ( $> 10^6$  nm), pasando por el nanométrico ( $10^0$  a  $10^3$  nm) y micrométrico ( $10^3$  a  $10^6$  nm). Las propiedades en consecuencia pueden variar en su óptica, respuesta mecánica, conductividad eléctrica, etc. Un material podrá tener átomos específicos que le permitan interactuar eléctricamente, nanoestructuras que lo hagan detectable por rayos X,



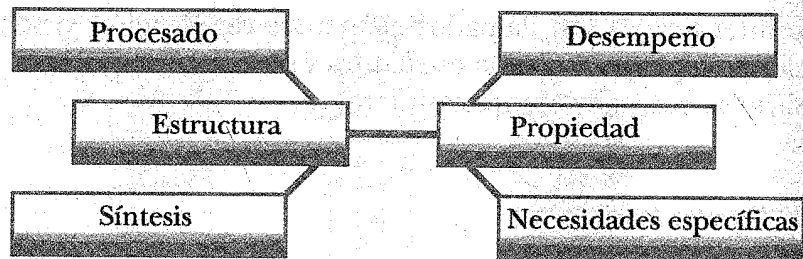


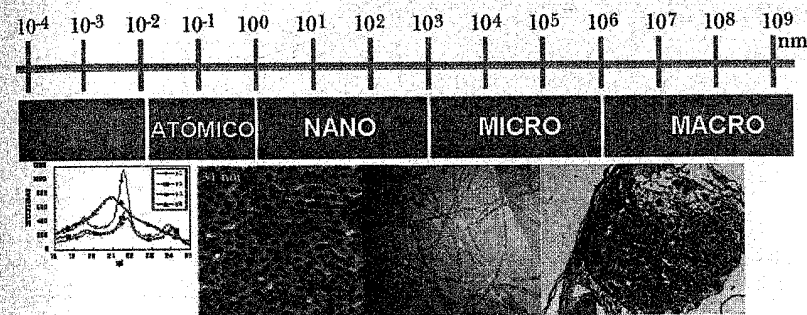
Figura 3.1 Representación de relación Estructura-Propiedad.

superficie rugosa a nivel micrométrico y una estructura macroscópica que le permitirá funcionar como válvula cardiaca. La caracterización de todas estas estructuras permite diseñar y ajustar el mejor material o combinación de los mismos para cumplir la función para la cual se diseñó.

Para caracterizar la estructura del material se utiliza una "sonda" para estimular al material y de su respuesta se infiere la estructura, en general las "sondas" más usadas son ondas electromagnéticas desde la radiofrecuencia hasta los rayos  $\gamma$  o partículas como electrones y neutrones. También se usa estímulo mecánico que puede ir desde ultrasonido hasta deformaciones macroscópicas.

La respuesta a estos estímulos proporciona información sobre el sistema y la mayoría de las veces sobre su estructura; esta respuesta se puede catalogar como una dispersión del haz, que se divide en elástica e inelástica, y en una forma más sofisticada como generadora de imagen.

Dispersión: esta respuesta tiene dos posibilidades fundamentales, elástica e inelástica; como su nombre lo indica, la primera implica que entre el haz incidente y el dispersado hay muy poco o ningún cambio en la energía por lo que básicamente se analiza el cambio de dirección,



A B C D

Figura 3.2. Escalas del nivel de las dimensiones de la estructura, para obtener información se necesita estimular con la longitud de onda adecuada, A) Espectros de rayos X que dan información de variaciones en la cristalinidad de polietileno (distancia característica 0.1nm). B) Nanoporos generados en un material, obtenidos por autoensamble de un copolímero en bloque (31nm) [18]. C) Microfibras de polilactona obtenidas por electrohilado (*electrospinning* 50  $\mu\text{m}$ ) [19]. D) Crecimiento celular alrededor de polipirrol implantado en la médula espinal de una rata (5mm) [20].

dentro de este grupo tenemos: dispersión de luz de ángulo grande y bajo, dispersión de luz dinámica, dispersión de rayos X ángulo grande y bajo y dispersión de electrones y neutrones.

Una descripción detallada de estas técnicas va más allá del propósito de este trabajo pero básicamente la dirección e intensidad del haz dispersado nos van a dar información morfológica en una escala que depende de la longitud de onda.

La dispersión inelástica implica un cambio en la energía que se ve reflejado en la excitación del material sobre el que se incide, que puede simplemente mantener su estado excitado y relajarse lentamente o liberar su excitación, decayendo y liberando la energía en forma de radiación electromagnética con una longitud de onda

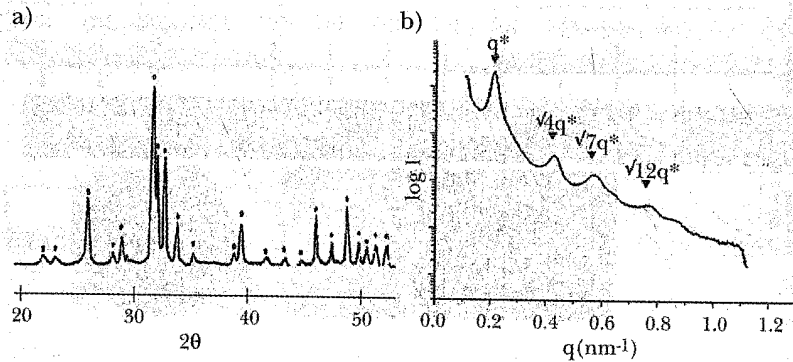


Figura 3.3 a) Patrones de difracción de rayos X ángulo grande de hidroxiapatita sintética, con tratamiento térmico a 800° C durante 2 horas, con este espectro se obtiene información de su estructura cristalina [21]. b) Patrón de dispersión de rayos X a bajo ángulo, de un copolímero con estructuras cilíndricas, la relación entre los picos de intensidad permite establecer la morfología [22].

diferente a la incidente, en estos casos casi siempre se hace un análisis de la longitud de onda saliente lo que nos da un espectro que puede ser de absorción o emisión, en la primera tenemos ejemplos como la espectroscopía infrarroja y ultravioleta, mientras que en el segundo caso tenemos espectroscopia Raman [23] y técnicas donde se estimula con partículas y se obtiene radiación electromagnética (rayos X) como EDS, o se estimula con rayos X y se obtienen electrones como en espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

Una de las técnicas más importantes de caracterización es la que manipula adecuadamente la "sonda" para obtener una imagen del material, en general se obtiene una imagen amplificada del material por lo que los equipos son llamados microscopios aun cuando los nuevos microscopios pueden obtener imágenes a nivel atómico. Los microscopios más comunes se dividen en ópticos y elec-

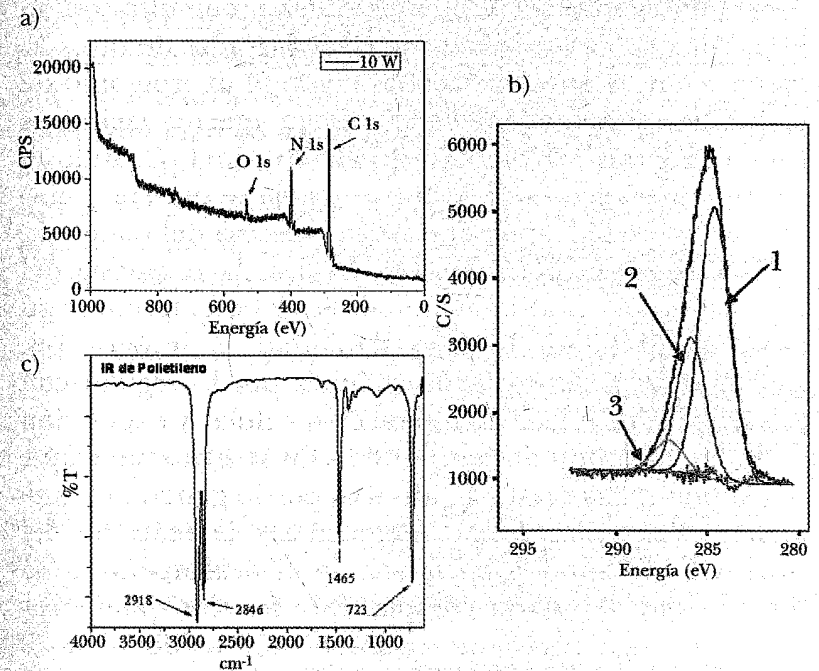


Figura 3.4. Ejemplos de caracterización con dispersión inelástica: a) espectro de XPS, el haz incidente es de rayos X y se liberan electrones que dan información sobre el núcleo que se encuentra en la superficie. b) Detalle del pico representando al carbono, la deconvolución permite establecer niveles de energía y así ver la configuración del núcleo. c) Espectro de infrarrojo del polietileno, la absorción de longitudes de onda específicas se asocia a grupos funcionales y ayuda a establecer la estructura.

trónicos dependiendo si usan luz en el visible o electrones como "sonda" de reconocimiento. Los microscopios son instrumentos que además de dar una imagen se combinan con técnicas espectroscópicas y dan mayor información con la manipulación de sus longitudes de onda y energía.

El estímulo mecánico se puede manejar prácticamente como el electromagnético y se tienen técnicas de absorción

e imagen, esta última se pueden obtener con ultrasonido que funciona muy parecido a las radiografías de rayos X, o con técnicas muy sofisticadas como el microscopio de fuerza atómica que puede combinar efectos cuánticos para tener un microscopio de efecto túnel. Cuando el estudio mecánico es de baja frecuencia se obtiene información sobre la respuesta elástica y viscosa del material.

Finalmente es necesario caracterizar la respuesta del sistema biológico al biomaterial. Se debe determinar su biocompatibilidad, biodegradabilidad, e integración. Este tipo de caracterización se inicia por lo regular con experimentos *in vitro* de interacción celular y exposición del material a líquidos corporales. En la siguiente etapa, se expone el material a tejido vivo por lo general en animales, caracterizando su integración y la reacción del huésped, así como la eficiencia en el desempeño de la función que se espera cumpla. Esta función puede ser dosificar droga, regenerar tejido, sustituir tejido, o partes del huésped como venas, válvulas, hueso, etcétera. Finalmente se pasa a pruebas clínicas para probar con humanos.

#### 4. IMPLANTES METÁLICOS

Los metales se han usado para fabricar una amplia variedad de implantes. El primer metal usado específicamente para humanos fue el acero inoxidable "Sherman Vanadium Steel", se utilizó para fabricar placas planas para hueso y tornillos. Metales tales como el Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo y el W son usados para fabricar implantes porque son bien tolerados por el cuerpo humano. Algunos de estos metales de forma natural forman parte de algún proceso dentro del cuerpo, por ejemplo el (Fe)

ayuda en el funcionamiento de algunas células, el Co está presente en la síntesis de la vitamina B12, pero en grandes cantidades ambos son tóxicos para el cuerpo. La biocompatibilidad de los implantes metálicos es esencial ya que se pueden oxidar o corroer en un ambiente tan agresivo como el del cuerpo. La corrosión tiene como efecto la pérdida del material y los productos de esta corrosión pueden envenenar el tejido huésped. Los tres metales más usados como implantes son el acero inoxidable, el cobalto y el titanio, así como sus aleaciones [10].

##### 4.1. Acero inoxidable

El acero es básicamente una aleación de hierro altamente refinado, más de un 98% de hierro y entre 0.05 y 2% de carbono. Su fabricación comienza con la reducción del hierro y, algunas veces, otros elementos de aleación específicos tales como el Cr (cromo) o Ni (níquel) se agregan con propósitos determinados.

Es uno de los materiales más versátiles, muy adaptable y ampliamente usado. Se fabrica a un precio relativamente bajo. El acero combina la resistencia mecánica y la posibilidad de ser moldeado, lo que se presta para poderlo procesar mediante muchos métodos. Además, sus propiedades pueden ser manejadas de acuerdo a las necesidades específicas mediante tratamientos con calor, trabajo mecánico o mediante aleaciones.

##### 4.1.1. Tipos y composición de los aceros inoxidables

El primer acero inoxidable usado como implante fue el tipo 302, contiene cromo en un 18% y níquel en un 8%, el cromo le proporciona una película delgada de óxido de

cromo que lo hace resistente a la corrosión y tiene una estructura cristalina cúbica centrada en las caras. Es más fuerte que el acero al vanadio y más resistente a la corrosión. El acero al vanadio no se utiliza porque tiene una inadecuada resistencia a la corrosión.

Al acero tipo 302 se le agregó una determinada cantidad de molibdeno (Mo) para aumentar su resistencia a la corrosión en agua salada. Este acero es conocido como acero inoxidable tipo 316. En 1950 su contenido de carbón se redujo de 0.08 wt% a 0.03 wt% máximo, para aumentar su resistencia a la corrosión en soluciones de cloruro, éste es conocido como el acero inoxidable 316L. Este acero tiene menos del 0.03 wt% de carbón para reducir la posibilidad de corrosión *in vivo*. La "L" en la designación 316L indica un bajo contenido de carbón. La aleación 316L es básicamente hierro (60-65%) aleado con cromo (17-19%) y níquel (12-14%), más una cantidad pequeña de nitrógeno, manganeso, molibdeno, fósforo, silicio y azufre.

La adición de elementos de aleación involucra la superficie del metal y la microestructura global del material. La adición del cromo permite obtener un acero resistente a la corrosión, formando una capa superficial de óxido ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) fuertemente adherida a la superficie. Sin embargo, el cromo tiende a estabilizar la fase ferrita con estructura cúbica centrada en el cuerpo, la cual es más débil que la fase austenítica cúbica centrada en las caras. El molibdeno y el silicio también estabilizan la fase ferrita, para contrarrestar esta tendencia de formar fase ferrita se agrega níquel el cual estabiliza la fase austenítica [10,13].

Los elementos de aleación específicos y sus cantidades determinan el tipo de acero de aleación y sus propiedades particulares:

- Mayor resistencia y dureza.
- Mayor resistencia al impacto.
- Aumento de la resistencia al desgaste.
- Aumento de la resistencia a la corrosión.
- Mejoramiento de procesabilidad.
- Dureza al rojo (altas temperaturas).
- Aumento de la profundidad a la cual el acero puede ser endurecido (penetración de temple).

En el acero inoxidable resistente a la corrosión, el cromo es el componente de aleación de mayor importancia, la concentración mínima de cromo es del 11 wt%. El cromo es un elemento reactivo pero en la aleación puede ser pasivado para proporcionar una excelente resistencia a la corrosión.

El acero inoxidable en su fase austenítica, especialmente los tipos 316 y 316L, son los más empleados para implantes. Este grupo de aceros es no-magnético y tienen una mejor resistencia a la corrosión. La inclusión de molibdeno aumenta su resistencia a la corrosión por picaduras en agua salada. La ASTM (American Society for Testing and Materials) recomienda el acero 316L, por encima del 316, para fabricación de implantes. En la figura 4.1 se muestran diferentes prótesis de cadera construidas de acero inoxidable 316L. La composición para el acero 316 y 316L se muestra en la tabla 4.1.

Las propiedades mecánicas del acero 316 y 316L se muestran en la tabla 4.2. Como se puede apreciar las propiedades del material cambian dependiendo del tratamiento de calor al que sean sometidos, para obtener materiales blandos o trabajado en frío, para una mayor dureza y mayor esfuerzo a la tensión.

Tabla 4.1

COMPOSICIÓN DEL ACERO INOXIDABLE USADO EN IMPLANTES\*

Elemento	Composición (wt%)	
	316	316L
Carbón	0.08 max	0.03 max
Manganeso	2.00 max	2.00 max
Fósforo	0.03 max	0.03 max
Azufre	0.03 max	0.03 max
Silicio	0.75 max	0.75 max
Cromo	17.00-20.00	17.00-20.00
Níquel	12.00-14.00	12.00-14.00

\* Tomado de *Annual Book of ASTM Standards*, parte 46, Filadelfia, 1980, p. 578.

Tabla 4.2

PROPIEDADES MECÁNICAS DEL ACERO INOXIDABLE\*

Condición	Esfuerzo final a la tensión (MPa)	Límite Elástico min. (MPa)	Elongación en 50.8 mm min. %
<b>Tipo 316</b>			
Recocido	515	205	40
Acabado en frío	620	310	35
Trabajado en frío	860	690	12
<b>Tipo 316L</b>			
Recocido	505	195	40
Acabado en frío	605	295	35
Trabajado en frío	860	690	12

\* Tomado de *Annual Book of ASTM Standards*, parte 46, Filadelfia, 1980, p. 579.

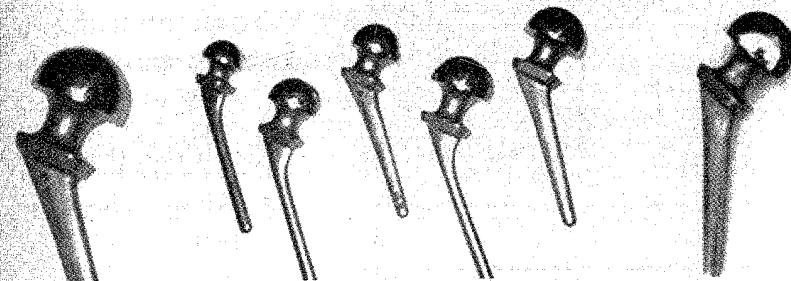


Figura 4.1. Prótesis de cadera construidas de acero inoxidable 316L.

Fuente: <http://www.smglobales.com.ar/>

Molibdeno 2.00-4.00 2.00-4.00

4.2. Cobalto y sus aleaciones

La ASTM recomienda cuatro tipos de aleaciones de cobalto para implantes: 1) aleación de fundición CoCrMo (F75), 2) aleación de forjado CoCrWNi (F90), 3) aleación de forjado CoNiCrMo (F562) y 4) aleación de forjado CoNiCrMoWFe (F563).

Hoy en día solamente las aleaciones 1 y 3 son usadas para fabricar implantes. En la tabla 4.3 se muestra la composición química de estas dos aleaciones.

Los productos de las aleaciones de forjado incluyen piezas como: placas, tiras, barras, perfiles, y productos refilados. Este tipo de aleación es relativamente dúctil y se puede trabajar en caliente o en frío durante la fabricación de los implantes. En la figura 4.2 se muestra un implante dental fabricado con CoNiCrMo.

La aleación se produce principalmente por solución sólida que soporta altos esfuerzos a la deformación y trabajada en frío mejora el esfuerzo a la tensión. Se usa en el forjado de prótesis de cadera para maximizar el esfuerzo a la deformación y por su dureza este tipo de aleación



Tabla 4.3  
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES DE COBALTO  
F75 y F562\*

Elemento	CoCrMo (F75)		CoNiCrMo (F562)	
	Mín	Máx	Mín	Máx
Cr	27.0	30.0	19.0	21.0
Mo	5.0	7.0	9.0	10.5
Ni	-	2.5	33.0	37.0
Fe	-	0.75	-	1.0
C	-	0.35	-	0.025
Si	-	1.0	-	0.15
Mn	-	1.0	-	0.15
W	-	-	-	-
P	-	-	-	0.015
S	-	-	-	0.010
Ti	-	-	-	1.0
Co	Balance			

\* Tomado de *Annual Book of ASTM Standards*, parte 46, Filadelfia, 1980.

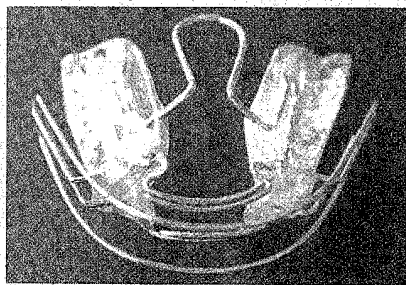


Figura 4.2 Implante dental fabricado en cromo-cobalto.  
Fuente: <http://www.imdmecanicadental.com.ar/>

es difícil de maquinar. Se utilizan piezas moldeables para abatir su costo. El tamaño de grano de la aleación se controla mejor en el forjado, que con las aleaciones de fundición, las cuales tienen un mayor tamaño de grano. Las propiedades mecánicas de las principales aleaciones de cobalto se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4  
PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS ALEACIONES BASADAS EN COBALTO\*

Propiedad	Forjado CoNiCrMo (F562)			
	CoCrMo F(75)	Solución recocida	Trabajada en frío y envejecida	Recocida por completo
Resistencia al esfuerzo (MPa)	655	795-1000	1790	600
Límite elástico (MPa)	450	240-655	1585	276
Elongación (%)	8	50	8	50
Reducción de área (%)	8	65	35	65
Esfuerzo a la fatiga (MPa)	310	-	-	340

\* Tomado de *Annual Book of ASTM Standards*, parte 46, Filadelfia, 1980.

### 4.3. Titanio y sus aleaciones

El titanio es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre con un 0.63% en peso. Se ha usado desde 1930 en la fabricación de implantes cuando se comprobó que era bien tolerado en el fémur de gatos, así como el acero inoxidable y el Vitallium® (aleación de CoCrMo). Ha sido clasificado como metal ligero, a pesar de que su densidad de 4.51 g/cm<sup>3</sup> es casi el doble que la del aluminio, es ligero si se compara con la densidad de 7.9 g/cm<sup>3</sup>

del acero inoxidable (316), con  $8.3 \text{ g/cm}^3$  para la aleación de CoCrMo y  $9.2 \text{ g/cm}^3$  para la aleación de forjado CoNiCrMo. Tiene buenas propiedades mecánicas y está ampliamente recomendado para la fabricación de implantes [24-27]. Se caracteriza por poseer dos formas alotrópicas diferentes: 1) fase  $\alpha$ , hasta  $895^\circ\text{C}$ , con una estructura hexagonal compacta (HCP) y 2) fase  $\beta$ , por encima de  $895^\circ\text{C}$ , con una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC).

El titanio puede ser reforzado por aleación y el tipo de procesado. Tiene una excelente biocompatibilidad, poca o ninguna reacción con tejido circundante. Es resistente a la corrosión, su estabilidad se deriva de superficie con capas de óxido de  $\text{TiO}_2$ . Es deseable como biomaterial (biometal) debido a que tiene un bajo módulo de elasticidad, una alta biocompatibilidad y alta resistencia a la corrosión.

Existen cuatro grados de titanio en las aleaciones que se utilizan ampliamente en implantes; además, tiene impurezas como oxígeno, hierro y nitrógeno que deben ser controladas cuidadosamente. Por ejemplo, el oxígeno influye en la ductilidad y esfuerzo a la deformación del material. En la tabla 4.5 se muestra el contenido de impurezas en los diferentes grados del titanio. También existe una aleación del titanio (Ti6Al4V, del  $6.0 \pm 0.5 \text{ wt}\%$  de aluminio y  $4.0 \pm 0.5 \text{ wt}\%$  de vanadio) que es ampliamente usada para fabricar implantes, su contenido de impurezas también se muestra en la tabla 4.5.

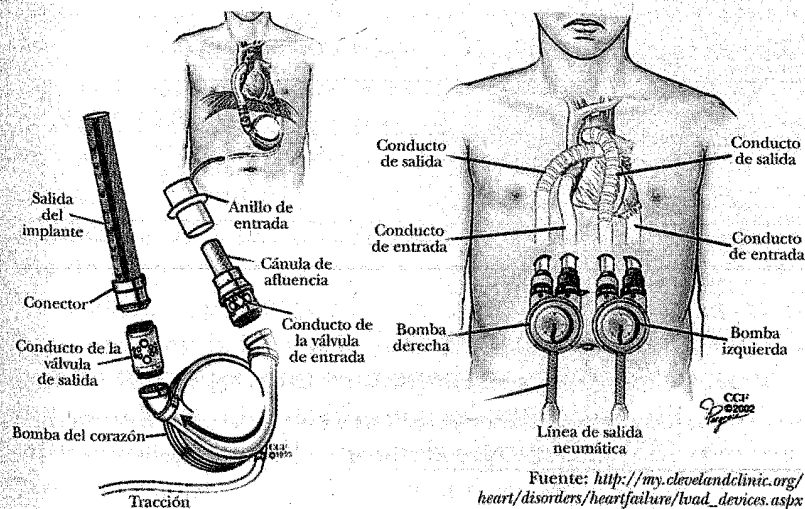
La adición de elementos de aleación permiten que el Ti tenga un amplio intervalo de propiedades.

a) El aluminio tiende a estabilizar la fase  $\alpha$ , aumenta la temperatura de transformación de fase  $\alpha$  a fase  $\beta$ .

b) El vanadio estabiliza la fase  $\beta$ , disminuye la temperatura de transformación de fase  $\alpha$  a fase  $\beta$ .

Tabla 4.5  
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TI Y SUS ALEACIONES\*

Elemento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Ti6Al4V
Nitrógeno	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05
Carbón	0.10	0.10	0.10	0.10	0.08
Hidrógeno	0.015	0.015	0.015	0.015	0.0125
Hierro	0.20	0.30	0.30	0.50	0.25
Oxígeno	0.18	0.25	0.35	0.40	0.13
Titanio			Balance		



Fuente: [http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/heartfailure/tvad\\_devices.aspx](http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/heartfailure/tvad_devices.aspx)

Figura 4.3 Dispositivos de asistencia ventricular.

El titanio y sus aleaciones se usan para fabricar marcapasos, dispositivos de asistencia ventricular (ver figura 4.3), bombas de infusión para drogas, implantes dentales, implantes maxilo-faciales (intra-oral), implantes craneo-faciales, tornillos y grapas para cirugías de la columna

vertebral. Las propiedades mecánicas del Ti comercialmente puro y su aleación 6Al4V se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6  
PROPIEDADES MECÁNICAS DEL TITANIO Y SU ALEACIÓN  
Ti6Al4V (F136)

Elemento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Ti6Al4V
Resistencia al esfuerzo (MPa)	240	345	450	550	860
Límite elástico (MPa)	170	275	380	485	795
Elongación (%)	24	20	18	15	10
Reducción de área (%)	30	30	30	25	25

#### 4.4. Otros metales

Para una variedad de implantes muy especializados se utilizan diferentes metales como el tantalio, el platino y el zirconio [25]. El tantalio tiene una buena biocompatibilidad pero pobres propiedades mecánicas, además de una alta densidad  $16.6 \text{ g/cm}^3$ . Comercialmente se usa en su forma pura (99.90%) para dispositivos médicos, ASTM F560. Posee una buena resistencia a la corrosión además de una excelente biocompatibilidad. Sus principales usos son en: a) alambres de sutura para cerrar piel, en tendones y reparar nervios, b) clips para ligadura de vasos sanguíneos, c) grapas para cirugía abdominal, d) hojas y placas flexibles para craneoplastia y cirugía reconstructiva.

El zirconio a través de la formación de una capa protectora de óxido tiene una buena biocompatibilidad y una buena resistencia a la corrosión.

El platino es extremadamente resistente a la corrosión pero tiene pobres propiedades mecánicas, se usa principalmente en electrodos para marcapasos [26-27].

#### 5. IMPLANTES CERÁMICOS

Los cerámicos son compuestos policristalinos y refractarios, usualmente están formados por compuestos inorgánicos como: silicatos, óxidos metálicos como  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$  y  $\text{SiO}_2$ , contienen elementos metálicos y no metálicos. También pueden estar formados de sales iónicas como el  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CsCl}$  y el  $\text{ZnS}$  y otro tipo de sales como la hidroxiapatita. Entre los cerámicos también se consideran el diamante, el grafito y el carbón pirolítico. En la industria médica estos materiales se usan como lentes, instrumentos de diagnóstico, termómetros, frascos de cultivo celular y fibras ópticas para endoscopios. Las cerámicas se han usado en la industria dental en coronas de porcelana-oro, rellenos dentales y dentaduras debido a que son inertes a los fluidos del cuerpo, resisten altos esfuerzos de compresión y tienen una buena apariencia estética [10,13, 25,27].

Los materiales cerámicos son especialmente atractivos por su estabilidad térmica, su dureza, su rigidez, baja densidad, resistencia al desgaste, a la oxidación y a la corrosión y su resistencia mecánica a la compresión.

Las limitaciones que tienen para ser usados en el campo de los biomateriales son su fragilidad inherente, que provoca poca confiabilidad en sus partes críticas, su costo de producción elevado así como su diseño condicionado.

El tipo de implante que se puede fabricar con cerámicos depende del método de procesado, las características y propiedades dependen directamente del método. Se reconocen cinco métodos primarios para fabricar cerámicos, los cuales permiten identificar cinco categorías de microestructura:

1. Vidrios.
2. Cerámica policristalina a base de plasma de spray.
3. Cerámica sinterizada en fase líquida, vitrificado.
4. Cerámica sinterizada en estado sólido y
5. Vidrio-cerámica policristalino.

La diferencia en la macroestructura de estas cinco categorías depende del proceso térmico seguido para su manufacturación.

### 5.1. La alúmina

Las fuentes principales de alúmina pura (óxido de aluminio) son la bauxita y el corundum. La más común es la alúmina fase  $\alpha$ , la cual se puede preparar calcinando la alúmina de calcio trihidratada. La alúmina natural se conoce como zafiro o rubí, dependiendo el tipo de impurezas las cuales le dan el color. La alúmina tiene una alta densidad y una alta pureza (> 99.5%), se usa en prótesis de cadera y en implantes dentales por su buena compatibilidad, su excelente resistencia a la corrosión, y alta resistencia al desgaste. La mayoría de los dispositivos de  $Al_2O_3$  son policristalinos con un tamaño de grano muy fino (<  $4\mu m$ ), se produce por presión y sinterizado a  $1600-1700^\circ C$ . Se le puede agregar una pequeña cantidad de  $MgO$  (< 0.5%) para ayudar el crecimiento del grano durante el sinterizado. En la figura 5.1 se puede apreciar la estructura cristalina de la alúmina y en la tabla 5.1 se muestran sus propiedades [10,13].

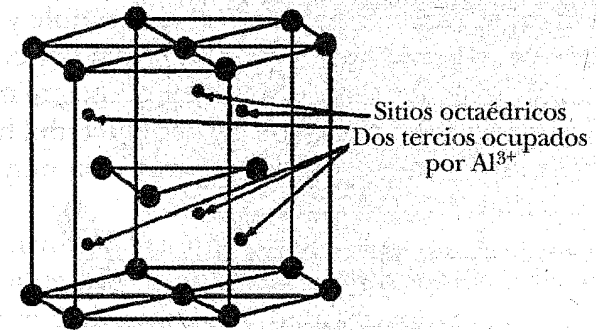


Figura 5.1 Estructura cristalina de la alúmina.

Tabla 4.6  
PROPIEDADES DE LA ALÚMINA

Densidad teórica ( $g/cm^3$ )	3.97
Conductividad térmica (W/mK)	27.2 a 1400k
Resistividad eléctrica ( $\Omega cm$ )	> 1014 ( a $25^\circ C$ )
Microdureza Vickers ( $Kg mm^2$ )	2400-3300
Módulo de Young (GPa)	400
Resistencia a la flexión (MPa)	400
Tenacidad ( $MPa \cdot m^{1/2}$ )	3

### 5.2. Fosfato de calcio

La biocerámica de fosfato de calcio se ha usado en la industria médica y dental desde hace veinte años. Se utiliza para fabricar implantes relacionados con huesos, de tal forma que en los últimos años se ha realizado una gran cantidad de investigaciones en busca de un material sustituto de hueso; también se utiliza como un recubrimiento sólido o poroso sobre otros implantes [10, 13, 25-27].

El fosfato de calcio es totalmente compatible y no tóxico, puede presentarse como un compuesto policristalino, denso o poroso que se convierte en parte integral del tejido vivo. Es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; también se encuentra en la dentina y el esmalte dental.

El fosfato de calcio se puede obtener de forma sintética, conocido como hidroxiapatita, HA, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos. La HA se puede usar como remplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, esfuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos.

### 5.2.1. Estructura del fosfato de calcio

El fosfato de calcio se puede cristalizar como sales, la hidroxiapatita y la  $\beta$ -whitlockita dependiendo de la razón Ca/P, presencia de agua, impurezas y de la temperatura. En un ambiente húmedo y a baja temperatura ( $< 900^\circ\text{C}$ ) se forma la (hidroxil o hidroxil)-apatita, mientras que en una atmósfera seca y a mayor temperatura se forma la  $\beta$ -whitlockita. Ambas formas son muy compatibles y se usan en sustitutos de hueso en forma granular o como bloques sólidos [10,13].

La parte mineral de los huesos y de los dientes está formada de la forma cristalina del fosfato de calcio llamada hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , la cual cristaliza en una estructura de prisma hexagonal rómbico. La relación ideal Ca/P de la hidroxiapatita es de 10:6; su estructura cristalina se puede apreciar en la figura 5.2.

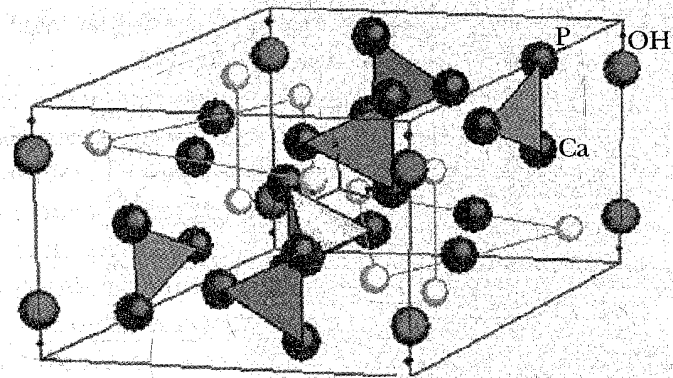


Figura 5.2. Estructura cristalina de la hidroxiapatita, la cual cristaliza en un sistema hexagonal, con valores de red  $a = b = 9.43 \text{ \AA}$  y  $c = 6.88 \text{ \AA}$ .

### 5.2.2. Propiedades de la hidroxiapatita

Las propiedades mecánicas del fosfato de calcio sintético se muestran en la tabla 5.2. La variación de las propiedades mecánicas es resultado de diferentes procesos de fabricación. El método más común para la obtención de HA es el de precipitación. Se obtienen cantidades apreciables del material de forma económica y fácilmente reproducible. En este método se debe controlar el pH, la temperatura de reacción, el tiempo de la reacción, la atmósfera de tratamiento y la relación Ca/P de los reactivos, para impedir la aparición de otras fases como los ortofosfatos. Una HA apropiada para cualquier aplicación específica debe controlar su composición, las impurezas, morfología, cristalinidad, tamaño del cristal y tamaño de las partículas.



Tabla 5.2  
PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA HA

Propiedad	Valor
Módulo elástico (GPa)	40-117
Esfuerzo de compresión (MPa)	294
Resistencia a la flexión (MPa)	147
Dureza (Vickers, GPa)	3.43
Densidad (teórica, g/cm <sup>3</sup> )	3.16

## 6. IMPLANTES POLIMÉRICOS

La palabra polímero procede del griego: *poly* (muchos) y *meros* —reducido a *mer* (parte). Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de formas diversas. La mayoría de los polímeros están formados por estructuras de carbón y por tanto se consideran compuestos orgánicos. Un ejemplo es el polietileno, está hecho a partir del etileno ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) donde los átomos de carbón comparten electrones con dos hidrógenos y entre ellos mismos;  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-$ , *n* indica el número de unidades repetidas. Existen polímeros naturales de gran valor comercial, y gran parte de los que usamos en nuestra vida diaria, son materiales sintéticos con propiedades y aplicaciones variadas [28].

También existen polímeros formados por átomos diferentes al carbón en la cadena principal como es el caso de los derivados del silicio como el polidimetilsiloxano ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2[\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2]_n\text{O}-$ ). Los átomos de los grupos laterales se pueden cambiar, es decir si se sustituyen los átomos de hidrógeno en el polietileno por átomos de flúor, el resultado es el material conocido como teflón (politetrafluoroetileno).

### 6.1. Tipos de polímeros. Estructura de la cadena

Las estructura polimérica más simple es la de cadena lineal, que se representa por una cadena lineal con dos terminales. El polímero ramificado, tiene cadenas laterales o ramas de longitud considerables que están unidas a la cadena principal en los puntos de ramificación, también conocidos como puntos de unión y se caracterizan por medio del número o tamaño de las ramas, una representación de estos polímeros se muestra en la figura 6.1. Las redes poliméricas tienen estructuras tridimensionales en las cuales las cadenas están conectadas unas con otras por secuencias de puntos de unión. Estos polímeros están entrecruzados y se caracterizan por la densidad del entrecruzamiento o grado de entrecruzamiento.

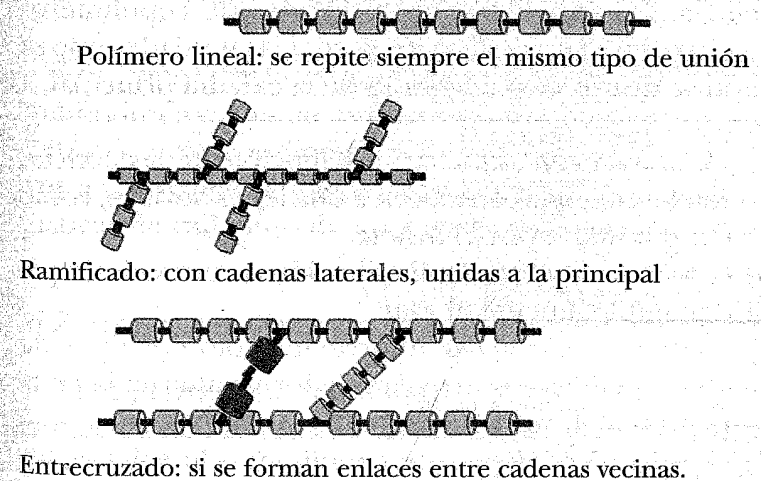


Figura 6.1. Estructuras poliméricas.

### 6.1.1. Homopolímeros

Formalmente definido un homopolímero es un polímero derivado de una sola especie de monómero. Sin embargo el término se usa para describir polímeros cuyas estructuras pueden ser representadas por múltiples repeticiones de un tipo de unidad, que puede contener una o más especies de unidades monoméricas.

### 6.1.2. Copolímeros

Es un polímero derivado de más de una especie de monómeros. La palabra copolímero se usa para describir polímeros que contienen dos o más tipos de unidades repetidas. Existen diferentes categorías de copolímeros caracterizados por la forma en la cual las unidades que se repiten se distribuyen a lo largo de la cadena principal, a saber:

- Copolímero estadístico*: su distribución de secuencias de unidades repetidas obedecen a una ley estadística, como por ejemplo una ley markoviana.
- Copolímero aleatorio*: la distribución de unidades repetidas es completamente al azar.
- Copolímeros alternados*: intervienen sólo dos tipos de unidades repetidas y se arreglan de forma alternada en la cadena principal, ver figura 6.2.
- Copolímeros en bloque*: son copolímeros lineales en los cuales las unidades repetidas se forman en secuencias o bloques de un solo tipo de monómero.
- Copolímeros de injerto*: son polímeros con ramas poliméricas que tienen una estructura química diferente de la cadena principal.

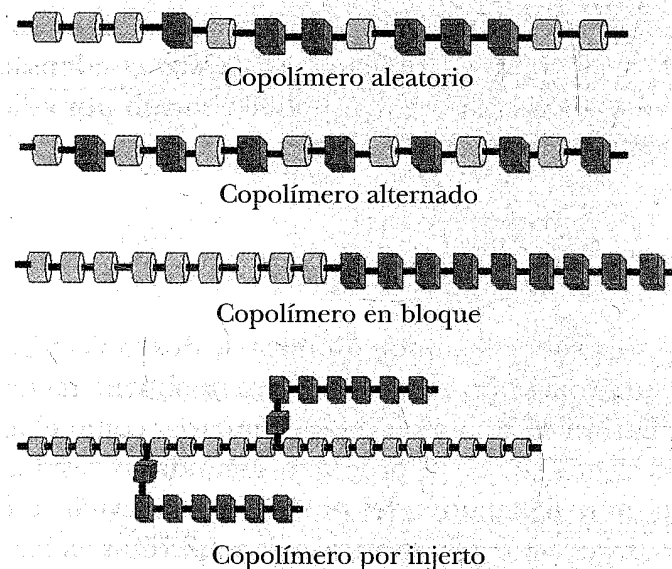


Figura 6.2. Estructuras de los copolímeros.

Los copolímeros estadísticos, aleatorios y alternados generalmente tienen propiedades que son intermedias con sus correspondientes homopolímeros. Los copolímeros en bloque y de injerto muestran propiedades características de cada uno de los constituyentes.

### 6.2. Síntesis de polímeros

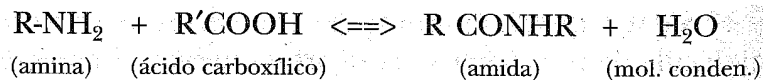
El requerimiento mínimo para polimerizar es que cada molécula de monómero sea capaz de unirse, al menos, a dos (o más) moléculas de monómero por medio de una reacción química; los monómeros deben tener una funcionalidad de dos (o mayor). Dado este simple requerimiento hay un sinnúmero de reacciones químicas y diferentes tipos de monómeros que pueden usarse para llevar a cabo la polimerización.

Los métodos de polimerización se caracterizan en dos grandes categorías: i) polimerización por condensación (crecimiento por pasos) y ii) polimerización por adición (reacción de cadena).

### 6.2.1. Polimerización por condensación

En este proceso la unión química de dos moléculas distintas en proporción estequiométrica se obtiene mediante la formación de una molécula secundaria, como el agua, que es condensada. El producto secundario residual se extrae inmediatamente del polímero para evitar la inhibición del proceso o la aparición de impurezas en los productos finales. Al comparar este método con el de adición hay que señalar la ausencia de iniciador, la práctica desaparición de monómeros al iniciarse la polimerización, generando dímeros, trímeros, etcétera y el final del crecimiento se consigue añadiendo moléculas monofuncionales.

Un ejemplo de la polimerización por condensación es el proceso para hacer poliamidas (nylon) el primer producto comercial, hecho en 1930:



Algunos polímeros sintetizados por condensación se muestran en la tabla 6.1.

Tabla 6.1  
POLÍMEROS POR CONDENSACIÓN

Tipo	Unidad repetida
Poliéster	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$
Poliamida	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\    \quad    \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array}$
Poliurea	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \\   \quad    \quad   \\ -\text{N}-\text{C}-\text{N}- \end{array}$
Poliuretano	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\    \quad   \\ -\text{O}-\text{C}-\text{N}- \end{array}$
Polisiloxano	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ -\text{Si}-\text{O} \\   \\ \text{R} \end{array}$
Proteína	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\    \quad   \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array}$
Celulosa	$- \text{C} - \text{O} - \text{C} -$

### 6.2.2. Polimerización por adición

En este tipo de polimerización, los monómeros insaturados reaccionan con un iniciador, tienen un proceso de propagación de cadena y, finalmente, llegan al paso de terminación para formar el producto final (figura 6.3). Por lo general se usa el iniciador para romper el doble enlace, y este puede ser un radical libre, un catión, un anión o un catalizador específico. El iniciador abre el doble enlace de los monómeros, presentando otro sitio para seguir creciendo.

Las cadenas poliméricas crecen rápidamente durante el paso de propagación hasta que la reacción termina por la reacción con otro radical, molécula de solvente, un iniciador o agentes de transferencia de cadena. Un ejemplo de este tipo de polimerización es el caso del etileno (figura 6.4).

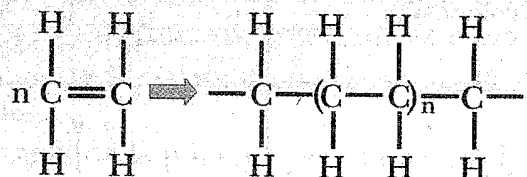


Figura 6.3. Polimerización del etileno.

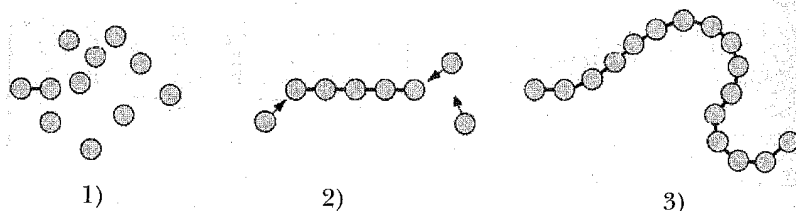


Figura 6.4. Polimerización por adición: 1) Iniciación ocasionada por un radical libre. 2) Propagación de la cadena. 3) Terminación.

El proceso de iniciación también puede ser activado por calor, luz ultravioleta u otro agente químico. En este tipo de polimerización no se generan productos secundarios.

### 6.3. Propiedades de los polímeros

Las propiedades físicas y químicas de los polímeros pueden afectarse de muchas formas. En particular la composición química y el arreglo de las cadenas poliméricas tienen un gran efecto sobre las propiedades finales del material.

#### 6.3.1. Peso molecular

Muchas de las propiedades de los polímeros muestran una fuerte dependencia del tamaño de la cadena polimérica. Normalmente se mide la masa molar ( $M$ ) de un polímero, la cual es la masa de un mol de polímero y se cuantifica en unidades de  $\text{g mol}^{-1}$  o  $\text{kg mol}^{-1}$ . El término peso molecular se usa en lugar del de masa molar y es una cantidad adimensional, por ejemplo un peso molecular de 100 000 es equivalente a una masa molar de  $100\,000 \text{ g mol}^{-1}$ .

La masa molar de un homopolímero está relacionada con el grado de polimerización ( $x$ ), que es el número de unidades repetidas en la cadena polimérica,

$$M = xM_0$$

donde  $M_0$  es la masa molar de la unidad repetida. En el caso de copolímeros, la suma de los productos  $xM_0$  para

cada tipo de unidad repetida es la masa molar del copolímero. Los polímeros consisten de macromoléculas cuyas masas molares no son iguales, por lo que se tiene una distribución de masa molecular, la cual se reporta como un promedio, dependiendo del método como se evalué se pueden tener diferentes tipos de promedios, por ejemplo, peso molecular promedio en número:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

y peso molecular promedio en peso:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum (N_i M_i) M_i}{\sum N_i M_i}$$

Un ejemplo típico de distribución de masa molar y sus pesos moleculares se muestra en la figura 6.5.

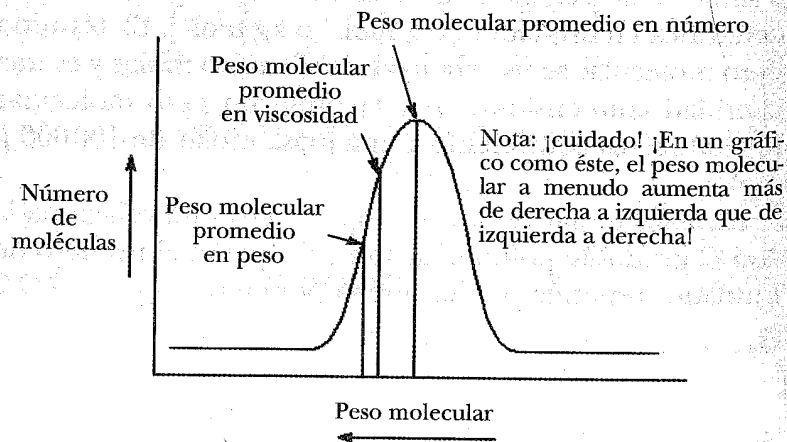


Figura 6.5. Distribución del peso molecular en polímeros.

### 6.3.2. Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es aquella a la que se da una pseudotransición termodinámica en materiales vítreos por lo que se encuentra en vidrios, polímeros y otros materiales inorgánicos amorfos. Para los polímeros la  $T_g$  es la temperatura a la cual dejan de ser rígidos y comienzan a ser ahulados o blandos. Es un punto intermedio de temperatura entre el estado fundido y el estado rígido del material. Arriba de la  $T_g$  los enlaces secundarios de las moléculas son mucho más débiles que su movimiento térmico, por ello el polímero se torna ahulado y adquiere cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica sin fracturarse.

Hay cambios muy importantes en las propiedades fisicoquímicas del material cuando llega a la  $T_g$ ; por ejemplo, si se reduce la temperatura debajo de ésta el polímero se vuelve más rígido. Uno de los métodos más usados para demostrar la transición vítrea y determinar la  $T_g$  es medir el volumen específico de una muestra de polímero en función de la temperatura, como se muestra en la figura 6.6. Abajo y arriba de la temperatura de transición vítrea hay un cambio lineal del volumen específico con la temperatura, pero en la vecindad de  $T_g$  hay un cambio importante en la pendiente de la curva. La  $T_g$  se toma como el punto en el cual se cruzan las dos líneas rectas.

### 6.3.3. Cristalinidad

Los materiales sólidos pueden clasificarse de acuerdo a su estructura molecular en cristalinos y amorfos (figura 6.7).

En los sólidos cristalinos, las moléculas se encuentran ordenadas de forma simétrica en un arreglo tridimensional.



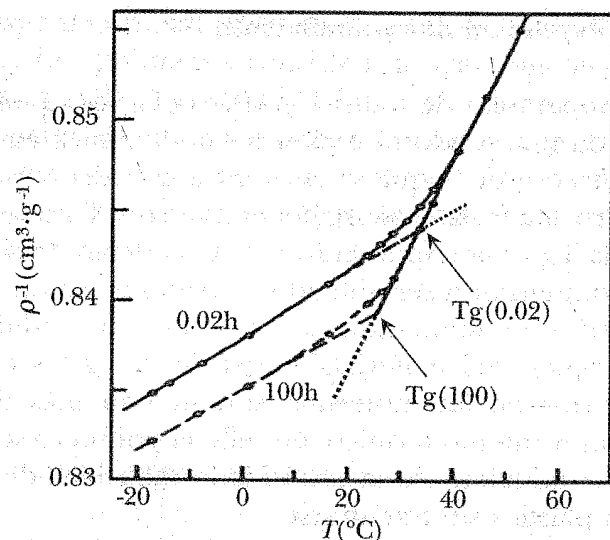


Figura 6.6. Variación de la densidad en función de la temperatura. Se debe recordar que el volumen específico es el inverso de la densidad:  
 $v = 1/\rho$ .

En el caso de los polímeros, las cadenas son muy largas y fácilmente se enmarañan y en el estado fundido se mueven en un medio muy viscoso por lo que no tienen un orden perfecto, algunos polímeros exhiben ordenamiento parcial en regiones llamadas cristalitas.

Una sola macromolécula no cabrá en uno de esos cristalitas, así que se dobla sobre ella misma para formar una estructura ordenada de manera local.

La proporción o porcentaje de zonas cristalinas puede ser muy alta, como ocurre en el polietileno, el nylon y la celulosa. En estos casos puede considerarse que el material contiene una sola fase, que es cristalina, aunque con muchos defectos.

En otros polímeros, como el PVC, el grado de cristalinidad es mucho menor y es más razonable considerarlo

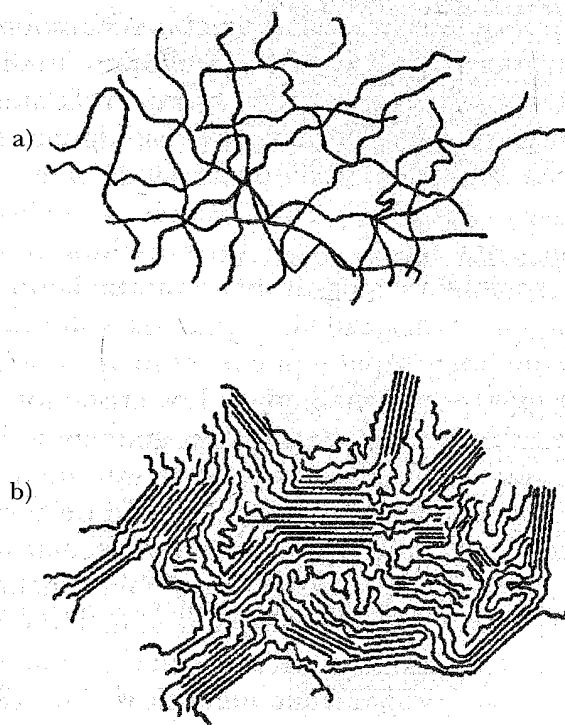


Figura 6.7. Estructuras poliméricas. a) Polímero de estructura amorfa. b) Polímero de estructura cristalina.

como un sistema de dos fases, una ordenada y otra cristalina, esta última se encuentra embebida en la fase amorfa. Hay otros polímeros totalmente amorfos, como es el caso del poliestireno atáctico.

Si el polímero cristaliza a partir del material fundido, habrá más imperfecciones porque las cadenas se enredan y el medio es muy viscoso, lo cual dificulta su ordenamiento. Por el contrario, si el polímero cristaliza de una solución diluida, es posible obtener cristales aislados, con estructuras bien definidas, como en el caso del polietileno, de donde se distinguen las llamadas lamelas cristalinas,

formada por cadenas dobladas muchas veces sobre sí mismas. La cristalización a partir del polímero fundido conduce a la situación descrita más arriba, en la que se tendrán dos fases: cristalina y amorfa, con algunas cadenas participando en varios cristalitas, actuando como moléculas de unión.

También es frecuente que los cristalitas mismos se agrupen radialmente a partir de un punto de nucleación y crezcan en forma radial, formando esferulitas. Un enfriamiento muy rápido puede reducir considerablemente el grado de cristalinidad. Los cristalitas pueden agruparse además de otras maneras generando fibrillas. La formación de fibrillas en lugar de esferulitas dependerá de factores tales como la flexibilidad de la cadena y las interacciones entre ellas, el peso molecular del polímero, la velocidad del enfriamiento y en muchos casos del tipo de esfuerzo al que se somete al material durante el proceso. La presencia de cristalitas en el polímero tiende a aumentar sus propiedades mecánicas, un comportamiento térmico único y un incremento en el esfuerzo a la fatiga. Estas propiedades de los polímeros semicristalinos los hacen deseables para aplicaciones biomédicas.

A medida que aumenta la cristalinidad del polímero: i) aumenta su densidad, ii) aumentan su rigidez, su resistencia y su dureza iii) se vuelve más resistente al calor y iv) si el polímero es transparente en estado amorfo, se vuelve opaco cuando cristaliza.

#### 6.3.4. Punto de fusión

La fusión de cristales poliméricos es el proceso inverso al de la cristalización. No es posible definir una temperatura de fusión única para una muestra polimérica; generalmente el fundido se lleva a cabo en un intervalo de

temperatura. El comportamiento del fundido depende de la historia térmica de la muestra y en particular, de la temperatura de transición vítrea. La fusión es algo que ocurre en los polímeros cristalinos, mientras que la transición vítrea sólo sucede en polímeros en estado amorfo.

Un polímero a menudo tendrá dominios tanto cristalinos como amorfos, de modo que la muestra exhibirá un punto de fusión y una T<sub>g</sub>, pero las cadenas que funden no son las mismas que experimentan transición vítrea.

#### 6.3.5. Comportamiento mecánico

Las propiedades mecánicas de un polímero pueden ser caracterizadas por su deformación cuando se le aplican esfuerzos, curva de esfuerzo-deformación. La figura 6.8 compara estas curvas típicas para diferentes clases de

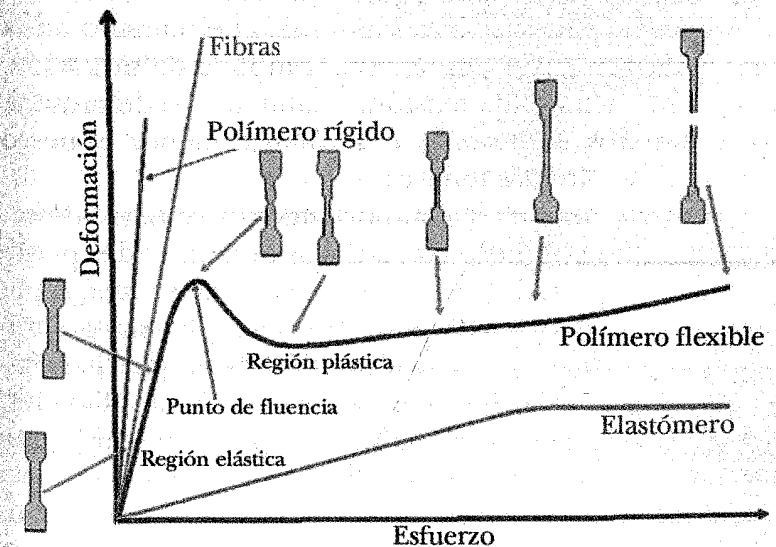


Figura 6.8. Curva de esfuerzo-deformación en materiales poliméricos.

polímeros. La curva de pendiente mayor corresponde al comportamiento de polímeros rígidos como el poliestireno poli(metil metacrilato) y policarbonato. Este tipo de polímeros pueden soportar un gran esfuerzo, pero se rompen antes de deformarse. No hay un área grande bajo la curva, por lo tanto estos materiales soportan un gran esfuerzo, pero carecen de tenacidad y son más bien frágiles.

En la figura 6.8 también se puede apreciar el comportamiento de las fibras como el Kevlar y el nylon. Al igual que los polímeros rígidos, son más resistentes que tenaces, y no muestran un punto de cedencia, presentan una gran resistencia cuando el esfuerzo es longitudinal. Algunas fibras poliméricas como el Kevlar y el polietileno de ultra alto peso molecular tienen una mayor resistencia a la tensión que el acero.

Los polímeros plásticos como el polietileno y el poli-propileno difieren de los rígidos que ceden y tienen una deformación plástica. El módulo inicial es elevado en la región elástica y resisten por un tiempo la deformación. Si se ejerce demasiada tensión, finalmente se deformará. Los polímeros plásticos se deforman a menor esfuerzo pero son mucho más tenaces.

Es posible alterar el comportamiento esfuerzo-deformación de un polímero con aditivos denominados plastificantes. Un plastificante es una molécula pequeña que hace más flexible al polímero. Por ejemplo, sin plastificantes el poli(cloruro de vinilo), PVC, es un plástico rígido que se usa en las tuberías de agua. Con plastificantes, el PVC es lo suficientemente flexible para fabricar juguetes como las albercas inflables.

Los elastómeros como el poliisopreno y polibutadieno, tienen un comportamiento mecánico muy diferente a los anteriores. La curva de esfuerzo-deformación de este tipo

de materiales muestra una menor pendiente en la zona elástica y por lo tanto un menor módulo de Young. Ceden a menores esfuerzos y su tenacidad no es muy grande porque los esfuerzos son pequeños.

#### 6.4. *Materiales poliméricos utilizados como implantes*

Los materiales poliméricos ofrecen una amplia variedad de aplicaciones en implantes biomédicos debido a que se pueden fabricar en diferentes formas: fibras, películas, varillas y líquidos viscosos. Los polímeros tienen una semejanza estrecha con los componentes poliméricos de los tejidos naturales tal como el colágeno. En algunos casos es posible lograr el enlace entre polímeros sintéticos y polímeros del tejido. Un ejemplo es el enlace de la proteína heparina sobre una superficie polimérica (silicón, poliuretano, etcétera) para prevenir la coagulación de la sangre. Los polímeros adhesivos pueden usarse para cerrar heridas o como pegamento en implantes ortopédicos.

##### 6.4.1. *Poliamidas (nylon)*

Las poliamidas forman una familia de polímeros tanto naturales como sintéticos cuya característica común es la presencia de grupos amida (-CONH-), son también conocidas como nylon y se denominan por el número de átomos de carbono en la unidad repetida. Los nylons pueden ser polimerizados en una reacción de condensación y por rompimiento de anillo. El hidrógeno del grupo amida puede formar puentes de hidrógeno ocasionando interacciones muy fuertes que tiene repercusiones impor-

tantes sobre las propiedades mecánicas del material. Un incremento en el número de grupos amida ocasiona un aumento en las propiedades físicas tales como el esfuerzo a la tensión. Tienen una excelente habilidad par formar fibras. El esfuerzo específico de estas fibras, como el Kevlar® es cinco veces más alto que el del acero.

Las poliamidas naturales son las proteínas que tienen una composición química muy compleja y están unidas a una larga secuencia de aminoácidos. Entre las poliamidas sintéticas se encuentran los nylons y los polipéptidos, el Kevlar® fabricado por Dupont.

Los nylons son higroscópicos y pierden su excelente propiedad de resistencia al esfuerzo cuando son implantados en vivo. Las moléculas de agua sirven como plastificante y ataca la región amorfa. Las enzimas proteolíticas ayudan a la hidrólisis atando al grupo amida. En la tabla 6.2 se muestran algunas de las propiedades físicas de varios tipos de amidas.

Tabla 6.2  
PROPIEDADES DE POLIAMIDAS

Propiedad	Tipo					
	66	610	6	11	Aramida	Kevlar
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	1.14	1.09	1.13	1.05	1.30	1.45
Esfuerzo a la tensión (MPa)	76	55	83	59	120	2700
Elongación (%)	90	100	300	120	< 80	2.8
Módulo elástico (GPa)	2.8	1.8	2.1	1.2	> .8	1.30
Temperatura de reblandecimiento (°C)	265	220	215	185	275	---

#### 6.4.2. Polietileno

El polietileno y el polipropileno y sus copolímeros son llamados polioleofinas y son termoplásticos lineales. El polietileno es un polímero comercial disponible en tres presentaciones: lineal, de alto peso molecular y de ultra alto peso molecular. La unidad repetida para formar polietileno se muestra en la figura 6.3. Debido al grupo lateral del hidrógeno es casi imposible sintetizar polietileno no cristalino. Su cristalinidad es del 50 al 70 por ciento y del 70 al 80 por ciento para polietileno de baja y alta densidad respectivamente. Algunas de las propiedades físicas del polietileno se muestran en la tabla 6.3.

El polietileno de ultra alto peso molecular ha sido ampliamente usado para fabricar implantes ortopédicos, especialmente para superficies de carga tales como implantes de cadera y rodilla.

Tabla 6.3  
PROPIEDADES FÍSICAS DEL POLETILENO

Propiedad	Baja densidad	Alta densidad	UHMWPE	Aumento de UHMWPE
Peso molecular (g/mol)	$3-4 \times 10^3$	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	Igual
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	0.90-0.92	0.92-0.96	0.93-0.94	Igual
Esfuerzo a la tensión (MPa)	7.6	23-40	27 min	Mayor
Elongación (%)	150	400-500	200-250	Igual
Módulo elástico (MPa)	96-260	410-1240	Cerca de 2200	2200
Cristalinidad (%)	50-70	70-80	mayor	mayor

### 6.4.3. Polipropileno

El polipropileno se puede sintetizar usando la catálisis estereoespecífica de Ziegler para controlar la posición de cada grupo lateral. Este tipo de polimerización permite la formación de una estructura de cadena regular, figura 6.9.

Para este polímero existen tres diferentes tipos de estructura dependiendo de la posición del grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) a lo largo de la cadena polimérica. Una distribución aleatoria del grupo metilo da como resultado un polímero amorfo de tipo atáctico con un empaquetamiento cerrado de sus cadenas. Las estructuras del polipropileno isotáctico y sindioatáctico tienen una posición regular del grupo lateral metilo en el mismo lado o lados alternados. Este tipo de polímero usualmente cristaliza, pero la presencia del grupo lateral restringe el movimiento de la cadena polimérica y la cristalización raramente excede del 50-70%. La tabla 6.4 muestra las propiedades físicas del polipropileno comercial.

El polipropileno tiene un alto tiempo de vida media, se ha probado en prótesis para uniones de dedos ya que tiene una excelente resistencia al esfuerzo por craqueo.

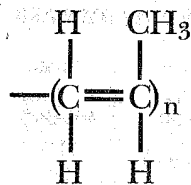


Figura 6.9. Estructura química del polipropileno.

Tabla 6.4

PROPIEDADES FÍSICAS DEL POLIPROPILENO

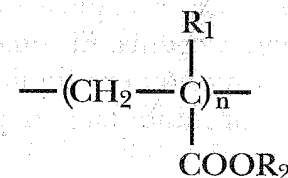
Propiedad	Valor
Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0.90 - 0.91
Esfuerzo a la tensión (MPa)	26 - 36
Elongación (%)	400-900
Módulo elástico (GPa)	1.1 - 1.55
Temperatura de reblandecimiento ( $^{\circ}\text{C}$ )	150

### 6.4.4. Poliacrilatos

Estos polímeros se usan ampliamente en aplicaciones biomédicas, como lentes de contacto duros, lentes intraoculares implantables, cemento óseo para fijación de prótesis, prótesis dentales y maxilofaciales. Tienen excelentes propiedades físicas, se pueden colorear fácilmente y su fabricación es sencilla [13].

#### 6.4.4.1. Propiedades de los acrilatos e hidrogeles

La estructura básica de los acrílicos se puede representar como:

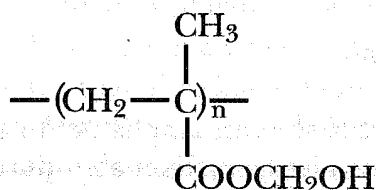


La única diferencia entre el polimetil acrilato (PMA) y el polimetil metacrilato (PMMA) es el grupo R. Para



PMA, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son H y CH<sub>3</sub>, y para PMMA son ambos CH<sub>3</sub>. Estos materiales se pueden sintetizar por adición. Tienen una excelente resistencia a los ataques químicos y una alta biocompatibilidad en su forma pura, además el PMMA es un material muy duro.

El primer hidrogel polimérico fue el polihidroxietil metacrilato, también conocido como poly-HEMA el cual puede absorber más del 30% de su peso de agua. Esta propiedad hace que sea aplicado en lentes de contacto blandos. Su fórmula química es:



El grupo OH es el grupo hidrofílico responsable de la hidratación del polímero. Generalmente los hidrogeles para lentes de contacto se hacen por polimerización de un monómero hidrofílico con pequeñas cantidades de un agente entrecruzante como el etilen glicol dimetacrilato [10].

#### 6.4.4.2. Cemento óseo (PMMA)

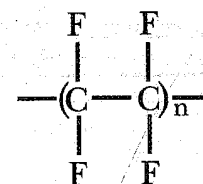
El cemento óseo se usa en aplicaciones clínicas para fijar prótesis de cadera y rodilla. El cemento óseo se hace de polvo de PMMA y monómero líquido de metil metacrilato. Se adiciona hidroquinona para prevenir una polimerización prematura. También se adiciona N,N-dimetil-p-toluidine para promover el curado en frío. La composición del cemento óseo se muestra en la tabla 6.5.

Tabla 6.5  
COMPOSICIÓN DEL CEMENTO ÓSEO

Componente Líquido (20ml)	
Metil metacrilato (monómero)	97.4%
N,N-dimetil-p-toluidino	2.6 vol%
Hidroquinona	75 ± 15 ppm
Componente sólido (40g)	
Polimetil metacrilato	15.0 peso%
Copolímero metilmetacrilato-estireno	75.0 peso%
Sulfato de bario (BaSO <sub>4</sub> )	10.0 peso%
Peroxido de dibenzoilo	---

#### 6.4.5. Polímeros fluocarbonados

El más conocido de los polímeros fluocarbonados es el politetrafluoroetileno (PTFE) conocido como Teflón® de Dupont. Está hecho de tetrafluoroetileno bajo presión con un catalizador de peróxido en presencia de un exceso de agua para remover el calor generado por la reacción de polimerización. La unidad repetida es:



Este polímero es cristalino (94% de cristalinidad) con un peso molecular de 0.5-5 × 10<sup>6</sup>g/mol. Tiene una alta densidad (2.15-2.2 g/cm<sup>3</sup>), bajo módulo elástico (0.5 GPa) y esfuerzo a la tensión de 14 MPa, una baja tensión superficial (18.5 ergs/cm<sup>2</sup>) y un coeficiente de fricción

de 0.1 [10, 13, 26]. El PTFE no puede ser moldeado o extruido porque tiene una alta viscosidad y no puede ser plastificado.

#### 6.4.5.1. Ejemplos de polímeros en medicinas

Polímeros	Aplicación
Poliétileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE)	Rodilla, cadera y articulaciones del hombro
Silicón	Articulaciones de dedos
Ácido poliláctico, ácido poliglicólico, nylon	Suturas
Polimetil metacrilato	Cemento óseo
Acetato, polietileno, poliuretano	Marcapaso, desfibriladores
Poliéster, politetrafluoroetileno, PVC	Contenedores de sangre
Hidrogeles	Oftalmología
Polimetilsilano, poliuretano, PVC	Prótesis faciales

#### 6.4.5.2. Aplicaciones de biomateriales poliméricos

Área de Aplicación	Ejemplo
Ortopedia	Reemplazo de rodilla y cadera, cemento óseo, rellenos óseos, placas para fijación de fracturas, tendones y ligamentos artificiales.
Cardiovascular	Injertos vasculares, válvulas cardíacas, marcapasos, corazón artificial, componentes de dispositivos de asistencia ventricular.
Oftálmicos	Lentes de contactos, implantes de córnea artificial, lentes intraoculares.
Otros	Implantes dentales, implantes cocleares, clavos y tornillos, adhesivos para tejidos, sistemas liberadores de drogas, suturas.

## 7. COMPOSITOS COMO BIOMATERIALES

Los materiales compuestos o compositos son aquellos que tienen dos o más materiales constituyentes o fases. El término composito se reserva a los materiales que tienen diferentes fases a una escala mayor que la atómica y algunas de sus propiedades, como el módulo elástico, es modificado significativamente en comparación con los materiales homogéneos. Los plásticos reforzados con fibra de vidrio así como el hueso son compositos, y aleaciones como el acero inoxidable no es considerado un composito [10,13].

### 7.1. Estructura

Las propiedades del composito dependen de su estructura, tienen una o más fases discontinuas embebidas dentro de una fase continua. La fase discontinua es normalmente más dura y fuerte que la fase continua y es llamado el material reforzante, mientras que la fase continua es llamada la matriz. Las propiedades de los compositos son influidas por las propiedades de los materiales constituyentes, en particular, de la forma de las inhomogeneidades, de la fracción volumen ocupada por ellos y de la interfase entre los constituyentes. La forma de las inhomogeneidades se clasifican como:

- a) Partículas, sin dimensiones de longitud.
- b) Fibras, con una dimensión en longitud.
- c) Láminas o placas, con dos dimensiones en longitud.

## 7.2. Sistemas reforzados

El material de refuerzo que comúnmente se usa en compositos biomédicos son las fibras de carbono, fibras poliméricas, cerámicas y vidrios. Dependiendo de su aplicación el material de refuerzo puede ser inerte o absorbible.

### 7.2.1. Fibras de carbón

Las fibras de carbón que se usan en biomateriales se producen en base a una fibra precursora de acrilonitrilo en un proceso de tres pasos:

i) Estabilización. Las fibras de acrilonitrilo se estiran hasta alinearse en una red fibrilar, cada fibra se alinea paralelamente a su eje axial y entonces son oxidadas en aire a 200-800°C y puestas en tensión.

ii) Carbonización. Las fibras estabilizadas son pirolizadas; son calentadas en un ambiente controlado hasta que se transforman en fibras de carbón por la eliminación de la fibra precursora de los elementos O, H y N. La carbonización se realiza a una temperatura de 1000-1500°C en una atmósfera inerte.

iii) Grafitización (*graphitization*). En este paso se forman fibras o listones de carbón grafitado aumentando el esfuerzo a la tensión del material.

### 7.2.2. Fibras poliméricas

En la mayoría de las aplicaciones, las fibras poliméricas no son tan rígidas o fuertes como para usarse como material de refuerzo de otro polímero. Las posibles excepciones

son las fibras de aramida, las de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMW) y ciertas fibras que se usan por ser absorbibles.

*Fibras de aramida* es el nombre genérico de las fibras de poliamida, fue introducido comercialmente con el nombre de Kevlar. Los compositos de Kevlar tienen un alto esfuerzo a la tensión y son rígidos, son resistentes al daño mecánico y a la fatiga. Sus aplicaciones potenciales en biomédica son: prótesis de cadera, dispositivos para fijación de fracturas y prótesis de ligamentos y tendones.

Las fibras de polietileno de UHMW tienen una excelente biocompatibilidad pero no se usan comúnmente como biomateriales.

## 7.3. Aplicaciones de los compositos como biomateriales

En el contexto de biomateriales es necesario que cada parte constituyente del composito sea biocompatible y que la interfase entre los constituyentes no se degrade por el ambiente del huésped. Los compositos normalmente se usan como relleno dental, metilmetacrilato reforzado con fibras de carbón como cemento óseo y en superficies porosas para implantes ortopédicos [19, 20, 29, 30].

## 8. RESPUESTA DE LOS TEJIDOS A LOS IMPLANTES

Cuando un biomaterial es implantado en un sitio de lesión, el cirujano empieza por abrir la piel y el músculo hasta llegar al sitio donde va a situar el implante, durante este proceso el cirujano daña diferentes tipos de tejidos. En la figura 8.1 se muestra cómo se introduce el biomaterial al sistema biológico [11].

1) Un cirujano implanta el biomaterial en el sitio de la lesión a través de un procedimiento quirúrgico.

2) Rápidamente, el implante adsorbe una capa de proteínas, proceso normal de una superficie sólida en fluidos biológicos.

3) Las células (neutrófilos y macrófagos) interrogan y atacan al "invasor", el biomaterial.

4) Cuando los macrófagos no pueden digerir el implante, se fusionan para formar células gigantes que puedan engullir al objeto. Sin embargo, es demasiado grande para ingerirlo completamente. Las células gigantes envían mensajeros químicos (citocinas) para llamar a otras células.

5) Llegan fibroblastos y empiezan a sintetizar colágeno.

6) La fase final de la reacción tiene al implante completamente encerrado en una bolsa de colágeno. Entre los macrófagos y el implante hay una bolsa de colágeno.

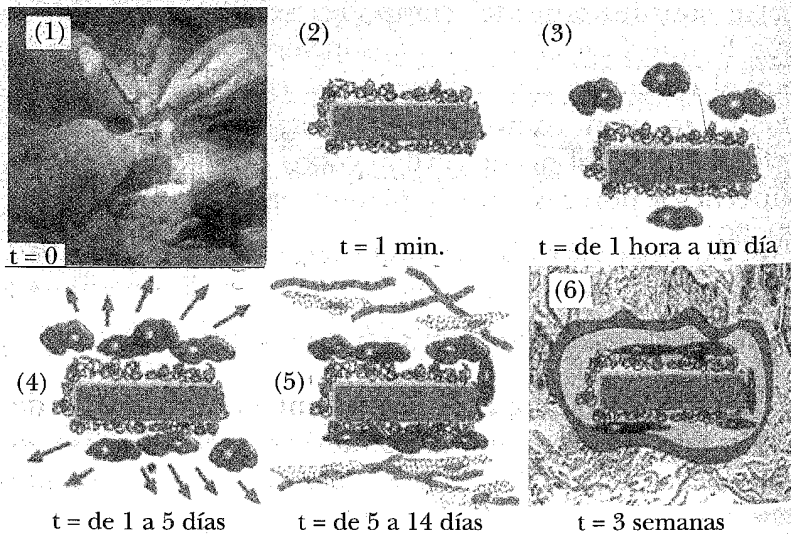


Figura 8.1 Proceso de respuesta al introducir un biomaterial en un ambiente biológico [11].

La respuesta del tejido al daño ocasionado por la cirugía puede variar de acuerdo al sitio de lesión, contaminación, etcétera. Sin embargo, la inflamación y la respuesta celular a la herida es igual para cualquier sitio lesionado. Una herida es la interrupción de continuidad de los tejidos con tendencia espontánea a la curación. La cicatrización es la reacción natural al traumatismo, que restaura la integridad de los tejidos.

### 8.1. Proceso normal de cicatrización

Cuando un tejido es dañado o destruido, las células adyacentes responden para repararlo, la respuesta inmediata del huésped a cualquier daño o destrucción de algún tejido es la inflamación. Cuando un daño ocurre se da la inmediata constricción de los capilares para detener el sangrado, simultáneamente entran en actividad las células endoteliales que son las que recubren los capilares.

La capacidad del huésped para remplazar células dañadas o muertas y reparar tejidos después de la inflamación es crítica para la supervivencia. Cuando los agentes nocivos dañan las células y tejidos, el huésped responde poniendo en marcha una serie de sucesos que sirven para eliminar estos agentes, contener el daño y reparar las células sobrevivientes para su replicación. La curación del tejido dañado provocada por una operación quirúrgica, herida y diversos tipos de lesión crónica pueden separarse de forma amplia en dos procesos: regeneración y reparación [10,13].

a) *Regeneración*: consiste en una restitución de los tejidos perdidos, se lleva a cabo por el recubrimiento de las células epiteliales, se inicia en las primeras horas pos-

trauma con una alta producción de plaquetas, macrófagos y colagenasa. Se nota la formación de una monocapa que avanza bajo el coágulo o costra. El contacto entre si inicia las mitosis y estratificación celular [13].

b) *Reparación*: puede restaurar las estructuras originales pero implica depósito de colágeno y la formación de cicatriz, para lograr una adecuada cicatrización es necesario tener un adecuado manejo según el tipo de herida. Es necesario tener el conocimiento de la técnica y materiales para favorecer la cicatrización. Conocimiento de los mecanismos fisiológicos de la cicatrización. Hay diferentes factores que estimulan la cicatrización como por ejemplo: la hormona de crecimiento GH, las cargas eléctricas, el oxígeno hiperbárico, la vitamina A, el zinc y factores de crecimiento [13].

### 8.2. Respuesta del huésped a los implantes

Cuando el biomaterial entra en contacto con el huésped hay una interacción entre el organismo y el biomaterial. Esta interacción es un proceso dinámico que involucra los efectos del huésped sobre el material y la acción del material sobre el huésped a través del tiempo, lo que lleva a:

a) Una respuesta del huésped a la interacción con el biomaterial que puede ser extravascular o intravascular.

b) Una respuesta del biomaterial a la interacción con el huésped.

La respuesta extravascular es a través de una reacción inflamatoria. La intensidad y la duración de la respuesta inflamatoria es a su vez controlada por mediadores y además está determinada por:

- 1) El tamaño y naturaleza del biomaterial.
- 2) El sitio de implantación o contacto.
- 3) La capacidad de reacción del huésped.
- 4) El mismo material pero en forma distinta puede dar lugar a una respuesta diferente.
- 5) En general una respuesta de baja intensidad indicaría compatibilidad tisular.

La respuesta intravascular es a través de la producción de una reacción trombogénica. Cuando la sangre fluye sobre una superficie, se produce la adsorción de una capa de proteínas plasmáticas sobre la superficie del biomaterial. La naturaleza de esta capa de proteínas que se forma, varía de un biomaterial a otro y a su vez a través del tiempo. Esta capa de proteína es la que determina si la sangre coagulará sobre la superficie por activación de la cascada de coagulación: es una serie de reacciones enzimáticas cuyo resultado final es la transformación. Además, cuando se expone a la sangre una superficie extraña, reaccionan las plaquetas (que actúan cuando hay daño en vasos) que son atraídas a la superficie, se activan y forman un agregado plaquetario. En algunos casos puede tratarse la superficie del biomaterial con sustancias que interfieran la formación del coágulo.

Existen proteínas como la albúmina que hacen pasiva la superficie porque no activan la liberación de enzimas plaquetarias y por lo tanto la capacidad de fijación de esa proteína y la superficie del biomaterial es lo que definirá la capacidad trombogénica. Los biomateriales deberán ser relativamente no trombogénicos o deberá reducirse al mínimo el riesgo de trombosis [25, 27].

Otros daños que puede provocar el biomaterial son: mutagenesis, carcinogenesis, infecciones, las dos primeras son mecanismos de daño un tanto complejos por lo que sólo se discutirá esta última.



### 8.3. Infecciones

Cuando un biomaterial se contamina con bacterias varios factores influyen para que se desarrolle lo que se conoce como la biocapa.

Las biocapas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento de la biocapa presenta la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Un ejemplo de biocapa lo constituye la placa dental.

La composición de una biocapa varía dependiendo del sistema, pero en general es: i) 97% agua, ii) células bacterianas, iii) matriz de exopolisacáridos, iv) en menos cantidad proteínas, productos procedentes de lisis de bacterias.

Cuando un implante se contamina con bacterias, varios factores influyen para que se forme la biocapa: i) los microorganismos deben adherirse a la superficie del implante el tiempo suficiente para que esa adherencia sea irreversible, ii) la adherencia depende del flujo de líquido al que está sometido el implante, del número de bacterias y de las características fisicoquímicas del implante, iii) se considera que todos los microorganismos bajo condiciones adecuadas son capaces de formar una biocapa.

La biocapa actúa como una fuente de infección sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Los mecanismos por los cuales la biocapa produce los síntomas de la enfermedad no están establecidos, pero podría ser por la producción de endotoxinas. Las infecciones en las que están involucradas las biocapas son: neumonías - respiradores, cistitis - catéteres urinarios, peritonitis - diálisis peritoneal, infecciones causadas por tubos endotraqueales,

infecciones causadas por lentes de contacto, infecciones causadas por prótesis ortopédica e infecciones causadas por vías arteriovenosas.

### REFERENCIAS

1. Wang D., Williams Ch. G., Yang F., Elisseeff J. H., *Adv. Funct. Mater.* **14**, 12, 1152-1159 (2004).
2. Woo-Sung B., Convertine A. J., McCormick C. L., Urban M. W., *Lagmuir* **23**, 667-672 (2007).
3. Choukourov A., Biederman H., Slavinska D., Hanley L., Grinevich A., Boldyryeva H., Mackova A., *J. Phys. Chem.* **B109**, 23086-23095 (2005).
4. Thissen H., Jonson G., Hartley P. G., Kingshott M., Grisser H. J., *Biomaterials* **27** 35-43 (2006).
5. Abidzina V., Deliluglu-Gurhan I., Ozdal-Kurt F., Send B. H., Tereshko I., Elkin I., Budak S., Muntele C., Ila D., *Nuclear Instrument and Methods in Physics Research* **B261** 624-626 (2007).
6. Chia-Cheng L., Hsin-Chung C., Chiang-Fang H., Che-Tang L., Sheng-Yang L., Chin-Sung C., Keng-Liang O., *Japanese Journal of Applied Physics* **44** (12), 8590-8598 (2004).
7. Hayakawa T., Yoshinari M., Remoto K., *Biomaterials* **25**, 119-127 (2004).
8. Mwale F., Tian-Wang H., Nelea V., Luo L., Antoniou J., Werthimer M. R., *Biomaterials* **27**, 2258-2264 (2006).
9. Muguruma H., Shibayama Y., Matsui Y., *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 827-832 (2008).
10. Joon B. Park y Roderics S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*, Plenum Press, Nueva York (1992).
11. David G. Castner, Buddy D. Ratner, *Surface Science* **500**, 28-60 (2002).
12. Nora Greña., [http://www.msptucuman.gov.ar/docs/cursos\\_080725\\_bio\\_medico.pdf](http://www.msptucuman.gov.ar/docs/cursos_080725_bio_medico.pdf)
13. Buddy D. Ratner y Allan S. Hoffman, *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*, Academic Press (1996).
14. Raymond Chang, *Química*, sexta edición, Mac Graw Hill, México (1999).

15. Robert W., *Estructura de la Materia, una introducción a la física moderna*, Reverté, Barcelona (1971).
16. Kask U., *Química: estructura y cambios en la materia*, CECSA, México (1973).
17. Theodore L. Bown., *Química: la ciencia central*, Pearson educación, México, (2004).
18. M. Skotak, A. P. Leonov, G. Larsen, S. Noriega y A. Subramanian, *Biomacromolecules* **9**, 1902-1908 (2008).
19. K. H. Lo, W. H. Tseng y R. M. Ho, *Macromolecules* **40**, 8, 2621-2624, (2007)
20. R. Olayo, C. Ríos, H. Salgado-Ceballos, G. J. Cruz, J. Morales, M. G. Olayo, A. L. Alvarez, R. Lozano, J. C. Morales, A. Diaz-Ruiz, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **19** (2), 817-826 (2008)
21. J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, T. S. S. Kumar, S. Rama-krishna, *J. Mater Sci: Mater Med* **19**, 2039-2046 (2008).
22. R. M. Ho, C. K. Chen, Y. W. Chiang, B. T. Ko, C. C. Lin, *Adv. Mater.* **18**, 2355-23 (2006).
23. J. L. Koenig, *Spectroscopy of polymers*, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington (1992).
24. Bhat Sujeta V. *Biomaterials*, Harrow: Alpha Science International (2005).
25. Braybrook Julian, *Biocompatibility assessment of medical devices and materials*, Wiley, Nueva York (1977).
26. D. Sherrington, *Physics of biomaterials: fluctuation, selfassembly and evolution*, Kluwer, Dordrecht (1996).
27. Teoh Swee Him., *Engineering materials for biomedical applications*, World Scientific Pub., Hackensak, N. J. (2004).
28. Young R. J. y Lowell P. A., *Introduction to polymers*, Chapman and Hall., Londres (1996).
29. Christensen R. M., *Mechanics of composite materials*, J. Wiley and Sons, Nueva York (1979).
30. Agarwal A. G. y Broutman L. J., *Analysis and performance of fiber composites*, J. Wiley and Sons, Nueva York, 1980.

## CAPÍTULO 24 TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN FÍSICA BIOLÓGICA

MICHEL PICQUART\*

*Departamento de Física*

*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

### 1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos se componen esencialmente de macromoléculas formadas de cadenas largas de átomos que se pliegan para formar una estructura espacial bien definida (ver capítulos 3 a 5). Desde los años cincuenta, la importancia de la relación estructura-función ha incitado al desarrollo de métodos de determinación de las estructuras moleculares.

En este capítulo se presenta una síntesis de las diferentes técnicas de análisis de macromoléculas biológicas frecuentemente mencionadas en la literatura. El principio de cada una de estas técnicas se presenta con sus ventajas y limitaciones. En general, ninguna de ellas es suficiente por sí sola, se tienen que considerar como complementarias. El lector encontrará información importante relativa a la mayoría de estas técnicas en la referencia [1].

Las técnicas que se presentan a continuación permiten obtener una representación de las moléculas biológicas

\* mp@xanum.uam.mx

en cuanto a su composición, su estructura y su entorno. Excepto en el caso de las dos últimas (resonancia magnética nuclear (RMN) y resonancia paramagnética electrónica (RPE)), están relacionadas con la interacción entre una radiación electromagnética o un haz de partículas y la materia. En una primera etapa, veremos los diferentes tipos de interacción de la luz (haz de fotones) con la materia: absorción, emisión, dispersión Raman, dicroísmo circular y poder rotatorio. En una segunda etapa, se presentarán la difracción de rayos X y la dispersión de neutrones y terminaremos con las técnicas de resonancia magnética.

## 2. INTERACCIÓN LUZ-MATERIA

¿Cómo interactúan la materia y la luz? Los físicos se plantearon esta pregunta desde hace tiempo. Constataron que algunos cuerpos son transparentes, otros coloreados, que algunos absorbían la luz, que otros la reflejaban según reglas muy precisas o la dispersaban en todas las direcciones. Los mecanismos de esta interacción fueron desconocidos durante mucho tiempo, y como siempre en física, se ha buscado caracterizar los fenómenos observados por cantidades accesibles al experimento como el índice de refracción  $n(\omega)$ , el coeficiente de extinción  $\varepsilon(\omega)$  o la sección eficaz de difusión  $\sigma(\omega)$ . Se ha encontrado que, en medios sencillos como los diluidos, estas cantidades presentaban un carácter resonante alrededor de frecuencias características  $\omega_i$  con un ancho de banda  $\gamma_i$ . La búsqueda de estos datos, o espectroscopía, fue una etapa importante en la explicación del fenómeno. Entonces los físicos consideraron enfoques fenomenológicos para tomar en cuenta estos datos [2].

La luz es una onda electromagnética cuyas propiedades se describen por las ecuaciones de Maxwell. Para la mayoría de los fenómenos de espectroscopía óptica, el campo magnético asociado a la onda electromagnética puede ser despreciado ya que su amplitud es del orden de  $E_0/c$ , con  $E_0$  amplitud del campo eléctrico. En otras palabras, sólo el campo eléctrico es realmente importante.

A final del siglo XIX, el modelo de Lorentz o del "electrón ligado elásticamente", que funciona bien cuando el átomo es excitado débilmente, permite el cálculo del índice del medio, pero no puede explicar los fenómenos de absorción y amplificación de la radiación. Si se completa este modelo con un término de amortiguamiento (relajación), se puede explicar el fenómeno de absorción pero todavía no hay amplificación posible, por lo tanto el láser no puede existir. La parte importante de este modelo es que, si uno escribe la ecuación de movimiento del electrón asimilado a un oscilador armónico de velocidad angular  $\omega_0$ :

$$m \frac{d^2 \vec{r}}{dt^2} = -m\omega_0^2 \vec{r} + q\vec{E} \cos(\omega t - \varphi)$$

el modelo muestra que aparece un momento dipolar  $\vec{\mu} = q \vec{r}$  que satisface una ecuación idéntica y que, finalmente, el átomo de Lorentz es un dipolo clásico.

El modelo de Einstein (1916) toma en cuenta la evolución de las poblaciones de los niveles energéticos y permite explicar tanto la absorción como la emisión estimulada, pero no permite explicar la coherencia del láser por ejemplo.

En el caso de un sistema de dos niveles  $a$  y  $b$ , con poblaciones  $N_a$  y  $N_b$  respectivamente, las ecuaciones fenomenológicas propuestas por Einstein se escriben:

$$\frac{dN_b}{dt} = -\frac{dN_a}{dt} = BN_a u(\nu) - AN_b - BN_b u(\nu),$$

donde  $u(\nu)$  es la densidad de energía incidente a la frecuencia  $\nu$ . En la parte derecha de esta igualdad, el primer término es el de absorción, el segundo, el de emisión espontánea y el tercero, el de emisión estimulada.

Después de los años veinte del siglo pasado, la mecánica cuántica y sus éxitos para describir la estructura atómica, permitieron el desarrollo de un modelo semiclásico en el cual los átomos son descritos cuánticamente y los campos de manera clásica. Éste da una descripción válida en muchos de los casos e incluye los dos modelos anteriores.

La interacción de la luz con la materia no es un proceso sencillo. La luz es un campo electromagnético que oscila rápidamente y las moléculas contienen cargas y espines que tienen propiedades eléctricas y magnéticas. Estas distribuciones de cargas y espines son alteradas cuando una molécula está expuesta a la luz. De lo que se trata es de entender la respuesta de la molécula a esta perturbación. Se tiene que explicar por qué algunas longitudes de onda producen cambios en el estado de la molécula y cómo la presencia de la molécula altera la radiación que sale de la muestra.

Un cuerpo que recibe una radiación electromagnética, puede absorber parte de ella. La energía absorbida, puede ser reemitida (luminiscencia) o conservada para aumentar la temperatura del cuerpo. En un átomo, los fotones tienen acceso a las diferencias energéticas entre niveles electrónicos cuantificados. Cualquier fotón de frecuencia  $\nu$  puede ser absorbido, si su energía es mayor que la diferencia energética entre los niveles de la transición:

$$h\nu = \hbar\omega \geq \Delta E = E_n - E_{n'}.$$

Son los electrones de valencia menos ligados al átomo, los que van a participar en estas transiciones, es decir los electrones no apareados del hidrógeno y de los metales alcalinos y los dobletes electrónicos para los metales alcalinotérreos.

En el caso de átomos aislados, el espectro de absorción atómica es bastante sencillo, constituido de líneas discontinuas.

En el caso de moléculas biatómicas, los orbitales atómicos fusionan para formar orbitales moleculares (OM). Por ejemplo, existen orbitales  $\sigma$  como en el  $H_2$  (enlace simple con simetría axial) y orbitales  $\pi$  como en el  $O_2$  (segundo enlace de un enlace doble, simétrico con respecto al plano de la molécula). Los electrones se pueden encontrar en orbitales  $\pi_{conj}$ , más deslocalizados, que corresponden a los enlaces dobles conjugados como en el benceno.

Para cada orbital, existen dos niveles energéticos: uno enlazante (niveles  $\sigma$ ,  $\pi$  o  $\pi_{conj}$ ) más estable que el nivel  $n$  de los átomos de origen, otro anti-enlazante ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$  o  $\pi^*_{conj}$ ), menos estable (figura 1). Las energías de los diferentes niveles siguen el orden creciente:

$$\sigma < \pi_{conj} < \pi < n < \pi^* < \pi^*_{conj} < \sigma^*.$$

Finalmente, cada nivel electrónico se separa en varios subniveles debido a las rotaciones y vibraciones de los diferentes grupos alrededor de los enlaces covalentes. En orden decreciente: las energías de transiciones electrónicas (algunos electronvoltios), las energías de transición de vibración de los enlaces covalentes (algunas décimas de electronvoltio) y las energías de transición de rotación

de la molécula alrededor de su centro de masa (algunas centésimas de electronvoltio) están también cuantificadas.

En el caso de moléculas poliatómicas, la multiplicidad de niveles es tal que se habla de bandas electrónicas en las cuales las transiciones son casi continuas. Se menciona en particular la banda de valencia, ocupada por los electrones de valencia y la banda de conducción, vacía de electrones pero en la que pueden circular electrones más libres.

Los principios de la mecánica cuántica son los que explican de la mejor manera cuáles son los estados energéticos que una molécula puede ocupar y los mecanismos por los que una molécula puede pasar de un estado a otro. No es el objeto de este capítulo hacer un curso de mecánica cuántica, el lector interesado puede buscar la información necesaria en cualquier libro sobre este tema, en particular en el libro de Cohen-Tannoudji, Diu y Laloë [3]. Sin embargo, es necesario recordar unos conceptos importantes al respecto.

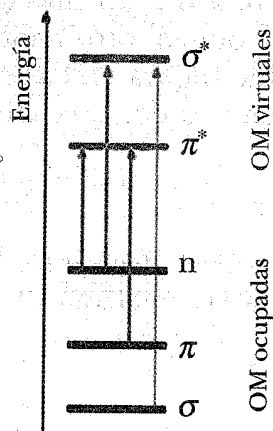


Figura 1. Posiciones relativas de las energías de los diferentes niveles electrónicos.

## 2.1. Descripción de una molécula por una función de onda

El estado de un sistema o de una molécula se describe por una función de onda,  $\Psi$ . Es una cantidad compleja que depende de las posiciones y espines de todos los electrones y núcleos de la molécula y de la existencia de campos externos y del tiempo. La función de onda no es una cantidad medible directamente, pero se relaciona con la probabilidad de encontrar al sistema en un estado dado:

$$P = \Psi^* \Psi$$

donde  $\Psi^*$  es el conjugado de  $\Psi$ .

Siendo  $P$  una probabilidad, la condición de normalización es evidente cuando se suma sobre todo el espacio y todos los estados:

$$\int P d\tau = \int \Psi^* \Psi d\tau = \langle \Psi | \Psi \rangle = 1.$$

En un sistema que tiene solamente dos estados posibles, no se sabe en cuál de ellos se encuentra el sistema, éste puede ser descrito por una combinación lineal de las dos funciones de onda:

$$\Psi = C_a \Psi_a + C_b \Psi_b.$$

Los coeficientes  $C_a$  y  $C_b$  están relacionados con las probabilidades de encontrar el sistema en el estado  $a$  o en el estado  $b$ , respectivamente. En particular, la probabilidad de encontrar el sistema en el estado  $a$  será:

$$P = C_a^* C_a = |C_a|^2$$

Frecuentemente, se necesita describir ciertos aspectos del sistema de manera separada. Por ejemplo, describir el



espín de un electrón independientemente de sus coordenadas espaciales, o separar las funciones de onda entre lo que se debe a los electrones y lo que se debe a los núcleos. Ésta es la aproximación de Born-Oppenheimer que nos permite escribir:

$$\Psi = \Psi_e(r, R)\Phi_N(R)$$

donde  $r$  se refiere a los electrones y  $R$  al núcleo.

## 2.2. Cantidad observable

Las propiedades del sistema pueden ser evaluadas con la acción de operadores sobre las funciones de onda. Muchos de los operadores de interés en mecánica cuántica satisfacen una ecuación de valores propios:

$$\hat{O}\Psi = \Lambda\Psi$$

donde  $\Lambda$  es el valor propio. Cualquier función de onda que satisface esta ecuación es un estado propio del operador  $\hat{O}$  con el valor propio  $\Lambda$ . Para los operadores que corresponden a cantidades físicas observables, el valor esperado está definido por:

$$\langle O \rangle = \int \Psi^* \hat{O}\Psi d\tau = \langle \Psi | \hat{O} | \Psi \rangle = \langle \Psi | \Lambda | \Psi \rangle = \Lambda$$

donde la integral es sobre todo el espacio y estados del espín.

La dependencia temporal del comportamiento de un sistema está dada por la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi = i\hbar \frac{d\Psi}{dt}$$

donde  $\hat{H}$  es el operador hamiltoniano definido como:

$$\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = E.$$

$E$  es la energía total del sistema. Generalmente, el hamiltoniano se escribe como la suma del operador energía cinética y del operador energía potencial:  $\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}$ . La forma del operador  $\hat{T}$  puede ser deducida de la mecánica clásica ya que  $m_i \vec{u}_i = \vec{p}_i$ :

$$\hat{T} = \sum_i \frac{\hat{p}_i^2}{2m_i}$$

con  $\hat{p}_i^2 = -\hbar^2 \nabla^2$  ya que  $\hat{p} = -i\hbar \nabla$ . La forma del potencial  $\hat{V}$  depende del sistema y contiene términos que se deben a las interacciones entre los electrones y los núcleos de las moléculas y entre estas partículas y los campos externos, en particular el campo electromagnético.

En el caso de un hamiltoniano independiente del tiempo, algunos estados van a satisfacer la ecuación  $\hat{H}\Psi = E\Psi$ , llamada ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Éstos son los estados estacionarios del sistema,

$$\Psi(t) = \Psi(0) e^{-\frac{iE}{\hbar}t},$$

cuya probabilidad de encontrar el sistema en este estado no cambia en el tiempo:

$$P = \Psi^*(t)\Psi(t) = |\Psi(0)|^2.$$

Como lo hemos visto anteriormente, cualquier estado del sistema puede ser descrito por una combinación lineal de funciones propias:

$$\Psi = \sum_i C_i \Psi_i.$$

Aunque esta suma tiene que ser sobre todos los estados, en la práctica, muchos de los coeficientes  $C_i$  son pequeños. Si se supone que el sistema está en el estado  $\Psi_a$  y que se aplica una pequeña perturbación a través del potencial  $\hat{V}$ , lo que se mide es la cantidad

$$\langle \Psi | \hat{V} | \Psi_a \rangle = \sum_i C_i \langle \Psi_i | \hat{V} | \Psi_a \rangle,$$

que representa la “mezcla” entre el estado inicial y el estado perturbado es decir las transiciones entre el estado inicial y otros estados.

### 2.3. Interacción de la luz con moléculas

Para el propósito de este capítulo, en primera aproximación se puede considerar que la luz es un campo eléctrico transversal que oscila periódicamente en el tiempo y en el espacio. Una molécula típica de 1nm es siempre pequeña con respecto a la longitud de onda de la luz, del orden de centenas de nanómetros. Por lo tanto, no se consideran las variaciones espaciales del campo eléctrico dentro de la molécula. Ésta es la llamada aproximación dipolar o de longitudes de onda grandes.

Si se considera que el sistema (de dos estados  $a$  y  $b$  para simplificar) se encuentra en el estado propio  $\Psi_a$  de energía  $E_a$  del hamiltoniano independiente del tiempo, y que la luz perturba el sistema a través de un potencial  $\hat{V}(t)$ , nos interesa saber la tasa a la cual la luz causa transiciones hacia el estado  $b$ . En la referencia [2], se encontrarán

hamiltonianos susceptibles de describir la interacción entre un átomo cuántico y un campo clásico.

En un estado estacionario, la densidad de probabilidad es independiente del tiempo. En un estado de superposición,

$$\Psi(t) = C_a(t) \Psi_a e^{-\frac{iE_a t}{\hbar}} + C_b(t) \Psi_b e^{-\frac{iE_b t}{\hbar}}$$

la probabilidad de encontrar la partícula en una cierta posición depende del tiempo.

Una molécula es perturbada por la luz porque su distribución de cargas eléctricas es modificada por la presencia del campo eléctrico oscilante. Para describir la carga eléctrica de una molécula, se puede considerar cada carga individual, pero es más fácil desarrollar la distribución de carga en serie de multipolos. En esta serie el término principal es el dipolo eléctrico

$$\hat{\mu} = \sum_i e_i \hat{r}_i.$$

Por lo tanto, la energía de interacción entre una molécula y la luz se va escribir en primera aproximación como:

$$\hat{V}(t) \approx \hat{\mu} \cdot \vec{E}_0 e^{i\omega t}.$$

Se puede mostrar que la tasa de transición del estado  $a$  hacia el estado  $b$ , por unidad de densidad de energía es:

$$B = \frac{2\pi}{3\hbar^2} |\langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle|^2.$$

Cuando el átomo está en un estado estacionario, el valor promedio del momento dipolar es cero ya que los orbitales atómicos son centrosimétricos. En un estado de superposición, el momento dipolar promedio es diferente de cero, y es él que aparece en la integral de la expresión anterior de  $B$ . Esta integral se llama el dipolo de transición electrónica.

El razonamiento anterior se puede aplicar a cualquier estado, tanto electrónico como vibracional lo que va a conducir a las diferentes espectroscopías, mismas que describiremos a continuación.

### 3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-VIS)

La radiación electromagnética en la región del ultravioleta-visible posee una longitud de onda entre 160 y 800 nm. En este caso, los fotones tienen una energía suficiente ( $E = h\nu = hc/\lambda$ , con  $h$ , la constante de Planck,  $\nu$ , la frecuencia de la radiación incidente,  $c$ , la velocidad de la luz en el vacío y  $\lambda$ , la longitud de onda) para excitar a los electrones de un doblete no enlazante (electrones  $n$ ) o de un enlace doble (electrones  $\pi$  o  $\pi_{\text{conj}}$ ). Se puede producir entonces una transición electrónica entre el único nivel de energía poblado a temperatura ambiente que es el nivel fundamental singulete  $S_0$ , y un nivel excitado del estado singulete ( $S_{1,2,3,\dots}^*$ ) si la energía  $h\nu$  transportada por el fotón incidente es igual a la diferencia de energía  $\Delta E$  entre estos dos niveles (figura 2).

Este fenómeno va a manifestarse por una absorción de la luz incidente solamente a ciertas longitudes de onda por la parte excitable de la molécula iluminada llamada cromóforo. Se puede entonces registrar un espectro de

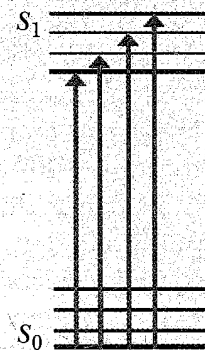


Figura 2. Diagrama de Jablonski para la absorción. Los electrones más frecuentemente excitados son electrones  $\pi_{\text{conj}}$ ,  $\pi$  o  $n$ .

absorción, que es la absorbancia en función de la longitud de onda cuya forma es característica de la naturaleza química de cada cromóforo y permite un análisis cualitativo y una identificación, la amplitud de estas absorciones permite un análisis cuantitativo.

#### 3.1. Descripción cualitativa

En el vacío o en un medio no polar (medio en el cual no hay interacción electrostática entre aquél y los electrones del cromóforo), los electrones  $n$ ,  $\pi$  y  $\pi_{\text{conj}}$  tienen niveles de energía diferentes cuando están en el estado fundamental o en el estado excitado.

Las energías del estado fundamental y el estado excitado siendo diferentes, también lo son las longitudes de onda de absorción:

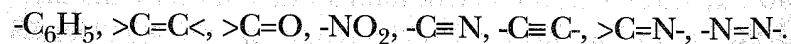
$$\Delta E_{\pi\pi_{\text{conj}}^*} < \Delta E_{n\pi^*} < \Delta E_{\pi\pi^*} \Rightarrow \lambda_{\pi\pi_{\text{conj}}^*} > \lambda_{n\pi^*} > \lambda_{\pi\pi^*}$$

De esta forma, si se excluyen las transiciones  $\sigma\sigma^*$  y  $n\sigma^*$ , de energía elevada (UV lejano) no observables con los espectrómetros corrientes, las transiciones  $\pi\pi^*$ , intensas, se observan entre 200 y 800 nm con valores del máximo de absorción  $\epsilon_{\max}$  importantes (1000 a 10 000 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Éstas son muy sensibles a efectos de conjugación. En el caso de moléculas aromáticas, el  $\epsilon_{\max}$  varía entre 200 y 5000 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Las transiciones  $n\pi^*$  se sitúan entre 260 y 500 nm, con valores de  $\epsilon_{\max}$  muy débil (< 100 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), y las transiciones  $\pi\pi^*_{\text{conj}}$  de 250 nm hasta más de 600 nm. En la tabla 1, se presentan algunos ejemplos de transiciones electrónicas.

En una molécula, los efectos de conjugación (alternancia de enlaces simples con enlaces dobles) llevan a una disminución de la energía de transición  $\pi\pi^*$  pero no afectan la transición  $\sigma\sigma^*$ . Además, la probabilidad de transición es mayor y  $\epsilon_{\max}$  aumenta.

Entre más grande es el número de enlaces conjugados, más grande es la longitud de onda (figura 3). Ésta es la razón por la cual los pigmentos coloreados son moléculas que abundan en cadenas polietilenas conjugadas, en ciclos benzoicos o en heterociclos poliinsaturados.

Los grupos químicos que poseen electrones  $\pi$  capaces de inducir efectos de conjugación se llaman cromóforos:



En el estado fundamental, los electrones  $n$ ,  $\pi$  y  $\pi_{\text{conj}}$  están en orbitales expuestos al medio, es decir al solvente. En el estado excitado, los electrones  $\pi$  estarán todavía más expuestos ya que están más deslocalizados. Esto lleva a que un solvente polar que interactúa con los electrones de un cromóforo en solución tiende a disminuir los niveles de energía.

Tabla 1  
EJEMPLOS DE TRANSICIONES ELECTRÓNICAS

Compuesto	Solvente	Transición	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
etano	-	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135	10 000
agua	-	$n \rightarrow \sigma^*$	167	7 000
metanol	-	$n \rightarrow \sigma^*$	183	500
	hexano	$n \rightarrow \sigma^*$	177	200
éter	-	$n \rightarrow \sigma^*$	190	2 000
etilamina	-	$n \rightarrow \sigma^*$	210	800
ácido acético	etanol	$n \rightarrow \pi^*$	204	41
acetaldeido	etanol	$n \rightarrow \pi^*$	293	12
benceno	hexano	$\pi \rightarrow \pi^*$	204	7 900
		$\pi \rightarrow \pi^*$	256	200
fenol	agua	$\pi \rightarrow \pi^*$	210	6 200
		$\pi \rightarrow \pi^*$	270	1 450
adenina	agua	$\pi \rightarrow \pi^*$	260.5	13 400
adenosina	agua	$\pi \rightarrow \pi^*$	260	14 900
adenosina-5'-fosfato	agua pH 7	$\pi \rightarrow \pi^*$	259	15 400
citidina-5'-fosfato	agua pH 7	$\pi \rightarrow \pi^*$	271	9100
guanosina-5'-fosfato	agua pH 7	$\pi \rightarrow \pi^*$	252	13 700
uridina-5'-fosfato	agua pH 7	$\pi \rightarrow \pi^*$	262	10 000

Molécula de tipo polietileno  
Transición  $\pi \rightarrow \pi^*$

n	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{max}}$
1	165	10 000
2	217	21 000
3	268	34 000
6	364	138 000

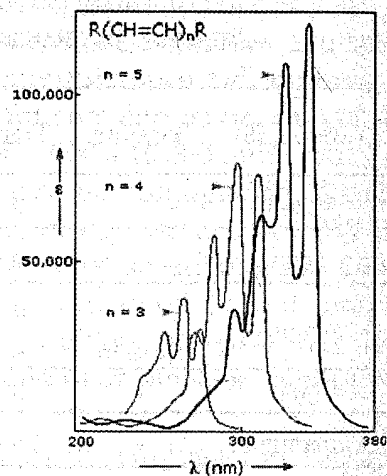


Figura 3. Efecto del número de enlaces dobles sobre el espectro de absorción.

La energía necesaria para la transición  $\pi\pi^*$  disminuye cuando la polaridad del solvente aumenta, por tanto la longitud de onda aumenta: se observa entonces un desplazamiento hacia el rojo. Al contrario, cuando la energía de la transición aumenta, la longitud de onda disminuye y se observa un desplazamiento hacia el azul. Además, el acercamiento de dos niveles hace más probable la transición ya que por la ley de Boltzmann, la probabilidad de transición entre dos niveles  $j$  e  $i$  de energía  $E_i$  y  $E_j$ , respectivamente es:

$$P_{ji} \propto e^{-\frac{E_j - E_i}{kT}}$$

lo que tiene por consecuencia una mayor amplitud.

La intensidad de una banda de absorción depende de la magnitud del dipolo de transición (ver la sección 2 de este capítulo). En el caso de una molécula, hay que tomar en cuenta también los estados vibracionales asociados a cada estado electrónico. La intensidad depende del cuadrado del dipolo de transición y por lo tanto del cuadrado de la integral de recubrimiento de los estados inicial y final llamada factor de Franck-Condon.

En el caso de los ácidos nucleicos, la absorbancia a 200 nm puede ser medida para estudiar por ejemplo el cambio de conformación en función de la temperatura. La figura 4 muestra el cambio en el espectro de absorbancia a dos temperaturas y la figura 5 la determinación de la temperatura de transición con el perfil sigmoidal característico de una transición.

La absorbancia a 260 nm puede ser medida para estimar la concentración de ácido nucleico, usando el valor

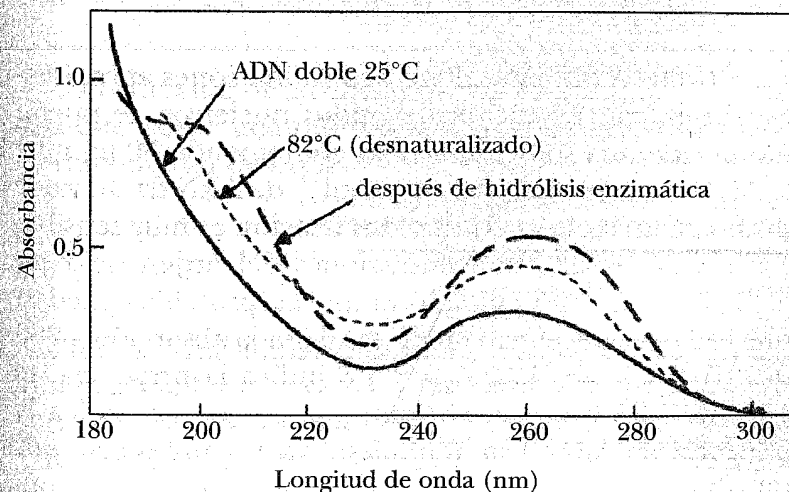


Figura 4. Espectro de absorción del ADN a 25°C y 82°C. Adaptada de [4].



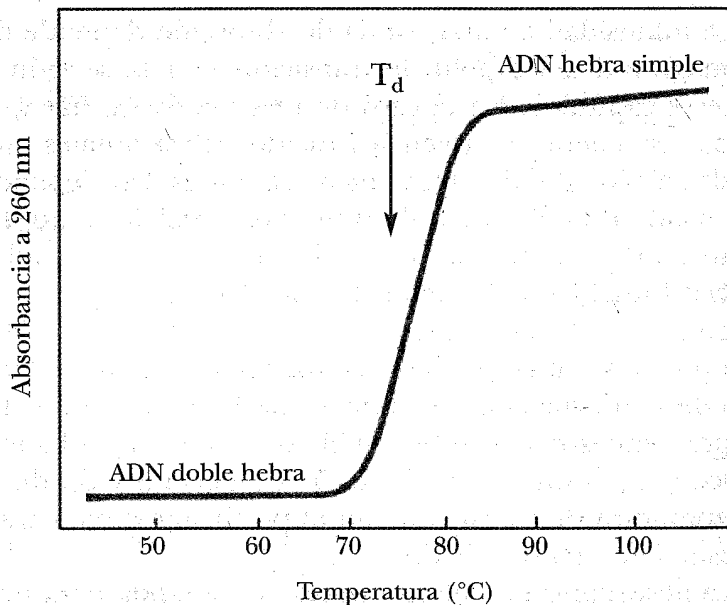


Figura 5. Evolución de la absorbancia a 260 nm del ADN en función de la temperatura. Adaptada de [5].

$\epsilon_{260} = 10000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para determinaciones aproximativas de la concentración de ácidos nucleicos, se puede asumir que una solución acuosa conteniendo  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ADN de doble hebra o  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ARN da un valor de absorbancia  $A_{260} = 1$ . Esta dosificación es muy sensible y se puede bajar a concentraciones del orden de  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Hay que tener cuidado ya que las proteínas pueden interferir y es necesario medir también la absorción a 280 nm. Un cociente  $A_{260}/A_{280} < 1.8$  indica la presencia de proteínas, mientras un cociente mayor que 1.8 indica la presencia de ARN. Este fenómeno va a manifestarse por una absorción de la luz incidente solamente a ciertas longitudes de onda por la parte excitable de la molécula iluminada llamada cromóforo.

### 3.2. Análisis cuantitativo

Cuando se hace incidir una luz de intensidad  $I_0$  sobre un compuesto, la luz transmitida tiene una intensidad menor  $I$ . La ley de Beer-Lambert plantea que la absorbancia  $A$  es proporcional al espesor  $l$  (trayecto óptico) y a la concentración del soluto  $c$ :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon(\lambda)cl$$

el factor  $\epsilon(\lambda)$  se llama coeficiente de extinción molar cuando la concentración es molar.

La transmitancia es el cociente:

$$T(\lambda) = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon(\lambda)cl}$$

El coeficiente de extinción molar representa la capacidad que posee una molécula de absorber fotones a una cierta longitud de onda.

### 3.3. El equipo

Un espectrofotómetro (figura 6) posee una fuente, un monocromador de prisma o de rejilla (plana o cóncava) para seleccionar la longitud de onda, lentes y espejos.

La luz transmitida incide sobre un detector, anteriormente, era un fotomultiplicador el que convertía la luz recibida en corriente eléctrica. Ahora, éstos son remplazados por fotodiodos.

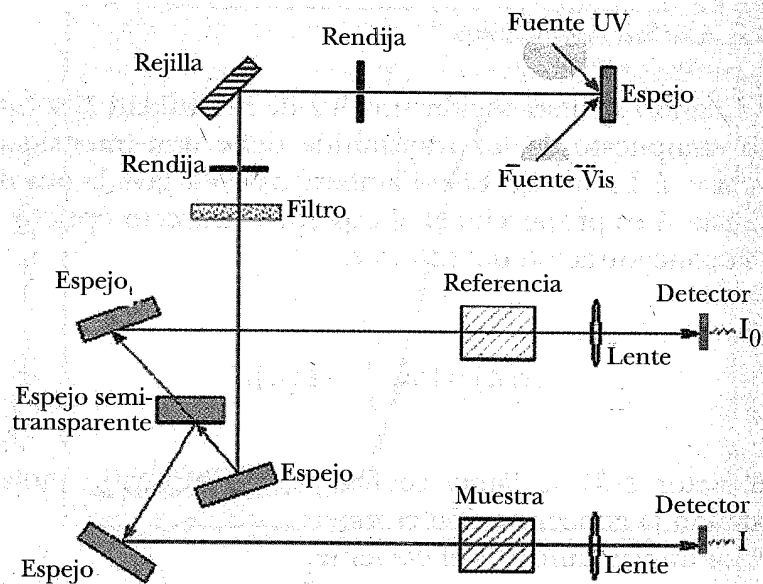


Figura 6. Esquema de un espectrofotómetro.

Generalmente, se usa un sistema con doble haz. La luz de la fuente se separa en dos, la primera mitad atraviesa una cubeta de referencia (que puede contener un solvente, por ejemplo) y la segunda mitad atraviesa la cubeta con la muestra estudiada. Esto permite evitar problemas debidos a variaciones de energía de la fuente y a fluctuaciones de respuesta del detector. Las celdas de medición son paralelepípedos de cuarzo (transparente al UV) de  $1 \times 1$  cm de lado y 4 o 5 cm de altura.

#### 4. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN

La espectroscopía de fluorescencia es una de las técnicas más usadas en bioquímica y biofísica molecular. A pesar de que las mediciones de fluorescencia no dan información estructural, la técnica se volvió muy popular por su sensibilidad a los cambios en las propiedades estructurales y dinámicas de las biomoléculas. Esta técnica se basa en el fenómeno de emisión espontánea cuya intensidad, color y polarización depende de las propiedades moleculares y del entorno de las moléculas.

La fluorescencia es una propiedad de algunos cromóforos (fluoróforos) que, después de haber sido excitados por luz UV o visible, reemiten luz a una longitud de onda más grande que la absorbida. Esta propiedad permite detectar concentraciones de fluoróforos del orden del nanomol por litro hasta algunas centenas de micromoles por litro, pero sobre todo es muy sensible al entorno inmediato de estos fluoróforos. De esta manera se pueden obtener informaciones estructurales sobre el tipo de interacciones entre moléculas, sobre la naturaleza del entorno del cromóforo (acuoso, no polar, cargas negativas) y su accesibilidad. Por tanto se puede saber de su exposición al solvente acuoso o al medio membranario, de su enterramiento en una macromolécula al momento de un cambio de conformación o de una asociación, de las distancias entre cromóforos de una misma macromolécula o en un complejo *in vitro* o *in vivo*.

Las técnicas de fluorescencia se basan en cuatro principios: i) el principio de Franck-Condon que nos dice que los núcleos permanecen estacionarios durante las transiciones electrónicas; ii) la emisión ocurre del nivel vibracional más bajo del primer estado excitado singulete ya que la relajación de los estados vibracionales excitados

es mucho más rápida que la emisión; iii) el desplazamiento de Stokes: la emisión tiene siempre una energía menor que la absorción y iv) la regla del espejo para la cual el espectro de emisión es la imagen de la banda de absorción de más baja energía. El lector podrá leer a este respecto con mucho provecho los trabajos de Lakowicz [6-9].

#### 4.1. Fenómenos de desactivación

Cuando un cromóforo absorbe un fotón UV o visible, sus electrones pasan del nivel fundamental ( $S_0$ ) a un nivel excitado ( $S_{1,2,3...}$ ). Estas transiciones necesitan un tiempo del orden de  $10^{-16}$ s. Los estados excitados son inestables, por lo tanto, los electrones van a regresar al estado fundamental disipando la energía  $h\nu$  por procesos radiantes o no radiantes. Estos últimos ocurren por conversión externa (choques con otras moléculas) o conversión interna (transición entre estados del mismo número cuántico por el intermediario de los niveles vibracionales). Estos fenómenos están descritos en la figura 7.

Los procesos radiativos emiten una radiación de luminiscencia (fluorescencia o fosforescencia). Los electrones están caracterizados por un número de espín  $s = \pm 1/2$ . Dos electrones de un mismo doblete tienen espines opuestos y se caracterizan por un estado del espín:  $2\sum s + 1 = 1$ , de donde viene el término estado singulete. Si la excitación conduce a dos electrones de mismo espín (+1/2), el estado del espín es igual a 3 y se habla de estado triplete. Generalmente, su nivel energético es cercano e inferior al del primer estado singulete excitado  $S_1$ , por donde se tiene que pasar antes de poblar el estado triplete  $T_1$ . Este estado se vacía porque regresa el sistema al estado  $S_1$ , que

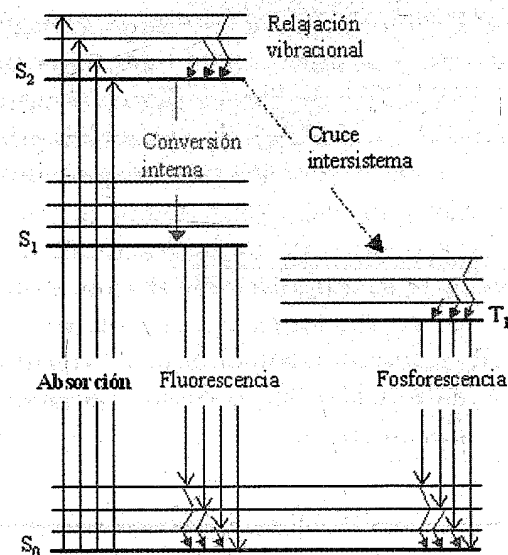


Figura 7. Diagrama de Jablonski para los procesos de absorción, fluorescencia y fosforescencia.

se puede desactivar luego por emisión de un fotón (fluorescencia retardada o fosforescencia  $\alpha$ ), o directamente hacia el estado singulete fundamental (con emisión de un fotón por fosforescencia  $\beta$ ). Esta última transición es poco probable cuánticamente y puede tardar (microsegundos a segundos).

Cuando los electrones excitados se quedan en el estado singulete (el estado más probable), la desactivación de los estados excitados superiores y de los diferentes estados vibracionales se hace por conversión interna, mucho más rápidamente ( $10^{-12}$  s) que el tiempo necesario para despoblar el primer nivel excitado  $S_1$  hacia el estado fundamental y sus diversos estados vibracionales ( $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  s), lo que significa que todos los electrones excitados se van a encontrar en  $S_1$  antes de poder desactivarse por emisión de un fotón: es el fenómeno de fluorescencia.

Los fotones emitidos tienen menor energía que los fotones de excitación, por lo tanto tienen mayor longitud de onda. La desviación de Stokes (figura 8) es la diferencia de longitud de onda entre la excitación y la emisión. El espectro de fluorescencia es la imagen invertida del espectro de absorción.

Todos los fenómenos de desactivación están en competencia. Cualquier aumento de la temperatura, que va a favorecer las desactivaciones no radiativas como las de relajación vibracional o los choques intermoleculares, lleva a una disminución de las desactivaciones por fluorescencia y fosforescencia.

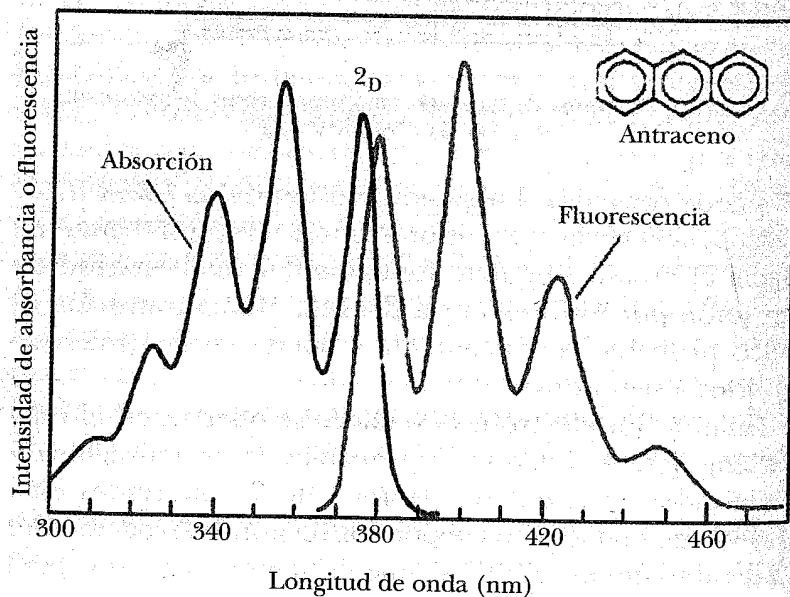


Figura 8. Comparación de los espectros de absorción y emisión y evidencia del desviación de Stokes. Adaptada de [10].<sup>2D</sup>

#### 4.2. Tiempo de vida del estado excitado

El tiempo de vida es una de las características más importantes de una molécula fluorescente ya que es propio de ella y es muy sensible al entorno del fluoróforo. Corresponde al tiempo promedio de desexcitación que varía de 1 a 100 ns para los fluoróforos orgánicos y biológicos. El tiempo de vida del estado excitado depende de las velocidades de despoblación de los fluoróforos  $N^*$  en el estado excitado. Todos los mecanismos son reacciones de orden uno verdadero o aparente, es decir que siguen una ley del tipo:

$$\frac{d[N^*(t)]}{dt} = -k[N^*(t)]$$

caracterizados por una constante de velocidad  $k_i$  diferente para cada uno. La velocidad total de desactivación es la suma de todas las velocidades, por lo tanto el tiempo de vida del estado excitado será:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr} + k_{ST} + k_Q(Q)}$$

donde  $k_F$ ,  $k_{nr}$  y  $k_{ST}$  son respectivamente las constantes de velocidad de la fluorescencia, de los procesos no radiantes y de la transferencia singulete-triplete y  $k_Q(Q)$  es la constante de velocidad de los procesos de desexcitación por choques con un inhibidor de fluorescencia  $Q$ .

Se puede medir el tiempo de vida del estado excitado por decrecimiento de fluorescencia. Se excita un gran

número de moléculas durante un tiempo muy corto (0.1 – 1 ns) con una lámpara y se observa el regreso al estado fundamental midiendo el decrecimiento de la intensidad emitida  $I$  en función del tiempo (del orden de algunas decenas de nanosegundos):  $I(T) = I_0 e^{-t/\tau}$ .

La figura 9 muestra un ejemplo de tal decrecimiento. Ya que el tiempo de iluminación  $d$  es mucho más grande que el tiempo necesario a la excitación ( $10^{-16}$  s), varios decrecimientos se recubren. Para analizar el decrecimiento exponencial con buena sensibilidad y reproducibilidad, es necesario tomar en cuenta la forma de la señal de iluminación y acumular varios decrecimientos. En las macromoléculas, existen frecuentemente varios tiempos de vida por los cambios en el entorno local de los fluoróforos.

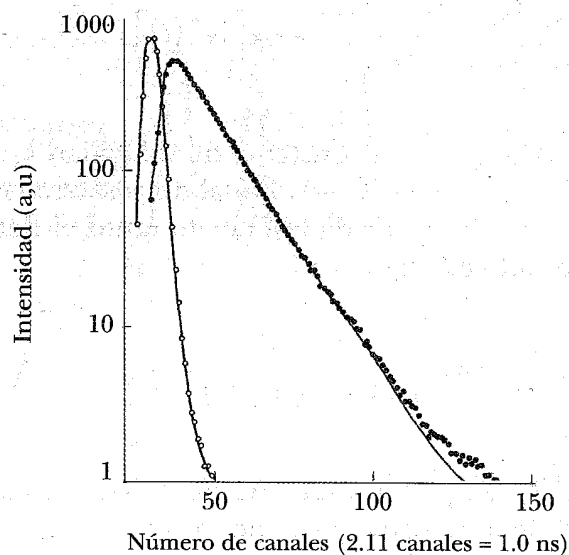


Figura 9. Decrecimiento de fluorescencia de la base Y en levadura tRNA<sup>Phe</sup>. La línea negra con círculos blancos muestra el pulso de excitación. La línea gris que pasa entre los puntos de medición ha sido dibujada con un decrecimiento exponencial sencillo, con  $\tau = 6.2$  ns. Adaptada de [1].

Se puede también medir el tiempo de vida del estado excitado por modulación de la luz emitida. En este caso, se repiten excitaciones a intervalos del orden del tiempo de vida del estado excitado. No todos los fluoróforos tienen tiempo para regresar al estado fundamental entre dos excitaciones. Se modula la luz de excitación  $I_{ex}(t)$  a una frecuencia  $\nu_{mod} \approx (1/\tau)$ ,  $I_{ex}(t) = A + B \cos 2\pi\nu_{mod}t$ . Por lo tanto, la luz emitida  $I_{em}(t)$  oscila a la misma frecuencia, pero con un retraso de fase  $\theta$  ligado al tiempo de vida:  $I_{em}(t) = A' + B' \cos(2\pi\nu_{mod}t + \theta)$ .

Se tiene que  $\tan\theta = 2\pi\nu_{mod}\tau$ . Para tener una buena precisión, se necesita que  $\tan\theta$  cambie de manera significativa con  $\theta$ , por lo tanto  $\theta > 45^\circ$ . De esta manera, si se quiere medir un tiempo de vida de 5 ns, hay que utilizar una frecuencia de modulación  $\nu_{mod}$  superior a 30 MHz.

Se puede también tener otra medición independiente comparando las amplitudes de las oscilaciones incidente y emitida, es el cociente de modulación:

$$m = \frac{B'}{A'} = \frac{B}{A} \cos\theta = \left(1 + 4\pi^2\nu_{mod}^2\tau^2\right)^{-\frac{1}{2}}$$

Entre más polar sea el solvente, más interacciones dipolares existirán entre las nubes electrónicas de los fluoróforos y las de las moléculas del solvente. Estas interacciones no existen en un solvente apolar o en el vacío.

En el estado fundamental, las moléculas de solvente que interactúan con el fluoróforo se orientan para bajar la energía del sistema, en este caso los dipolos del solvente son antiparalelos a los del fluoróforo. Por lo tanto, el nivel de energía fundamental  $S_0$  es más bajo en un solvente polar que en el vacío.



En el estado excitado, la configuración de la nube electrónica se modifica y cambia la orientación del dipolo del fluoróforo. Este fenómeno es demasiado rápido para que las moléculas del solvente tengan tiempo de reorientarse para minimizar la energía, por lo tanto, el nivel de energía del estado excitado  $S^*$  es más alto que en medio apolar lo que se traduce por una energía de absorción más grande y una longitud de onda más corta. Durante el tiempo de vida del estado excitado  $\tau$ , las moléculas de solvente pueden reorientarse para bajar la energía del estado excitado hacia el estado excitado relajado  $S'^*$ .

La transición hacia el estado fundamental es aún demasiado rápida para que las moléculas del solvente tengan tiempo de reorientarse y el nivel de energía  $S'$  es más elevado que en el vacío. Por tanto, la diferencia de energía en la emisión será más pequeña y la longitud de onda más grande en medio apolar. Después, el sistema regresa al nivel inicial por reorientación de los dipolos del solvente. Cuando este tiempo de reorientación (tiempo de relajación del solvente) es del orden de magnitud de  $\tau$ , se llega a estados parcialmente relajados y a un espectro de emisión más ancho. Si  $\tau$  depende de  $\lambda$ , el ensanchamiento del lado azul del espectro (bajas longitudes de onda) corresponde al  $\tau$  "no relajado" más cercano a su valor característico en ausencia de efecto de solvente (es decir en medio no polar o en el vacío) y el ensanchamiento del lado rojo corresponde al  $\tau$  "relajado". Estos efectos, ligados a la velocidad de rotación de las moléculas, dependen de la temperatura y viscosidad. Los efectos de desplazamiento del espectro en longitud de onda son muy sensibles y permiten evidenciar la fijación de una proteína a membranas o medir la polaridad de un sitio de unión.

### 4.3. Rendimiento cuántico

El rendimiento de fluorescencia o rendimiento cuántico es la capacidad de un fluoróforo de emitir fotones por fluorescencia después de la absorción de fotones. Se expresa por la fracción de fluoróforos  $N^*$  en el estado excitado que se desactivan por fluorescencia. Por lo tanto, es el cociente entre el número de fluoróforos que emiten un fotón por fluorescencia ( $N_F^*$ ) y el número total de fluoróforos excitados ( $N_0^*$ ) o también, el cociente entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos, por lo tanto, entre la intensidad emitida y absorbida (ver definición del tiempo de vida en la subsección 4.2):

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_{ST} + k_Q(Q)} = k_F \tau.$$

Este rendimiento depende de las condiciones experimentales. Para medirlo, se hace generalmente por comparación con un fluoróforo de rendimiento o tiempo de vida conocido.

En la tabla 2 se presentan el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de los aminoácidos aromáticos.

Existen en la literatura muchos ejemplos del uso de la fluorescencia en física biológica. Una revisión completa de las técnicas de fluorescencia para el estudio de la estructura de proteínas se puede encontrar en [11]. La espectroscopía de fluorescencia a resolución temporal ha sido aplicada al estudio estructural y dinámico de varias proteínas [12-14], del ADN y ARN [15, 16] y de la interacción proteína-fosfolípido [17].

Tabla 2

RENDIMIENTO CUÁNTICO Y TIEMPO DE VIDA DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN SOLUCIÓN ACUOSA A PH 7

Aminoácido	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi$	$\tau$ (ns)
Fenilalanina	260	282	0.02	6.8
Tirosina	275	304	0.14	3.6
Triptofano	295	353	0.13	3.1

#### 4.4. Extinción de fluorescencia ("quenching")

Los iones y moléculas que poseen muchos electrones, favorecen los procesos de desactivación no radiativos por medio de choques (extinción dinámica) con el fluoróforo o por medio de la formación de complejos no fluorescentes (extinción estática). Conocer la localización del inhibidor de la fluorescencia  $Q$  permite tener información sobre la del fluoróforo en una macromolécula.

##### 4.4.1. Extinción dinámica

Cuando el conjunto de los procesos de desactivación coexisten se pueden entonces comparar los rendimientos cuánticos, las intensidades (si tenemos las mismas concentraciones de fluoróforos) o los tiempos de vida en ausencia ( $\Phi_0$ ,  $I_0$ ,  $\tau_0$ ) y en presencia de concentraciones variables del inhibidor ( $\Phi_Q$ ,  $I_Q$ ,  $\tau_Q$ ):

$$\Phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_{ST}} = k_F \tau_0$$

y

$$\Phi_Q = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_{ST} + k_Q(Q)} = k_F \tau_Q;$$

por lo tanto,

$$\begin{aligned} \frac{I_0}{I_Q} &= \frac{\Phi_0}{\Phi_Q} = \frac{\tau_0}{\tau_Q} = \frac{k_F + k_{nr} + k_{ST} + k_Q(Q)}{k_F + k_{nr} + k_{ST}} = 1 + \frac{k_Q(Q)}{k_F + k_{nr} + k_{ST}} \\ &= 1 + k_Q(Q) \tau_0 = 1 + K_D(Q) \end{aligned}$$

con  $K_D = k_Q \tau_0$ , llamada constante de extinción de Stern-Volmer. La constante de velocidad  $k_Q$ , depende de la probabilidad de encuentro del inhibidor de fluorescencia y del fluoróforo, por tanto de su accesibilidad, de su radio de colisión ( $R_Q$  y  $R_F$ ), de la temperatura  $T$ , de la viscosidad  $\eta$  del solvente y de la difusión de cada uno hacia el otro expresada por los coeficientes de difusión del inhibidor  $D_Q$  y de la macromolécula que tiene el fluoróforo  $D_F$ :

$$k_Q = 4000\pi N_A (R_F + R_Q) (D_F + D_Q) \text{ en mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

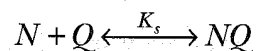
$$\text{con } D_F = \frac{RT}{N_A 6\pi\eta R_M} \text{ y } D_Q = \frac{RT}{N_A 6\pi\eta R_Q},$$

$N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$  es el número de Avogadro y  $R = 8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , la constante de los gases ideales.

En realidad, no todos los choques son eficaces. Por lo tanto, hay que remplazar la constante de velocidad por una constante efectiva  $k'_Q = \gamma k_Q$ , con  $\gamma \leq 1$ . El espectro de absorción no cambia.

#### 4.4.2. Extinción estática

En este caso, hay formación de un complejo que absorbe pero que no se desactiva por fluorescencia. Tenemos las reacciones:



con

$$K_s = \frac{[NQ]}{[N][Q]}$$

No se considera la reacción  $N^* + Q$ , ya que la fracción de fluoróforos en el estado excitado es despreciable. La intensidad emitida es proporcional a la población susceptible de emitir por fluorescencia. Se comparan las intensidades, con una concentración total  $[N_0]$  igual, medidas en ausencia y en presencia del inhibidor:

$$\frac{I_0}{I_Q} = \frac{[N_0]}{[N]} = \frac{[N] + [NQ]}{[N]} = 1 + \frac{[NQ]}{[N]} = 1 + K_s[Q]$$

La formación del complejo puede modificar el espectro de absorción. Como éste no es fluorescente, sólo la emisión de  $N^*$  se observa y  $\tau$  no se modifica.

#### 4.5. Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueamiento

Esta técnica es conocida como FRAP por sus siglas en inglés (*fluorescence recovery after photobleaching*). El objetivo es perturbar el sistema estudiado haciendo desaparecer la fluorescencia y estudiar su reaparición. Hace más de treinta años, los primeros experimentos de Axelrod [18] habían sido realizados para visualizar la movilidad lateral y la dinámica de proteínas fluorescentes en células vivas. Esta técnica se ha desarrollado mucho con la aparición de las proteínas de fusión como GFP (*green fluorescent protein*) y con la evolución de los microscopios. Ahora se usa para medir la difusión de moléculas dentro de la célula.

El objetivo de la técnica es producir un "hueco" de forma conocida por pérdida de fluorescencia irreversible en un espacio de la célula con el fin de analizar como se llena con el reservorio de moléculas fluorescentes que se quiere estudiar. La figura 10 muestra una curva de recuperación de fluorescencia típica e ideal.

En un sistema muy lleno como una célula, no se regresa generalmente a la intensidad inicial. Esto se explica ya que una parte de las moléculas fluorescentes no se puede difundir para llenar la zona blanqueada durante el tiempo del experimento, se habla de fracción inmóvil, la cual está dada por:

$$IM = 1 - M$$

donde  $M$  es la fracción móvil obtenida en primera aproximación por:

$$M = \frac{F_\infty - F_0}{1 - F_0} = e^{-(t-t_0)/\tau}$$

donde  $\tau$  es el medio tiempo de residencia que se relaciona con el coeficiente de difusión por:

$$R^2 = \frac{\tau}{4D}$$

con  $R$ , el radio del haz focalizado.

Si se quiere una precisión alta, es necesario afinar los modelos usando los parámetros geométricos del perfil de fotoblanqueamiento y suponiendo la naturaleza de los movimientos moleculares (difusión 1, 2 o 3D, transporte, intercambio). En las referencias [20] y [21], se encontrarán expresiones analíticas utilizadas en algunos casos. La complejidad en la determinación correcta de las cantidades características de difusión, transporte e intercambio hace que frecuentemente los estudios realizados en células sean comparativos.

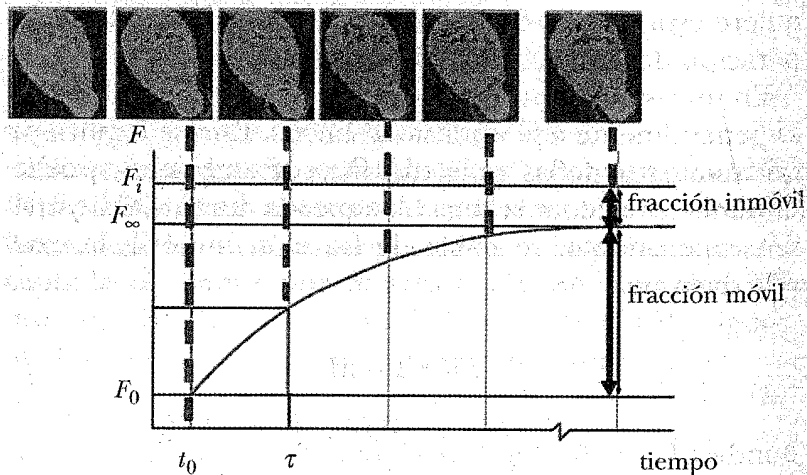


Figura 10. Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueamiento. Tras el fotoblanqueamiento al tiempo  $t_0$ , la intensidad baja de  $F_i$  a  $F_0$ . La fluorescencia reaparece después hasta un máximo  $F$ . Adaptada de [19].

#### 4.6. Transferencia de energía de fluorescencia

La transferencia de energía de fluorescencia o transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés) es un método muy potente para la obtención de información estructural y dinámica, en particular, para el estudio de la interacción proteína-proteína.

En este fenómeno, hay intercambio de energía por resonancia entre el momento dipolar de emisión de un fluoróforo en el estado excitado (el donador D) y el momento dipolar de absorción de un cromóforo en el estado fundamental (el aceptor A que no es necesariamente fluorescente) [22]. Después de haber excitado a la longitud de onda de absorción del donador, una parte de la energía se va a desactivar por resonancia. La fluorescencia del donador va a disminuir y al mismo tiempo va a aparecer la fluorescencia del aceptor en el caso de que sea fluorescente. Esto necesita una orientación adecuada de los momentos dipolares y una distancia pequeña (1-10 nm) entre ellos. Otra condición es que la energía que puede ceder el donador cuando regresa al estado fundamental pueda ser absorbida por el aceptor para alcanzar un estado excitado permitido por la mecánica cuántica. Por lo tanto, el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor se tienen que traslapar por lo menos parcialmente.

La eficiencia de la transferencia  $E_t$ , se define como la fracción de donadores excitados que se desactivan por transferencia con una constante de velocidad  $k_t$ :

$$E_t = \frac{k_t}{k_F + k_{nr} + k_{ST} + k_t} = \frac{k_t}{\frac{1}{\tau_D} + k_t} = \frac{k_t \tau_D}{1 + k_t \tau_D}$$

Para medir  $E_t$ , se pueden comparar los rendimientos cuánticos del donador  $D$ , las intensidades (cuando se tienen las mismas concentraciones, lo que es difícil *in vivo*) o los tiempos de vida, en ausencia ( $\Phi_D, I_D, \tau_D$ ) y en presencia del aceptor  $A$  ( $\Phi_{DA}, I_{DA}, \tau_{DA}$ ):

$$E_t = 1 - \frac{\Phi_{DA}}{\Phi_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}.$$

Los resultados se pueden interpretar en términos de distancia entre donador y aceptor. Este desarrollo se debe a T. Förster (1949) que encontró que la eficiencia de la transferencia variaba como el inverso de la sexta potencia de la distancia  $R$ :

$$E_t = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$$

y según la definición de  $E_t$ :

$$k_t = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

donde  $R_0$  es la distancia característica de Förster para la cual la desactivación por transferencia es igual a la desactivación por todos los otros procesos:

$$k_t = k_F + k_{nr} + k_{ST} = \frac{1}{\tau_D}.$$

Por lo tanto,  $R_0$  es la distancia para la cual  $E_t = 50\%$ . Esta distancia, que depende de las condiciones experimentales y de la pareja  $A-D$ , tiene que ser medida para determinar la transferencia en términos de distancia  $D-A$ .

Se escribe como  $R_0 = 9.79 \cdot 10^{-5} (J\kappa^2\Phi_D n^{-4})^{1/6}$  en cm, donde  $n$  es el índice de refracción del medio que separa  $A$  y  $D$ ;  $\kappa^2$  es el factor de orientación de los momentos dipolares de emisión de  $D$  en el estado excitado y de absorción de  $A$  en el estado fundamental. Si todas las orientaciones son posibles,  $\kappa^2 = 2/3$ .  $J$  es la integral de traslape del espectro de emisión, normalizado a uno, del donador y del espectro de absorción molar del aceptor.

A pesar de que la intensidad de fluorescencia del donador en presencia del aceptor  $I_{DA}$  puede ser medida fácilmente, la intensidad de fluorescencia del donador en la ausencia del aceptor  $I_D$  es difícilmente accesible. Esta cantidad puede ser determinada con la estimación de la pérdida de intensidad de fluorescencia del donador debida al FRET midiendo la intensidad de fluorescencia del aceptor.

El éxito de esta medición, depende de cuánto pueden ser separados los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia del donador y del aceptor. Para que el FRET ocurra, es necesario que haya un cierto traslape entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor, por lo tanto en la mayoría de los casos, habrá también un cierto traslape entre los espectros de excitación del donador y del aceptor y los espectros de emisión de los mismos, como se puede observar en la figura 11.

Por lo tanto, la señal de fluorescencia registrada a las longitudes de onda de emisión del aceptor no puede ser totalmente atribuida a la transferencia de energía del donador al aceptor. Contiene contribuciones de las moléculas



de aceptor que son directamente excitadas a las longitudes de onda de excitación del donador y de moléculas del donador que emiten a las longitudes de onda de emisión del aceptor. Para resolver esto, se trata de evaluar la señal de fluorescencia del donador, lo que se puede realizar, ya que en la mayoría de los casos, una parte del espectro de emisión del donador no contiene fluorescencia del aceptor (figura 11).

Las aplicaciones del FRET en cancerología son cada vez más numerosas tanto a nivel de diagnóstico *in vitro* [23] e *in situ* [24] como en investigación fundamental, particularmente en biología celular.

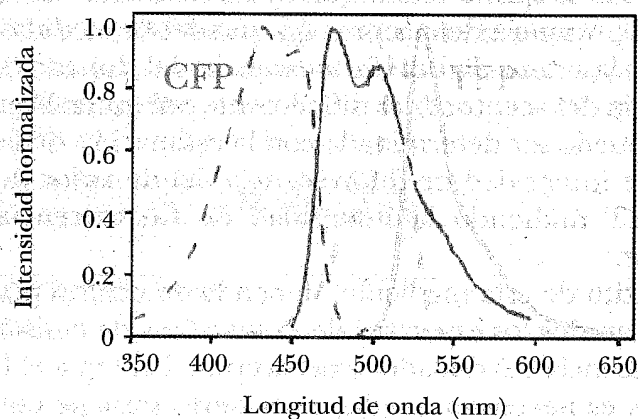


Figura 11. Espectros de excitación (líneas discontinuas) y de emisión (líneas continuas) de fluorescencia de CFP y YFP mostrando el traslape entre los diferentes espectros.

#### 4.7. Anisotropía de fluorescencia

Si se excita una muestra con luz polarizada linealmente, se puede observar en algunos casos que la fluorescencia está también polarizada. El grado de polarización es

cuantificado por una magnitud llamada anisotropía de fluorescencia  $r$ , definida como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

donde  $I_{\parallel}$  et  $I_{\perp}$  son las intensidades de las componentes paralela y perpendicular de la fluorescencia con respecto a la polarización de la luz de excitación (figura 12).

La polarización de fluorescencia se entiende fácilmente considerando una sola molécula excitada. Si se tiene un dipolo de transición  $\vec{\mu}$  orientado paralelamente al eje  $z$ , éste emite en todas las direcciones con una probabilidad proporcional a  $(\vec{\mu} \cdot \vec{E})^2$ , es decir proporcional a  $\cos^2\theta$ , donde  $\theta$  es el ángulo entre el dipolo y el campo eléctrico. Por lo tanto, si se excita un conjunto de moléculas con orientaciones aleatorias, las que serán preferencialmente excitadas son las que van a tener su dipolo de transición en la dirección del campo eléctrico, lo que conduce a una fotoselección. La fluorescencia emitida por este conjunto de moléculas excitadas va por lo tanto a estar polarizada.

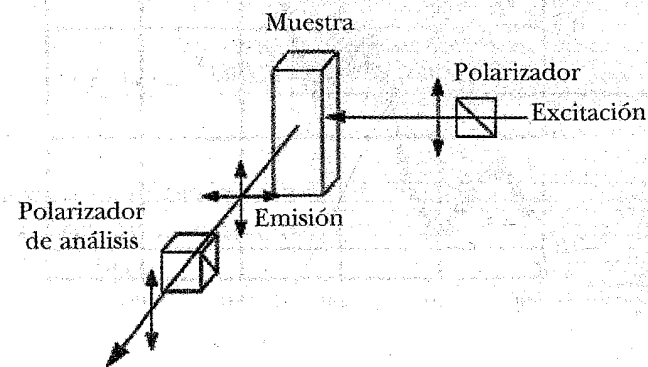


Figura 12. Dispositivo de medición de la anisotropía de fluorescencia.

El valor de  $r$  depende del ángulo  $\alpha$  entre los dipolos de transición de excitación y de emisión. De manera general,  $r$  está dado por:

$$r = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{5}$$

Por ejemplo,  $r = 0.4$  si  $\alpha = 0^\circ$  y  $r = -0.2$  si  $\alpha = 90^\circ$ . La figura 13 muestra la anisotropía de fluorescencia de la rodamina 6G en una matriz rígida medida en función de la longitud de onda de excitación.

La anisotropía es cercana de 0.4 si se excita en la banda  $S_0-S_1$  y de  $-0.2$  si se excita en la banda  $S_0-S_2$ , lo que indica que los dipolos de transición  $S_0-S_1$  y  $S_0-S_2$  son perpendiculares.

La intensidad isotrópica es

$$I_{\text{iso}} = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$$

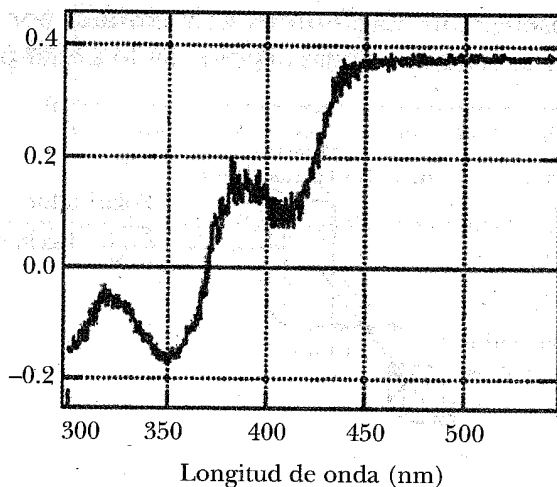


Figura 13. Anisotropía de fluorescencia de la rodamina 6G en una matriz rígida.

su decaimiento es exponencial:

$$I_{\text{iso}}(t) = I_{\text{iso}}(0) e^{-k_F t},$$

donde  $k_F$  es la constante de velocidad para la desactivación de la molécula excitada.

En solución, las moléculas se reorientan por difusión, por lo tanto, la anisotropía de polarización decrece. En general, este decrecimiento está dado por:

$$r(t) = r_0 e^{-k_{\text{rot}} t},$$

donde  $r_0$  es la anisotropía inicial y  $k_{\text{rot}}$  la constante de velocidad de difusión rotacional de la molécula.

La evolución temporal de los componentes paralelo y perpendicular de la fluorescencia es biexponencial:

$$I_{\parallel}(t) = \frac{I_{\text{iso}}(0)}{3} \left[ e^{-k_F t} + 2r_0 e^{-(k_F + k_{\text{rot}})t} \right]$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{I_{\text{iso}}(0)}{3} \left[ e^{-k_F t} - r_0 e^{-(k_F + k_{\text{rot}})t} \right].$$

Los valores experimentales de  $k_{\text{rot}}$  son en general analizados con una ecuación derivada de la de Stokes-Einstein-Debye:

$$k_{\text{rot}} = \frac{k_B T}{f V C \eta},$$

donde  $V$  es el volumen molecular,  $\eta$  la viscosidad del solvente,  $f$  un factor de forma, que depende de la relación entre los ejes largos y cortos de la molécula y  $C$  un parámetro describiendo las interacciones entre el rotor y el solvente.

#### 4.8. El equipo

El esquema de un espectrofluorímetro se presenta en la figura 14. La luz se produce con una lámpara de Xe que puede emitir de manera continua o pulsada en la región 200 - 900 nm. La región espectral de excitación

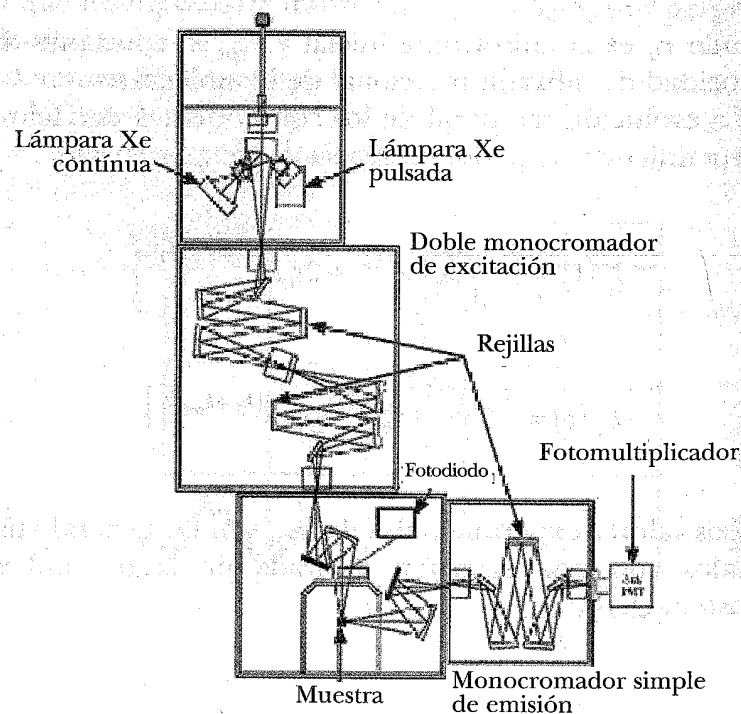


Figura 14. Esquema de un espectrofluorímetro.

se selecciona con un doble monocromador que permite excitar en la región 200 - 700 nm. La luz llega a la muestra que emite en todas las direcciones. Se puede recuperar la señal de dos maneras: a 90° o a 22.5° de la luz incidente. La señal de emisión es analizada por un simple monocromador. El conteo de los fotones se hace antes y después de la muestra con un fotodiodo y un fotomultiplicador (300 - 850 nm), respectivamente. Estas condiciones permiten obtener una resolución máxima de 0.2 nm con una precisión de 0.5 nm.

#### 5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis molecular que permite obtener informaciones sobre los enlaces químicos y la estructura molecular de los materiales analizados. En las moléculas orgánicas, los átomos están ligados entre ellos por enlaces que tienen una cierta energía, característica de cada tipo de enlace: C-H, C-OH, C=O, C=C, etcétera. Como la espectroscopía UV-Vis, la absorción IR es un proceso que involucra la absorción de la luz por las moléculas de la muestra. Pero, la energía de la radiación IR es insuficiente para ser absorbida por los niveles electrónicos de la moléculas pero sí suficiente para ser absorbida por las vibraciones de los enlaces de los grupos funcionales [25-27]. Un espectro de absorción IR está compuesto de bandas de absorción características de estas vibraciones. La interpretación del espectro permite entonces reconstruir la molécula e identificar el producto.

Si consideramos una molécula compuesta de  $N$  átomos, el número de grados de libertad de movimiento es  $3N$ . Dentro de estos grados de libertad, tres corresponden

a traslaciones de la molécula en su conjunto (una traslación por cada eje) y tres a rotaciones de la molécula en su conjunto alrededor de estos mismos ejes (en el caso de una molécula lineal, solamente existen dos rotaciones). Los  $3N-6$  ( $3N-5$ , en el caso lineal) grados de libertad restantes, corresponden a movimientos de vibraciones en los cuales los átomos no se mueven todos en una misma dirección.

Estos movimientos de vibración se llaman modos normales de vibración. Un modo normal de vibración de una molécula es un movimiento sincrónico de átomos o de grupos de átomos que pueden ser excitados independientemente de los otros modos normales de la vibración de la molécula.

Por ejemplo, la molécula de  $\text{CO}_2$  (figura 15) es lineal y posee 3 átomos, por lo tanto tiene  $3 \times 3 - 5 = 4$  modos normales de vibración: dos vibraciones del enlace C-O, simétrica y asimétrica, no degeneradas y dos vibraciones de deformación del ángulo O-C-O, degeneradas. En este caso, estos modos se encuentran respectivamente a  $1340$ ,  $2347$  y  $673 \text{ cm}^{-1}$ .

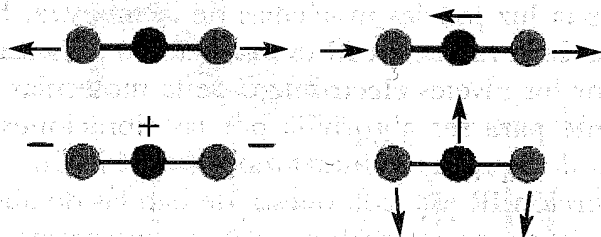


Figura 15. Modos normales de vibración de la molécula de  $\text{CO}_2$ .

### 5.1. Teoría

El momento dipolar total de una molécula está compuesto por el momento dipolar permanente y por el momento dipolar inducido. Estos dos pueden cambiar con los movimientos de vibración de la molécula. Aquí nos va a interesar el momento dipolar permanente  $\bar{\mu}_p$  de la molécula. Para vibraciones de pequeña amplitud, se puede hacer un desarrollo en serie de Taylor del momento dipolar sobre las coordenadas normales de vibración

$$\bar{\mu}_p = \bar{\mu}(0) + \frac{\partial \bar{\mu}_p}{\partial q} q + \dots$$

La coordenada normal de vibración puede ser descrita como la de un oscilador armónico:

$$q = q_0 \cos \omega t$$

y por lo tanto, a primer orden:

$$\bar{\mu}_p = \bar{\mu}(0) + \frac{\partial \bar{\mu}_p}{\partial q} q_0 \cos \omega t.$$

El primer término del lado derecho, es el momento dipolar permanente al equilibrio. El segundo término representa un dipolo oscilando a la frecuencia  $\omega$ , es decir una fuente de radiación a la misma frecuencia, en este caso en el infrarrojo. Este dipolo puede también absorber energía a la misma frecuencia.

Para que haya absorción en el infrarrojo es necesario que:

$$\frac{\partial \bar{\mu}_p}{\partial q} \neq 0,$$

es decir que el momento dipolar permanente cambie durante la vibración. Si esto no sucede, el modo no es activo en IR, lo que es el caso por ejemplo, del modo de vibración de elongación simétrico de la molécula de  $\text{CO}_2$  (figura 15) situado a  $1340 \text{ cm}^{-1}$  que no se observa (figura 16), pero este modo es activo en Raman.

La intensidad de la absorción será más fuerte conforme la variación del momento dipolar será importante. Es la razón por la cual, los grupos carbonilo y éster producen absorciones intensas en el IR.

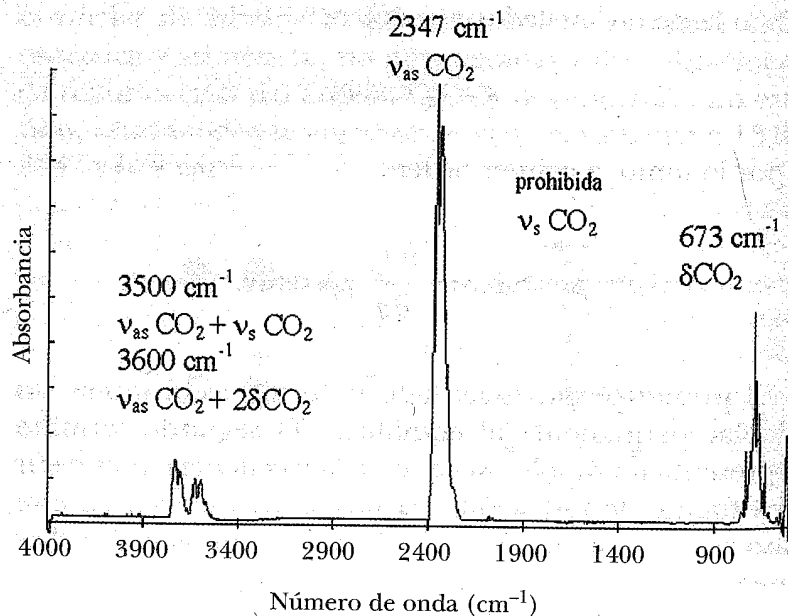


Figura 16. Espectro de absorción infrarroja del  $\text{CO}_2$ .

Por otra parte, cada enlace no puede vibrar de manera independiente de los otros. Se produce un fenómeno de acoplamiento vibracional más importante conforme las frecuencias sean cercanas y los enlaces químicos asociados sean vecinos en la molécula. Las vibraciones de las moléculas resultan del acoplamiento en fase y en oposición de fase entre enlaces vecinos. Por razones de simetría, tendrán sus momentos de transición según los ejes de la molécula.

El espectro de absorción infrarroja de moléculas orgánicas, tiene habitualmente unas bandas características de ciertas vibraciones moleculares lo que permite la indentificación de la muestra. En la tabla 3, se presentan algunas de las vibraciones características de ciertos grupos funcionales.

## 5.2. Absorción IR de péptidos y proteínas

En el caso de los biopolímeros, un aspecto importante es saber cómo su conformación modifica los modos normales de vibración. Los péptidos y las proteínas están formados de un grupo que se repite a lo largo de toda la cadena: el enlace peptídico o grupo amida (figura 17) que está compuesto por dos grupos funcionales: N-H y C=O. Las bandas de absorción de este grupo forman la mayor parte del espectro de absorción infrarroja de las

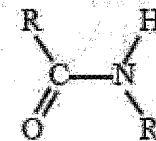


Figura 17. El enlace peptídico, base de la estructura primaria de las proteínas.



Tabla 3  
FRECUENCIAS DE ABSORCIÓN CARACTERÍSTICAS  
DE ALGUNOS GRUPOS MOLECULARES\*

Elongación X-H	Enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Hidroxil "libre"	O-H	3610 - 3640
Hidroxil puente intermol.	O-H...O	3200 - 3550
Hidroxil puente intramol.	O-H...O	2500 - 3200
Hidroxil deuteriado	O-D	2630
Aminas	N-H	3300 - 3500
Aromáticos	C-H	3060 - 3100
Alquenos	C-H	3020 - 3080
Alcanos	C-H	2850 - 2960
Aminas primarias	-NH <sub>2</sub>	3300 - 3500 (doblete)
Aminas secundarias	-NH	3300 - 3500 (singulete)
Elongación -C-X		
Alcanos	-C-C	600 - 1500
Alquenos	-C=C	1620 - 1680
Alquinos	-C≡C	2100 - 2260
Nitrilos	-C≡N	2200 - 2300
Carboxílicos	-C-O-	1000 - 1300
	HOC=O	1700 - 1725
Ésteres	ROC=O	1730 - 1750
Cetonas	-C=O	1705 - 1725
Aldehídos	HC=O	1720 - 1740

\*Referencia [28]

proteínas. Se pueden observar hasta 9 bandas características de este grupo llamadas amida A, B, I, ..., VII. Las bandas amida A y amida B se deben a una resonancia de Fermi entre el armónico de la banda amida II y la banda de elongación del grupo N-H. Las bandas amida I y amida II son las más importantes del espectro ya que son muy sensibles a la conformación. En la tabla 4, se encuentran las principales bandas de absorción de este grupo.

Además del grupo amida, los residuos aparecen solamente por la presencia de las vibraciones de los grupos CH que aparecen cerca de 2900 cm<sup>-1</sup> para las vibraciones de elongación y cerca de 1450 cm<sup>-1</sup> para las de deformación. Algunos aminoácidos pueden presentar una banda característica que permite identificarlos como es el caso del triptofano que presenta una banda fina e intensa en 1002 cm<sup>-1</sup>. Un espectro de absorción característico de proteína en polvo se presenta en la figura 18.

Tabla 4  
VIBRACIONES DEL GRUPO AMIDA OBSERVADAS  
EN ABSORCIÓN INFRARROJA\*

Región (cm <sup>-1</sup> )	Nombre	Atribución
~3300	Amida A	$\nu_{\text{N-H}}$
~3080	Amida B	Armónico Amida II + RF <sub>NH</sub>
1600 - 1700	Amida I	$\nu_{\text{C=O}}$ (80%) + $\nu_{\text{C-N}}$ (10%) + $\nu_{\text{N-H}}$ (10%)
1520 - 1580	Amida II	$\delta_{\text{N-H}}$ (60%) + $\nu_{\text{C-N}}$ (40%)
1240 - 1310	Amida III	$\nu_{\text{C-N}}$ (30%) + $\delta_{\text{N-H}}$ (30%) + $\nu_{\text{C=O}}$ (10%) + $\delta_{\text{O=C-N}}$ (10%)
625 - 770	Amida IV	$\delta_{\text{O=C-N}}$ (40%)
640 - 800	Amida V	fuera del plano $\delta_{\text{N-H}}$
530 - 610	Amida VI	fuera del plano $\delta_{\text{C=O}}$
~200	Amida VII	fuera del plano $\tau_{\text{C-N}}$

\*v: elongación,  $\delta$ : deformación, RF: resonancia de Fermi, las vibraciones amida V, VI y VII son vibraciones fuera del plano [28, 29].

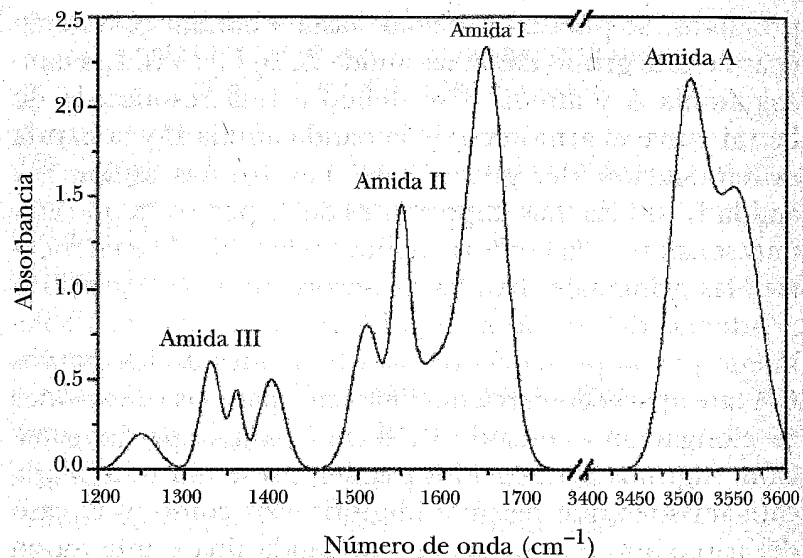


Figura 18. Espectro característico de absorción infrarroja de un polipéptido en polvo.

Por la propiedad fundamental del grupo peptídico de establecer puentes de hidrógeno entre otros grupos idénticos de la misma cadena, el espectro de absorción infrarroja nos proporciona informaciones sobre la estructura secundaria de la proteína.

Generalmente, las proteínas se estudian en solución acuosa. En este caso tenemos dos dificultades: primero, el agua absorbe mucho en el IR, lo que implica realizar películas de espesor menor a  $15 \mu\text{m}$  con una concentración suficiente (del orden de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ); segundo, la vibración de deformación del agua se sitúa a  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , en la misma región que la banda amida I, lo que puede dificultar la obtención de espectros en solución acuosa aún después de la sustracción del espectro del agua. Una forma de solucionar este problema es usar agua deuterada cuya banda de deformación absorbe cerca de  $1210 \text{ cm}^{-1}$ .

Pero en este caso, puede haber intercambio del deuterio del agua con los átomos de hidrógeno de los grupos  $\text{NH} \rightarrow \text{ND}$  y se pueden observar desplazamientos de las bandas amida I y II.

Un gran número de polipéptidos con una estructura secundaria bien definida, ha sido utilizado para la caracterización del espectro IR de proteínas y en particular, con el análisis de la banda amida I [30-33]. La forma de la banda amida I, de proteínas globulares es característica de su estructura secundaria.

La banda de absorción amida I, está principalmente determinada por la conformación del esqueleto de la cadena de aminoácidos, independientemente de su secuencia, de sus propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas y de su carga.

En el caso de estructuras en hojas  $\beta$  antiparalelas, la frecuencia promedio de la componente principal es alrededor de  $1629 \text{ cm}^{-1}$ , pero puede variar entre  $1615$  y  $1637 \text{ cm}^{-1}$ . La frecuencia de la segunda banda varía entre  $1685$  y  $1696 \text{ cm}^{-1}$ . La estructura en hojas  $\beta$  paralelas que no es muy frecuente en polipéptidos sintéticos, tiene un máximo de absorción en  $1640 \text{ cm}^{-1}$ .

En el caso de hélices  $\alpha$ , la frecuencia media ha sido encontrada en  $1652 \text{ cm}^{-1}$  para la banda amida I y en  $1548 \text{ cm}^{-1}$  para la banda amida II. Se ha observado que el ancho de banda depende de la estabilidad de la hélice. Las más estables tienen un ancho de banda alrededor de  $15 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a una energía libre de plegamiento mayor a  $300 \text{ cal/mol}$ . Otras hélices pueden tener un ancho de banda de  $38 \text{ cm}^{-1}$  y energías libres de transición del orden de  $90 \text{ cal/mol}$ .

La estructura de ansas  $\beta$ , implica 4 aminoácidos que forman un bucle en el cual las dos partes de la cadena separadas por la vuelta adoptan una estructura antiparalela con la formación de un puente de hidrógeno entre el aminoácido  $i$  y el  $i + 3$ . La asignación de bandas por

medio de un análisis de modos normales en la insulina [34], ha mostrado un traslape importante de las vueltas  $\beta$  con la absorción de las hélices  $\alpha$ . Sin embargo, una absorción cerca de  $1680\text{ cm}^{-1}$  se asigna sin ambigüedad a vueltas  $\beta$ .

En la tabla 5 se encuentran las frecuencias de las bandas de absorción amida I y amida II.

Tabla 5  
FRECUENCIAS DE LAS BANDAS AMIDA I Y AMIDA II  
PARA LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

Estructura secundaria	Amida I ( $\text{cm}^{-1}$ )	Amida II ( $\text{cm}^{-1}$ )
Hélices $\alpha$	1645 - 1662	1537 - 1550
Láminas $\beta$	1613 - 1637	1510 - 1530
	1682 - 1689	
Vueltas	1662 - 1682	1530 - 1565
Desordenadas	1637 - 1645	1530 - 1540

Con la publicación de los trabajos de Byler y Susi [34-36] ha empezado la determinación por IR de la estructura secundaria de proteínas. Esto ha sido posible gracias a la obtención de espectros digitalizados por espectrómetros FTIR con una muy buena relación señal/ruido y el acceso a computadoras y programas capaces de realizar este trabajo en poco tiempo.

La figura 19 muestra la deconvolución de la banda amida I de una proteína. Esta deconvolución se realiza con perfiles de bandas que son mezclas de bandas lorentziana y gaussiana. Este trabajo es facilitado si anteriormente se obtienen los máximos de cada componente con un espectro de derivada segunda. La variabilidad de la frecuencia de la banda amida I se aprovecha para determi-

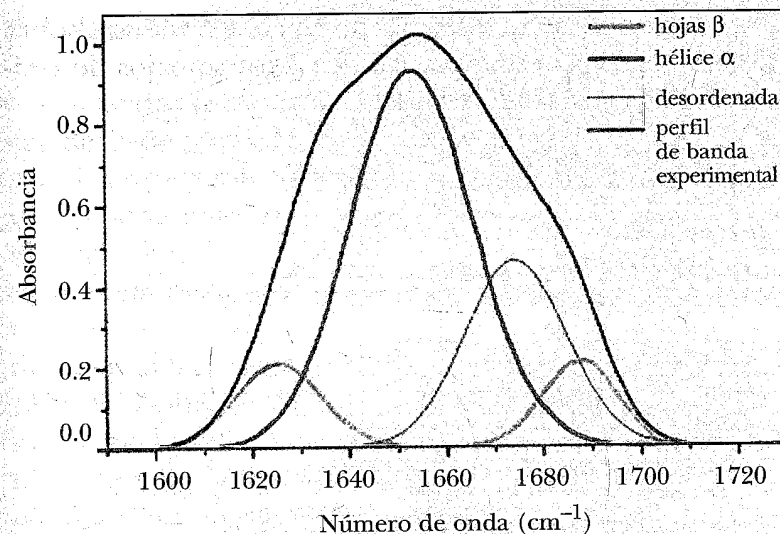


Figura 19. Banda amida I y su deconvolución.

nar la proporción de cada estructura secundaria en las proteínas. La decomposición de la banda amida I en multicomponentes, cada una centrada en un tipo de estructura secundaria permite esto gracias a la intensidad integrada (superficie) de cada componente.

En la figura 20, se presentan los perfiles y deconvolución de la banda amida I de la lisozima en la conformación nativa y en la conformación desnaturalizada. Como se puede observar, la banda amida I está compuesta de 6 componentes. El contenido en los hélices  $\alpha$  obtenido en esta deconvolución está de acuerdo con los resultados de cristalografía. Se observa que la banda amida I en el caso nativo es relativamente simétrica con un máximo en  $1650\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la estructura en hélices  $\alpha$ , mientras que en el estado desnaturalizado posee un segundo máximo cerca de  $1630\text{ cm}^{-1}$ , indicativo de la predominancia de la estructura en láminas  $\beta$  y desordenada.

El lector podrá encontrar informaciones valiosas sobre el estudio de proteínas por FTIR en los trabajos de revisión de Arrondo *et al.* [37, 38].

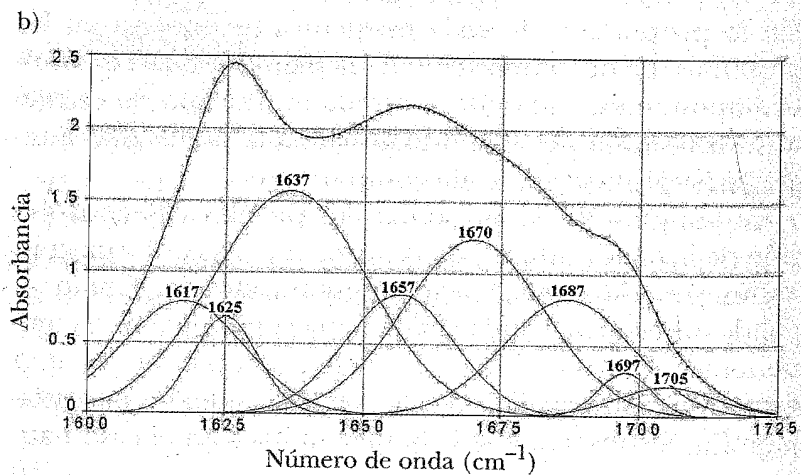
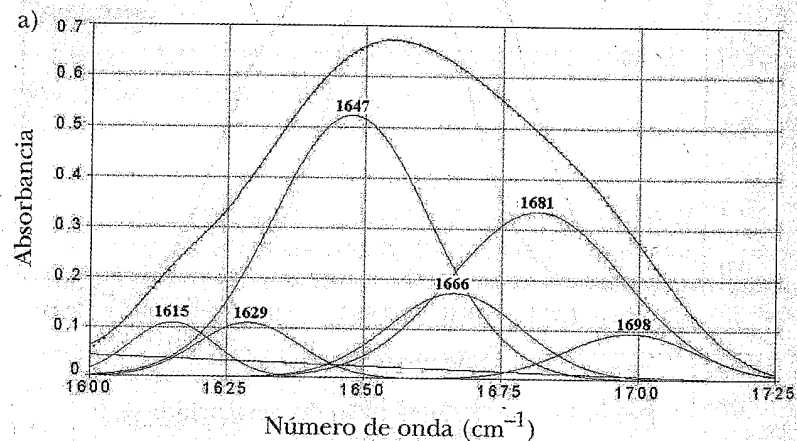


Figura 20. Deconvolución de la banda amida I de la lisozima: a) estado nativo; b) estado desnaturalizado.

### 5.3. Absorción IR de otras moléculas biológicas

Los ácidos grasos presentan las vibraciones características de cadenas hidrocarbonadas largas de grupos  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$  entre  $2800$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  para los modos de elongación y alrededor de  $1450\text{ cm}^{-1}$  para las vibraciones de deformación.

Además, en la región  $1000$ - $1120\text{ cm}^{-1}$  se encuentran los modos de vibración de elongación de los enlaces  $-\text{C}-\text{C}$  del esqueleto de la cadena. El estado de deprotonación del ácido puede ser fácilmente detectado ya que la forma ácida del grupo carbonilo absorbe en  $1700\text{ cm}^{-1}$  mientras que la forma carboxilato se caracteriza por dos bandas intensas en  $1410$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$ .

Los fosfolípidos presentan también las bandas de absorción de las cadenas hidrocarbonadas a las cuales hay que añadir las bandas de absorción de los grupos éster

Tabla 6

ATRIBUCIONES DE LAS PRINCIPALES VIBRACIONES DE FOSFOLÍPIDOS

Vibración	Región ( $\text{cm}^{-1}$ )
$-\text{C}-\text{H}$ insaturado	3010
$-\text{CH}_3$ antisimétrico	2950
$-\text{CH}_3$ simétrico	2880
$-\text{CH}_2$ antisimétrico	2920
$-\text{CH}_2$ simétrico	2850
$\text{C}=\text{O}$ éster	1730
$-\text{CH}_2$ deformación	1460
$\text{PO}_2^-$ antisimétrico	1230
$\text{PO}_2^-$ simétrico	1085
$\text{OC}-\text{O}-\text{C}$ éster	1170
$\text{C}-\text{O}-\text{P}$ elongación	1045
$\text{CN}$ elongación ( $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ )	970

( $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ ) y fosfato ( $1085\text{ cm}^{-1}$  para el modo simétrico y  $1230\text{ cm}^{-1}$  para el modo antisimétrico). En la tabla 6, se encuentran algunos valores característicos de las bandas de vibración de estas moléculas.

El espectro de absorción del ADN se caracteriza por bandas intensas asociadas al azúcar cíclico (desixorribosa pentosa) y a los grupos fosfato ( $800 - 1250\text{ cm}^{-1}$ ) y por bandas debidas a las bases nucleicas ( $1500 - 1750\text{ cm}^{-1}$ ). Estas absorciones son sensibles a la conformación de la molécula de ADN y cambian de frecuencia conforme cambia la estructura.

Existe una amplia bibliografía del uso de la absorción infrarroja para el estudio de las biomoléculas. El lector interesado podrá consultar por ejemplo las referencias [39-43] y las que están incluidas.

#### 5.4. El equipo

Se necesita una fuente ancha de luz infrarroja con un interferómetro de Michelson. Ésta se divide en dos haces por una lámina separadora. Cada uno de ellos se refleja en un espejo y se recombina sobre la parte trasera de la separadora (figura 21). Uno de los espejos es fijo y el otro se mueve. Cuando se recombinan los dos haces, si la distancia entre la separadora y los espejos no es la misma, se producirán interferencias para diferentes longitudes de onda.

Se puede mostrar que la intensidad de la luz en función de la posición del segundo espejo es la transformada de Fourier de la intensidad en función del número de onda.

En absorción FTIR, se manda la luz sobre la muestra, en este caso con un dispositivo ATR (reflexión total at-

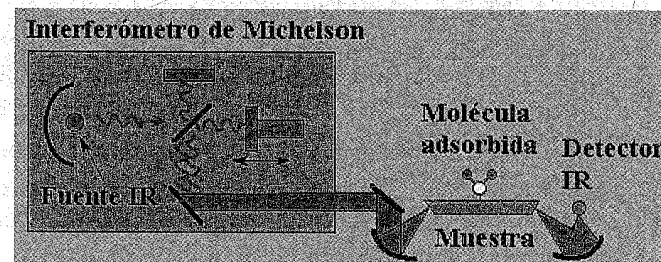


Figura 21. Esquema de un espectrómetro FTIR con dispositivo ATR.

nuada) y la intensidad se mide con un detector IR. Cuando no se tiene el dispositivo ATR, para muestras sólidas se hacen pastillas de la muestra disuelta en KBr y para muestras líquidas se usan celdas para líquidos (de camino óptico fijo o de espesor variable) con ventanas hidrofóbicas, generalmente de  $\text{CaF}_2$ .

#### 6. EPECTROSCOPIA RAMAN

El efecto Raman fue descubierto en 1928, pero el estudio de moléculas biológicas con esta técnica está actualmente en pleno desarrollo. La dispersión Raman y sus variantes, son técnicas que involucran también los estados vibracionales de las moléculas. Es el punto común con la absorción infrarroja. Sin embargo, el mecanismo de interacción de una onda electromagnética con las moléculas es diferente y las reglas de selección también son diferentes. Por lo tanto, las dos técnicas pueden conducir a espectros diferentes pero complementarios [25, 44] como se puede observar en la figura 22. Algunas bandas son comunes a los dos espectros, otras existen solamente en uno de los dos.



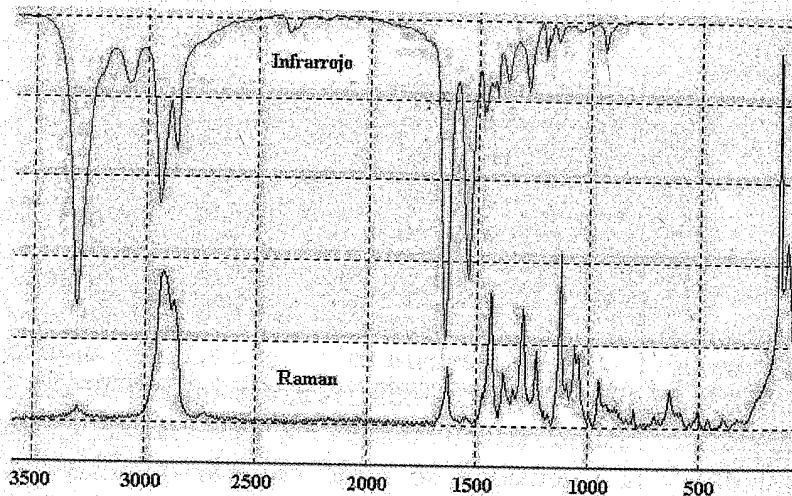


Figura 22. Espectros de absorción infrarroja y Raman de la poliamida.

### 6.1. Teoría

Cuando una radiación monocromática incide sobre una muestra, esta radiación puede interactuar con la muestra de varias maneras: la luz puede ser reflejada, absorbida o dispersada. En la dispersión Raman, es el análisis de la luz dispersada que nos proporciona informaciones sobre la estructura molecular de la muestra.

Se supone una radiación electromagnética monocromática (luz láser) que incide sobre una molécula. La variación temporal del campo eléctrico se puede escribir

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos \omega_0 t,$$

donde  $\omega_0 = 2\pi\nu_0$  es la frecuencia angular de la onda incidente. Este campo eléctrico produce en la molécula, un momento dipolar inducido  $\vec{\mu}_i(t)$ :

$$\vec{\mu}_i(t) = \alpha(\omega) \vec{E}(t) = \alpha(\omega) \vec{E}_0 \cos \omega_0 t,$$

donde  $\alpha(\omega)$  es la polarizabilidad de la molécula. Como la molécula vibra, la polarizabilidad varía en el tiempo. Además, considerando vibraciones de pequeña amplitud, se puede hacer un desarrollo en serie de Taylor a primer orden con respecto a la coordenada normal de vibración  $q = q_0 \cos \omega t$  y escribir:

$$\alpha(\omega) \approx \alpha_0(\omega) + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 \cos \omega t,$$

donde el primer término es la polarizabilidad de la molécula en la conformación de equilibrio, y el segundo término es la derivada de la polarizabilidad con respecto a la coordenada normal de vibración  $q$  y representa el cambio de polarizabilidad durante la vibración molecular de frecuencia  $\omega$ . Se puede entonces reescribir el momento dipolar inducido:

$$\vec{\mu}_i(t) = \left[ \alpha_0(\omega) + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 \cos \omega t \right] \vec{E}_0 \cos \omega_0 t$$

y

$$\vec{\mu}_i(t) = \alpha_0(\omega) \vec{E}_0 \cos \omega_0 t + \frac{q_0 \vec{E}_0}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} \left[ \cos(\omega_0 + \omega)t + \cos(\omega_0 - \omega)t \right].$$

El momento dipolar oscilante emite a la frecuencia  $\omega$ , (dispersión Rayleigh), a la frecuencia  $\omega_0 + \omega$  (Stokes) y a

la frecuencia  $\omega_0 - \omega$  (anti-Stokes). Este mismo esquema se producirá para todos los modos de vibración activos de la molécula y no depende de la radiación incidente, es decir que con cualquier láser encontraremos bandas de vibración a la misma distancia (en frecuencia) de la frecuencia incidente. La dispersión Rayleigh concierne a la mayoría de los fotones dispersados (figura 23). El efecto Raman es sólo una pequeña parte ( $10^{-5}$ ) de la luz dispersada.

Para que la vibración sea activa en Raman, necesita que su polarizabilidad (*i.e.* su momento dipolar inducido) cambie durante la vibración.

Un problema frecuente en espectrometría Raman, es la señal debida a la fluorescencia, que se debe a moléculas de interés o a contaminantes de la muestra y que puede tener una intensidad que impida observar la señal Raman. En este caso es conveniente usar longitudes de

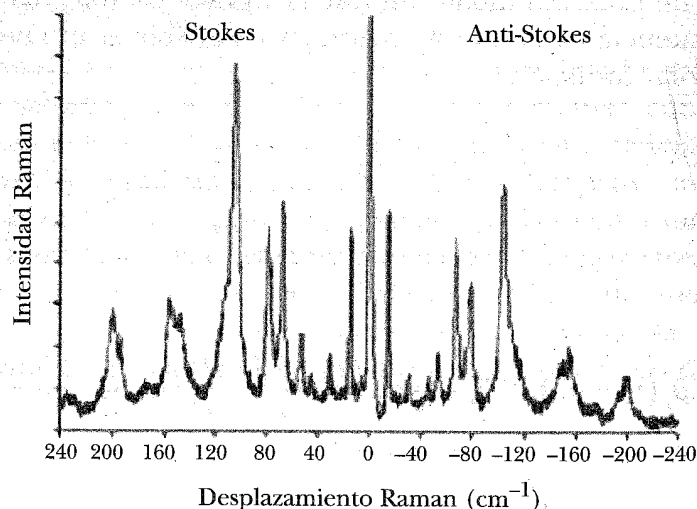


Figura 23. Espectro Raman de la L-cistina. La posición de las bandas Stokes y anti-Stokes es simétrica con respecto a la luz incidente, pero tienen intensidades diferentes.

onda más larga (hacia el rojo o infrarrojo cercano) ya que el desplazamiento Raman (llamada frecuencia por los espectroscopistas) es independiente de la longitud de onda.

## 6.2. Espectroscopía Raman de proteínas

Las principales vibraciones que contribuyen al espectro Raman de proteínas, se deben a los enlaces del grupo peptídico. Producen varias contribuciones en diferentes regiones del espectro. Las más intensas en Raman son los modos amida I y amida III cuyas frecuencias se relacionan a la estructura secundaria de las proteínas. El modo amida I se encuentra entre  $1600$  y  $1700$   $\text{cm}^{-1}$ , y se debe principalmente a la vibración de elongación C=O del grupo peptídico. El modo amida III se encuentra entre  $1200$  y  $1300$   $\text{cm}^{-1}$  y se debe principalmente a un acoplamiento entre la vibración de deformación del grupo N-H y la de elongación del grupo C-N. La vibración amida II que se observa en absorción infrarroja esta prohibida en Raman por razones de simetría. Por otra parte, algunos residuos poseen en Raman un espectro intenso y muy característico, que se puede usar para determinar entornos particulares.

Como ya lo hemos dicho, las frecuencias de los modos amida I y amida III se relacionan con la estructura secundaria. El uso de las dos frecuencias permite una mejor atribución de las estructuras (tabla 7).

De manera opuesta a lo que pasa en FTIR, no hay traslape entre las bandas de la hélice  $\alpha$  y la estructura desordenada, lo que permite una mejor atribución.

Tabla 7

REGIONES DE LOS MODOS DE VIBRACIÓN AMIDA I Y AMIDA III  
DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE PROTEÍNAS

Estructura secundaria	Amida I (cm <sup>-1</sup> )	Amida III (cm <sup>-1</sup> )
Hélice $\alpha$	1645 - 1660	1270 - 1300
Lámina $\beta$	1665 - 1680	1230 - 1240
Vueltas $\beta$	1662 - 1677	1255 - 1300
Desordenada	1660 - 1665	1240 - 1260

La zona entre 1200 y 1300 cm<sup>-1</sup> comprende varias vibraciones, lo que puede dificultar la identificación. En este caso puede ser útil realizar un intercambio H-D (dejando la proteína en agua deuteriada) lo que lleva a un desplazamiento importante de la frecuencia de la banda amida III hacia 980 cm<sup>-1</sup>.

Algunos residuos poseen señales intensas y características:

- La cisteína: dos cisteínas pueden formar un puente disulfuro S-S (500 - 550 cm<sup>-1</sup>) por oxidación del grupo sulfhidrilo -S-H (2550 - 2600 cm<sup>-1</sup>).
- La tirosina tiene un espectro Raman complejo, pero dos bandas (doblete) a 830 y 850 cm<sup>-1</sup> son importantes para determinar el entorno local de este residuo. Este doblete se debe a una resonancia de Fermi entre una vibración del núcleo aromático y un armónico de la vibración de deformación fuera del plano del benceno parasustituido. El cociente  $I_{850}/I_{830}$  se relaciona con la exposición al solvente: un cociente superior a 1 indica una tirosina expuesta cuyo grupo OH es aceptor y donador de puentes de hidrógeno mientras que un cociente inferior a 1 indica una tirosina oculta cuyo OH es donador de puentes de hidrógeno.

- La histidina se caracteriza por la vibración de su núcleo imidazol hacia 1490 cm<sup>-1</sup> pero sus bandas Raman no son sensibles a las modificaciones estructurales.
- La fenilalanina posee varias bandas debidas al núcleo aromático. Tiene una banda muy intensa hacia 1005 cm<sup>-1</sup>.
- El triptofano posee varias bandas debidas al grupo indol. Dentro de éstas, un doblete a 1340 y 1360 cm<sup>-1</sup> es sensible al entorno. Un cociente  $I_{1360}/I_{1340}$  superior a 1 es característico de un triptofano oculto en un entorno hidrófobo (no polar).

### 6.3. Espectroscopía Raman de otras moléculas biológicas

La espectroscopía Raman es una herramienta eficaz en el estudio de la estructura membranaria a nivel molecular ya que la fluidez de la membrana se debe esencialmente a la isomerización de conformación de las cadenas hidrocarbonadas, a la cual es muy sensible esta espectroscopía.

En función de la temperatura, los fosfolípidos tienen cambios importantes de organización a nivel del esqueleto carbonado constituido de enlaces C-C y C-H. En las fases organizadas a baja temperatura, las cadenas están esencialmente en configuración *trans* (figura 24). Cuando la temperatura aumenta, el desorden aparece y se traduce por la aparición de configuraciones izquierdas (rotación de 120° alrededor de un enlace C-C) y por modificaciones de fluidez y de estructura de la bicapa lipídica.

Las vibraciones C-H proporcionan varias bandas de vibración en la región 2800 - 3000 cm<sup>-1</sup>. La banda Raman cerca de 2890 cm<sup>-1</sup>, que se debe a la resonancia de Fermi



Figura 24. Esquema de una cadena hidrocarbonada: a) en configuración *trans*; b) en configuración *izquierda*.

entre los modos de elongación y un armónico de modos de deformación, es muy sensible al arreglo lateral de las cadenas. Su intensidad disminuye cuando el desorden intramolecular de las cadenas aumenta (isomerización *trans-izquierda*). La banda situada a  $2850\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones de elongación ( $\nu_{\text{CH}}$ ) simétricas y su intensidad se queda relativamente constante. Por lo tanto, el cociente  $I_{2850}/I_{2890}$  es frecuentemente utilizado para el estudio de las transiciones de fase de los fosfolípidos. Las vibraciones C-C del esqueleto se encuentran en la región  $1000 - 1140\text{ cm}^{-1}$ . Estas vibraciones son menos intensas pero se puede ver claramente que una banda más ancha a  $1090\text{ cm}^{-1}$  crece cuando el desorden aumenta en la cadena.

También, se pueden ver las instauraciones en las cadenas ya que las frecuencias del enlace doble C=C son diferentes: un enlace *trans* posee una vibración entre  $1670$  y  $1680\text{ cm}^{-1}$  mientras que la del enlace *cis* se encuentra entre  $1650$  y  $1665\text{ cm}^{-1}$ .

La dispersión Raman ha sido también utilizada para estudiar la conformación del ADN. La región  $700 - 1250\text{ cm}^{-1}$  contiene las vibraciones del esqueleto azúcar-fosfato y la región  $1250 - 1700\text{ cm}^{-1}$  contiene las vibraciones de las bases adenina, guanina, timina y citosina. Otras bandas dependen de la estructura macromolecular y pueden servir de marcadores conformacionales. Las bandas del grupo fosfodiéster O-P-O aparecen en la región  $807 - 815\text{ cm}^{-1}$  para la conformación A, cerca de  $835\text{ cm}^{-1}$  para la conformación B y cerca de  $745\text{ cm}^{-1}$  para la conformación Z.

Varias bandas Raman son sensibles a la estructura y es posible seguir los cambios de conformación que pueden ocurrir cuando el ADN interactúa con compuestos diversos como polipéptidos, proteínas, iones metálicos o antibióticos, o cuando hay variación de parámetros físico-químicos como temperatura o pH.

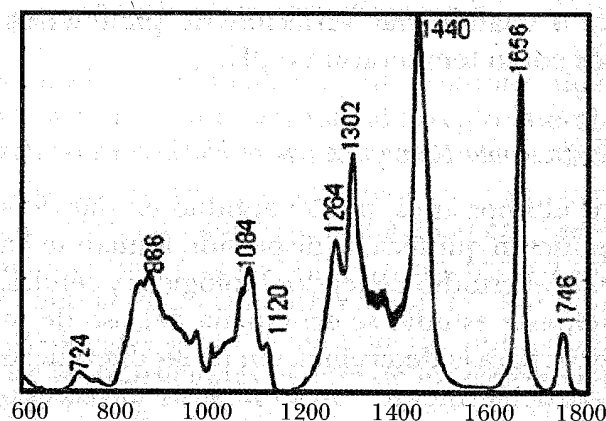
#### 6.4. Espectroscopía Raman en tejidos biológicos y células

En los últimos años, por su aptitud en dar detalles de la composición química, la dispersión Raman se ha orientado hacia el estudio de tejidos biológicos y células. Generalmente, este estudio se acompaña del uso de métodos estadísticos para la determinación de las diferencias espectrales, particularmente con el análisis en componentes principales (PCA).

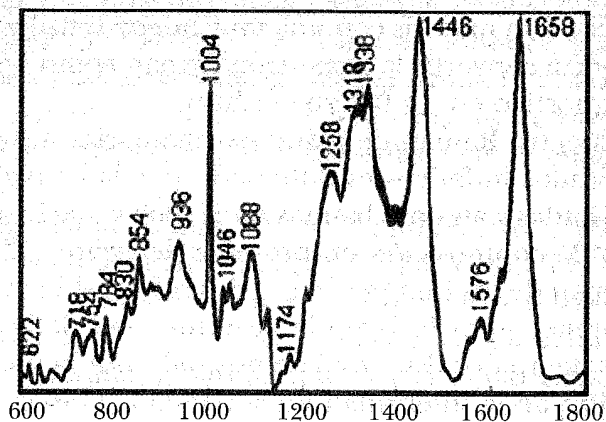
En un trabajo reciente, Kast *et al.* [45] han utilizado esta técnica para analizar tejidos mamarios sanos, con tumores y con mastitis con una muy buena sensibilidad lo que podría convertir la dispersión Raman como un método diagnóstico en un futuro cercano.

El espectro Raman de glándulas mamarias normales y con nódulos linfáticos es dominado por la contribución de los lípidos y algunas bandas a  $762$ ,  $868$  y  $1004\text{ cm}^{-1}$  que reflejan la composición en proteína del tejido. El espectro Raman de los tumores mamarios refleja el incremento en proteína y por lo tanto la disminución relativa de las bandas de lípidos. Esto está demostrado por la fuerte disminución de la intensidad de la banda a  $1746\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de elongación de los C=O lipídicos, la disminución de la banda a  $1440\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{CH}}$ ) y la aparición de nuevas e intensas bandas de proteínas en  $622$ ,  $642$ ,  $830$ ,  $854$ ,  $936$ ,  $1004$ ,  $1174$ ,  $1258$ ,  $1318$ ,  $1338$ ,  $1446$  y  $1576\text{ cm}^{-1}$  (figura 25).

Existe también una bibliografía considerable sobre el tema, dentro de ella, los trabajos seleccionados de varios grupos serán considerados como ejemplos [43, 46-57].



Desplazamiento Raman (cm<sup>-1</sup>)



Desplazamiento Raman (cm<sup>-1</sup>)

Figura 25. Espectro Raman promedio de un tejido mamario sano (arriba) con nódulos linfáticos y de un tumor (abajo). Adaptada de [45].

### 6.5. Dispersión Raman exaltada por la superficie

La dispersión Raman exaltada por la superficie (SERS, acrónimo de *surface enhanced Raman scattering*) hace referencia a la observación que ciertas moléculas adsorbidas en superficies metálicas estructuradas presentan un espectro Raman mucho más intenso que el espectro normal, hasta por un factor  $10^5$ - $10^6$  [58, 59]. Este efecto ha sido descubierto por Fleischmann *et al.* en 1974 [60] a partir de piridina adsorbida sobre un electrodo de plata estructurada después de varios ciclos de oxidorreducción. Fue demostrado que esta señal intensa no tenía su origen en un aumento de la superficie [61, 62], es decir un aumento del número de moléculas participando a la señal Raman, pero sí en un aumento de la eficiencia Raman [63, 64].

Posteriormente, la señal SERS de la piridina fue medida en soluciones coloidales de plata y oro. Estos experimentos mostraron que el SERS no es tanto un efecto de superficie sino un efecto de nanoestructura y han mostrado por primera vez el papel importante de la resonancia del plasmon de superficie en el SERS. El campo electromagnético de la luz en la superficie puede ser aumentado enormemente con la excitación del plasmon de superficie, lo que conduce a un aumento importante de la señal SERS [58]. Un espectro de SERS se presenta en la figura 26, comparado con el espectro Raman normal.

El mecanismo implicado en el SERS no está todavía bien esclarecido. Los experimentos realizados muestran que diferentes efectos pueden contribuir al aumento de la señal Raman y dos mecanismos han sido propuestos. Como la intensidad Raman es proporcional al cuadrado del momento dipolar inducido  $\vec{\mu}_i$ , se puede deducir que cualquier aumento puede originarse en un aumento de la polarizabilidad  $\alpha$  o del campo eléctrico  $\vec{E}$  ( $\vec{\mu}_i = \alpha \vec{E}$ ).



El aumento asociado a  $\alpha$  se llama efecto químico y el asociado a  $\bar{E}$  se llama efecto electromagnético [65].

El aumento total de intensidad ha sido estimado a  $10^6$  en los primeros trabajos. Sin embargo, algunos autores han reportado factores más elevados. Kneipp *et al.* [59] reportaron que, en el caso de *clusters* coloidales formados con la agregación de partículas coloidales, la excitación no se distribuye de manera uniforme en el cluster, sino que tiende a localizarse en áreas "calientes", las cuales cuando son excitadas en el infrarrojo cercano, muestran un aumento grande del campo electromagnético del orden de  $10^{12}$ . Si se suma el aumento debido al efecto químico, del orden de  $10^2$ , el aumento total puede ser  $10^{14}$ . Esto ha permitido la detección de moléculas únicas [66, 67].

Esta técnica evita largos tiempos de acumulación frecuentes en espectroscopía Raman normal. Además, el espectro Raman normal puede ser escondido por la fluorescencia pero el SERS produce una señal más intensa e impide la fluorescencia como se ve en la figura 26.

El SERS no solamente es interesante como método de detección sensible y caracterización estructural de biomoléculas, pero puede ser también aplicado para el estudio de procesos. Breuzard *et al.* [68] han estudiado por SERS, la adsorción de una droga antitumoral, la mitoxantrona, sobre la membrana plasmática de células, dejando las células en una solución coloidal de plata. La mitoxantrona es una molécula anfipática que se coloca en la superficie de la membrana. La afinidad del coloide para la bicapa fosfolipídica fue suficiente para aumentar la señal SERS de la mitoxantrona.

Esta técnica se ha vuelto un método para el estudio de células vivas o de bacterias [69]. La resonancia del plasmón de superficie de nanopartículas de metales como el

oro y la plata es la fuente del aumento de la señal SERS aunque este proceso no esté totalmente entendido.

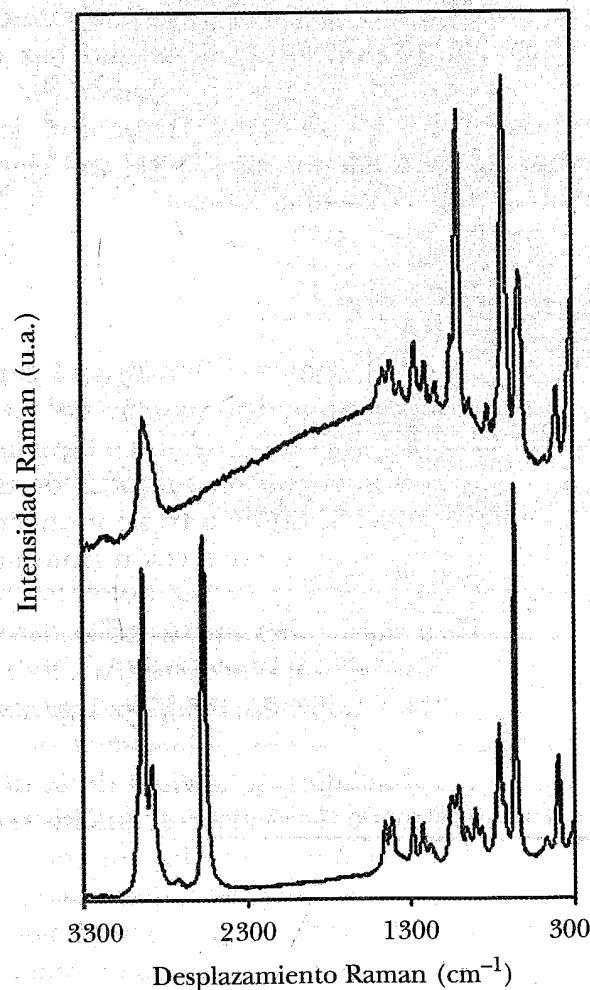


Figura 26. Espectro Raman del 2-mercaptoetanol líquido (b) y espectro SERS de una película de 2-mercaptoetanol sobre plata estructurada (a). Los espectros están a la misma escala. Una diferencia en las reglas de selección es visible: algunas bandas aparecen solamente en el espectro normal o solamente en el espectro SERS.

## 6.6. Pinzas ópticas

Últimamente se han publicado muchos trabajos sobre el uso de pinzas ópticas [70-72] en experimentos de dispersión Raman, aprovechando el mismo haz del láser incidente para atrapar células en solución. Las referencias anteriores familiarizarán al lector con las pinzas ópticas mientras las referencias [73-81] son ejemplos de utilización en espectroscopía Raman.

## 6.7. El equipo

Un equipo de espectrometría Raman está constituido de una fuente monocromática (láser), de un sistema porta muestras (que pueden ser sólidas o líquidas) ahora frecuentemente con microscopio confocal, de un dispositivo de análisis espectral doble o triple monocromador (figura 27) y de un sistema de detección (fotomultiplicador o cámara CCD).

Las fuentes láser más comúnmente utilizadas son láseres de gas de iones o de átomo neutros ( $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Kr}^+$ , He-Ne). Últimamente, se han utilizado también algunos láseres de estado sólido.

Existen tres posibilidades de análisis de la dispersión Raman: la transformada de Fourier, el análisis secuencial (con un doble o triple monocromador con una detección por fotomultiplicador) y el análisis multicanal (con detección por CCD). El dispositivo experimental más frecuente consiste en detectar la luz dispersada en una dirección perpendicular al haz incidente. Otro muy utilizado es la detección en retro-dispersión, es decir en la misma dirección que la luz incidente. Es esta última que se usa con los dispositivos micro-Raman que utilizan un microscopio confocal.

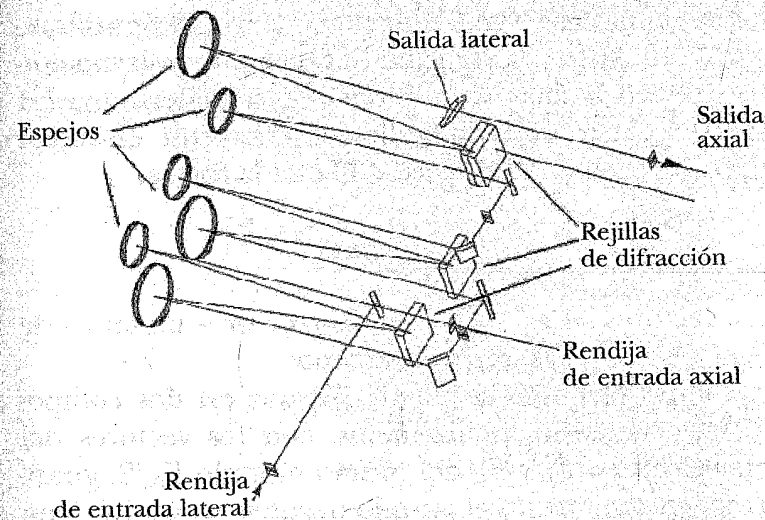


Figura 27. Esquema de un triple monocromador en configuración sustractiva.

El acoplamiento de un microscopio óptico con un espectrómetro Raman permite analizar con buena resolución espacial, muestras pequeñas lo que es importante para muestras biológicas. La ventaja del uso de un microscopio confocal es poder analizar la dispersión Raman de un punto de la muestra (donde focaliza el haz) excluyendo la dispersión que proviene de otros puntos de la muestra, en particular de puntos situados antes o después del punto de focalización [81].

## 7. DICROÍSMO CIRCULAR Y DISPERSIÓN ÓPTICA ROTATORIA

Ciertas moléculas pueden presentar un carbono asimétrico o un entorno asimétrico; lo que ocurre con las macromoléculas biológicas. En este caso estas soluciones

se llaman quirales y van a tener una actividad óptica que se va a traducir por la rotación del plano de polarización de la luz con la cual se iluminan. Se considera una luz incidente plana polarizada linealmente con el vector campo eléctrico en la dirección Ox de la forma:

$$\vec{E} = \vec{u}_x E_0 \cos \omega t.$$

Los vectores  $\vec{u}_x$ ,  $\vec{u}_y$  y  $\vec{u}_z$  son los vectores unitarios de los ejes Ox, Oy y Oz, respectivamente.

El campo eléctrico se puede separar en dos componentes polarizados circularmente con los vectores del campo eléctrico  $\vec{E}_R$  y  $\vec{E}_L$  del mismo módulo  $E_0/2$ , girando respectivamente en el sentido negativo y positivo (con respecto al sentido trigonométrico), a la misma frecuencia y, por tanto, a la misma velocidad angular:

$$\vec{E}_R = \frac{E_0}{2} (\vec{u}_x \cos \omega t - \vec{u}_y \sin \omega t)$$

$$\vec{E}_L = \frac{E_0}{2} (\vec{u}_x \cos \omega t + \vec{u}_y \sin \omega t).$$

Si se suman estos dos componentes, encontramos la luz polarizada plana anterior. Esta separación es necesaria ya que cada componente va a reaccionar de manera diferente al pasar dentro del medio que se estudia.

### 7.1. Poder rotatorio

Las soluciones quirales tienen índices  $n_R$  y  $n_L$  diferentes para las dos componentes polarizadas circularmente  $\vec{E}_R$  y  $\vec{E}_L$ . Esto se va a traducir a la salida de la solución por

desfases diferentes para las dos componentes. Si se supone que el trayecto óptico es  $d$ , la amplitud de las componentes se escribe:

$$\|\vec{E}_R\| = \frac{E_0}{2} \cos \left( \omega t - \frac{2\pi d n_R}{\lambda} \right)$$

y

$$\|\vec{E}_L\| = \frac{E_0}{2} \cos \left( \omega t - \frac{2\pi d n_L}{\lambda} \right)$$

con  $\lambda$ , la longitud de onda de la luz en el vacío.

El desfase es

$$\varphi_R - \varphi_L = \Delta\varphi = 2\pi \frac{n_L - n_R}{\lambda} d.$$

La luz transmitida sigue polarizada y plana, pero su plano de polarización ha girado un ángulo  $\alpha = (\Delta\varphi/2)$  con respecto al de la luz incidente (figura 28). Este ángulo en grados, se llama poder rotatorio:

$$\alpha = 1800 \frac{d(n_L - n_R)}{\lambda},$$

con el trayecto óptico en decímetros y la longitud de onda en centímetros. Se llama dextrogiro, a un compuesto químico que mueve el plano de polarización hacia la derecha ( $\alpha > 0$ ) y levógiro, al que lo mueve hacia la izquierda ( $\alpha < 0$ ).

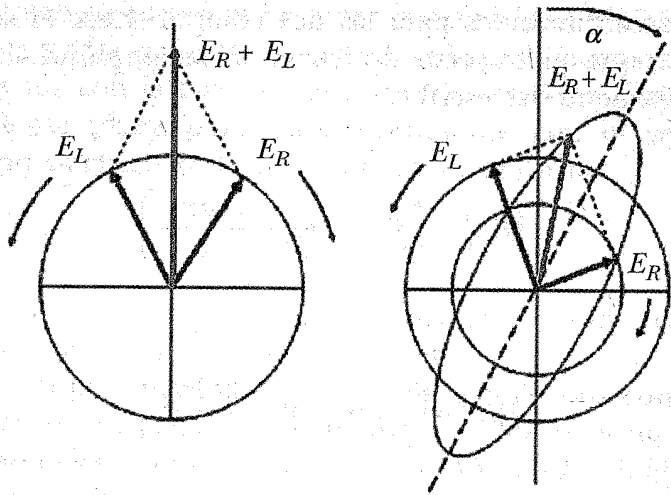


Figura 28. Onda incidente: polarización lineal, que puede ser vista como la superposición de una circular derecha y una circular izquierda. Onda transmitida: polarización elíptica debido a la diferencia en absorción que presenta la molécula para cada tipo de polarización circular.

### 7.2. Dicroísmo circular y dispersión óptica rotatoria\*

En su región de absorción, las moléculas quirales tienen coeficientes de extinción molar  $\epsilon_R$  y  $\epsilon_L$  ligeramente diferentes. Según la ley de Beer-Lambert, la intensidad de la luz polarizada circularmente derecha es diferente de la intensidad de la luz polarizada circularmente izquierda. Como la intensidad es proporcional al cuadrado del módulo del vector campo eléctrico  $\vec{E}$ , los dos componentes de la luz transmitida son  $\|\vec{E}_L\| \neq \|\vec{E}_R\|$ . Resulta una luz polarizada elípticamente: ya no oscila en un plano como en el caso de una luz polarizada plana sino que la extremidad de  $\vec{E}$  describe una hélice de sección elíptica.

El dicroísmo circular (DC) es la medición de la elipticidad  $\theta$  de esta elipse, en función de la longitud de onda

\* ORD por sus siglas en inglés (optical rotatory dispersion).

y será representado por

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R.$$

Es una técnica que permite analizar el contenido en estructuras secundarias de proteínas o de ácidos nucleicos.

En la figura 29 se muestran las diferencias que existen entre las diferentes estructuras secundarias de proteínas. Esta técnica es no destructiva y permite estudiar los cambios de conformación de proteínas en diferentes entornos (pH, agentes desnaturizantes, temperatura). Para determinar la proporción de cada tipo de estructura, es necesario hacer una desconvolución en componentes elementales del espectro de DC.

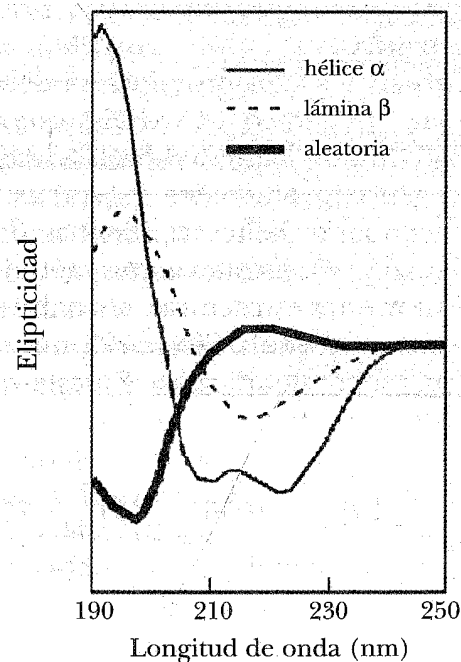


Figura 29. Espectro de dicroísmo circular de las estructuras secundarias de proteínas.

Los espectros dicróicos corresponden a las zonas de absorción y tienen la forma de curvas gaussianas, como las bandas de absorción. Se describen por la ecuación

$$[\theta]_{\lambda} = [\theta]_{\lambda_i} e^{-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta_i}\right)^2}$$

donde  $[\theta]_{\lambda_i}$  es la amplitud máxima de la banda centrada en  $\lambda_i$  y  $\Delta_i$  el ancho a la altura

$$\frac{[\theta]_{\lambda_i}}{e}$$

de la misma banda.

La señal observada con proteínas se debe a la absorción del enlace peptídico (-CO-NH-) que absorbe por debajo de 250 nm, de manera diferente según los puentes de hidrógeno involucrados y por tanto, según la estructura secundaria: hélice  $\alpha$ , láminas  $\beta$  o conformación desordenada ( $d$ ). Existen varios métodos de análisis para caracterizar estas estructuras; el análisis más sencillo consiste en observar que a 208 y 222 nm, solamente la hélice  $\alpha$  da una señal significativa. En este caso, se puede evaluar el porcentaje  $H_{\alpha}$ :

$$H_{\alpha} = -\frac{[\theta]_{208} + 4000}{29000} = -\frac{[\theta]_{222} + 1780}{28250}$$

Otro método consiste en utilizar espectros característicos de las principales estructuras de un banco de datos de proteínas de las cuales se conocen la estructura tridimensional

por difracción de Rayos X (ver parte 8 de este capítulo). Se escribe que la señal obtenida con una proteína desconocida es la suma de tres espectros característicos de cada una de las tres estructuras ponderada por su peso estadístico. Se tiene que escribir por lo menos tres ecuaciones del tipo

$$[\theta]_{\lambda_i} = f_{\lambda_i}^{\alpha} [\theta]_{\lambda_i}^{\alpha} + f_{\lambda_i}^{\beta} [\theta]_{\lambda_i}^{\beta} + f_{\lambda_i}^d [\theta]_{\lambda_i}^d$$

el modelo se valida averiguando que los coeficientes satisfacen

$$0 < f_{\lambda_i}^{\alpha}, f_{\lambda_i}^{\beta}, f_{\lambda_i}^d < 1$$

y que la suma es igual a uno.

En la práctica, se realizan varios espectros a diferentes longitudes de onda para obtener varios sistemas de ecuaciones que permiten afinar los resultados.

Mientras los espectros de DC se observan para las longitudes de onda en donde la sustancia absorba, los espectros ORD se extienden del ultravioleta al visible. La dispersión rotatoria óptica,  $\alpha = f(\lambda)$  se mide con un espectropolarímetro, es proporcional al espesor y a la concentración de la muestra.

En la figura 30 se comparan los espectros de absorción, de dicroísmo circular y de dispersión óptica rotatoria. Estos espectros muestran: i) el efecto Cotton, que es el cambio de signo de la rotación (punto donde el espectro ORD corta el eje horizontal), ii) la cantidad usada para describir el espectro ORD no es la rotación específica  $[\alpha]$  (rotación por unidad de longitud y de concentración) sino la rotación molar  $[m']$  dada por:

$$[m'] = [\alpha] \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M}{100}$$



donde  $n$  es el índice de refracción del medio y  $M$  la masa molar del soluto. El término  $3/(n^2 + 2)$  es un factor de corrección que toma en cuenta la polarizabilidad del medio y su efecto sobre el soluto [83, 84].

La expresión anterior relaciona la rotación molar con la rotación óptica específica, pero se necesita también la relación entre la rotación molar y la longitud de onda:

$$[m'] = 2.303 \frac{9000}{\pi^2} \int_0^{\infty} \Delta\epsilon_{\lambda'} \frac{\lambda'^2}{\lambda'^2 - \lambda'^2} d\lambda'$$

Esta ecuación se obtiene a partir de la respuesta de un oscilador armónico sin amortiguamiento excitado por una fuerza periódica (ecuación de Drude). En realidad como experimentalmente sólo se observan valores finitos, hay que añadir un término de amortiguamiento. Muestra que DC y ORD se relacionan por una relación de tipo Kramer-Kronig.

La DC permite obtener una caracterización de la molécula que refleja los rasgos asimétricos de la estructura molecular; proporciona información sobre el arreglo

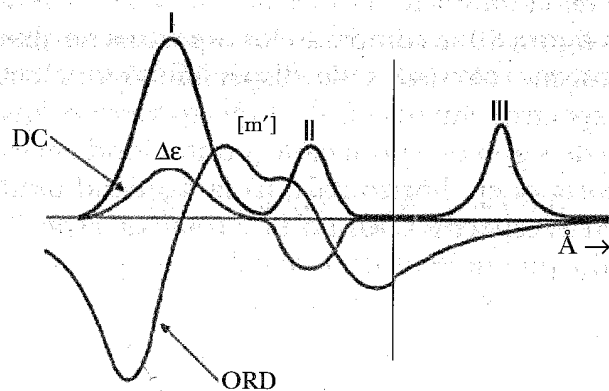


Figura 30. Comparación de los espectros de absorción, DC y ORD.

local de las unidades monoméricas. Las modificaciones de conformación global se reflejarán muy poco en los espectros de DC. Es una técnica interesante para caracterizar rápidamente la estructura molecular con una pequeña cantidad de material (1 - 2 ml de una solución a 0.05 - 0.5 mg/ml). Los espectros de DC permiten distinguir las estructuras secundarias de las proteínas [85], de péptidos [86-89] y las diferentes formas estructurales de los ácidos nucleicos [90]. Otros ejemplos de utilización de estas dos técnicas pueden encontrarse en [91, 92].

## 8. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X (DRX) es un método utilizado para la identificación de la naturaleza y estructura de productos cristalizados, es decir presentando un arreglo periódico, ordenado y en planes reticulares tridimensionales de los átomos que los constituyen.

Después del descubrimiento de los RX por el físico alemán W.C. Röntgen en 1895 (premio Nobel de física en 1901), las primeras aplicaciones han sido focalizadas al estudio de cristales. En 1912, M. von Laüe (premio Nobel de física en 1914) determina gracias a una red cristalina, la longitud de onda de RX. Fue entonces posible hacer lo inverso, es decir determinar las distancias entre átomos con estos rayos.

El estudio de cristales por DRX, es una de las técnicas principales de determinación experimental de la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas. Esto es posible porque su longitud de onda es del orden de magnitud de la distancia interatómica (0.1 - 0.15 nm). El problema mayor es que la difracción por una sola molécula

es muy débil; aumentar el tiempo de exposición sería demasiado largo y podría dañar las muestras antes de dar una buena imagen. Por lo tanto, para obtener una difusión coherente, se necesita trabajar sobre conjuntos de unas  $10^{15}$  moléculas idénticas en arreglos periódicos, es decir realizar cristales. En este caso la luz dispersada es más fácil de detectar y se reducen los efectos de degradación de la muestra por la exposición a los RX. Para obtener buenos cristales, de tamaño adecuado, se necesitan cumplir las tres etapas de la cristalogenénesis de una molécula: solubilización, nucleación y crecimiento cristalino.

### 8.1. Principio

Una vez obtenido el cristal, éste se coloca en el haz de RX. Cuando éste incide sobre una muestra, tres procesos pueden ocurrir. La probabilidad de que cada uno tenga lugar depende de la longitud de onda del haz incidente y del tipo de átomos de la muestra: i) la radiación puede atravesar la muestra sin cambio de energía, la medición de la atenuación es la absorción de RX; ii) los fotones pueden ser absorbidos por los átomos de la muestra y se pueden estudiar los electrones emitidos y la fluorescencia; iii) una parte de la radiación puede ser dispersada por la muestra, con o sin cambio de energía (dispersión elástica o inelástica).

La DRX se basa en la dispersión elástica. Cuando un haz incide sobre una muestra que presenta un ordenamiento periódico de sus átomos, lo que se obtiene es que en ciertas direcciones privilegiadas del espacio, las ondas difractadas se van a sumar para formar interferencias constructivas (intensidad máxima), mientras que en las otras se producirán interferencias destructivas (intensi-

dad cero). El impacto de cada haz difractado sobre una placa fotográfica, produce un punto y el conjunto forma el diagrama de difracción. Es a partir de estos puntos que la estructura del cristal y la de la molécula puede ser deducida.

La condición general de difracción, está dada por las ecuaciones de Laüe:

$$\vec{s} \cdot \vec{a} = h$$

$$\vec{s} \cdot \vec{b} = k$$

$$\vec{s} \cdot \vec{c} = l$$

donde  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  y  $\vec{c}$  son los vectores de base de la red cristalina directa  $\vec{s}$ , el vector de difusión definido por  $\vec{s} = \vec{q} - \vec{q}_0$ , donde  $\vec{q}_0$  es el vector de onda incidente,  $\vec{q}$  el vector de onda difractado y  $h$ ,  $k$  y  $l$  números enteros.

Las ecuaciones de Laüe indican que el vector de difusión es un vector de la red cristalina recíproca:

$$\vec{s} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*,$$

con los vectores de la red recíproca definidos por:

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{V}, \quad \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{V}, \quad \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{V},$$

$V = \vec{a} \cdot \vec{b} \times \vec{c}$  es el volumen de la celda elemental de la red directa.

La ley de Bragg expresa de manera diferente las condiciones de Laüe pero permite introducir la noción de resolución. Se pueden definir familias de planos reticulares de índices enteros  $h$ ,  $k$ ,  $l$ . Estos índices  $hkl$  se llaman

índices de Miller y se determinan como sigue: se considera un sistema de ejes que relacionan los átomos idénticos de un cristal y tres átomos que cortan estos ejes en posiciones bien definidas (2, 1 y 4 en nuestro ejemplo). Se toma el inverso de estos números (1/2, 1 y 1/4) y se buscan los enteros más pequeños que están en la misma relación, por ejemplo (2, 4, 1).

El plan mostrado en la figura 31 es entonces nombrado  $h = 2, k = 4, l = 1$  o  $(hkl) = (241)$ .

La DRX puede ser considerada como una reflexión sobre estos planos (figura 32), según la ley de Snell-Descartes para valores particulares de  $\theta$ , siendo  $2\theta$  el ángulo entre los vectores de difusión difractado e incidente. Estos valores satisfacen la relación:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda,$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda del haz incidente, y  $d_{hkl}$  la distancia inter-reticular.

Se puede mostrar que el módulo del vector de difusión  $\vec{s}$  es  $2 \sin \theta / \lambda = 1 / d_{hkl}$  y que la resolución de la reflexión  $hkl$  está definida por  $d_{hkl} = \lambda / 2 \sin \theta$ . Ésta disminuye cuando

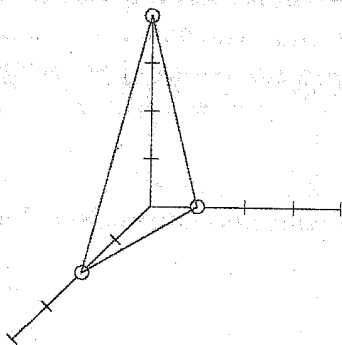


Figura 31. Plan reticular (241).

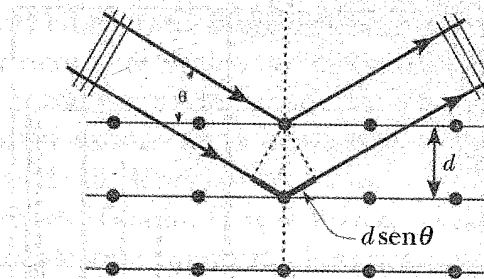


Figura 32. Principio de la ley de Bragg.

$\theta$  aumenta hasta alcanzar la resolución límite  $d$ . En este caso solamente se podrán distinguir detalles separados por una distancia superior o igual a  $\lambda/2$ .

La información contenida en cada haz difractado se puede caracterizar por la amplitud y la fase de la onda difractada. La amplitud de la onda dispersada por cada punto de una muestra es proporcional a la densidad electrónica en este punto, mientras la fase depende de la posición del punto en la muestra.

El diagrama de difracción (figura 33) permite identificar las diferentes fases presentes en la muestra, determinar la simetría de la celda unitaria y los valores de los parámetros reticulares, obtener el grupo espacial del cristal estudiado, determinar las posiciones atómicas, los factores de ocupación y, en caso de muestras multifásicas, determinar la proporción de cada fase.

El diagrama de difracción es la transformada de Fourier (de acuerdo con la convención de los cristalógrafos) de la densidad electrónica del objeto; lo que implica que el diagrama representa la transformada de Fourier de la densidad electrónica en los nodos de la red recíproca y, por tanto, el factor de estructura se escribe:

$$F_{hkl} = \iiint \rho(x, y, z) e^{2i\pi(hx+ky+lz)} dx dy dz.$$

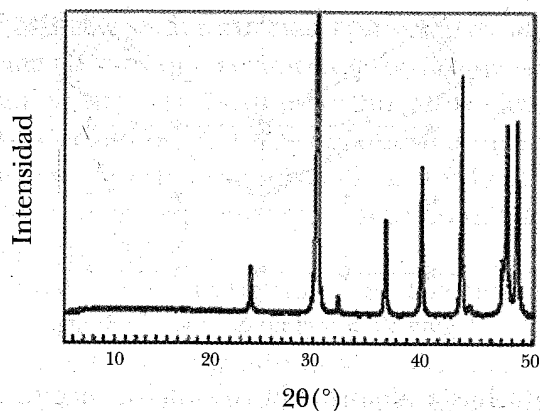


Figura 33. Difractograma de la calcita.

La intensidad difractada es proporcional al cuadrado del factor de estructura

$$I \propto |F_{hkl}|^2.$$

La información está repartida de manera discontinua a nivel de cada nodo y es suficiente para reconstruir el objeto inicial si se conoce la amplitud y la fase de la onda dispersada en cada punto. Pero como no existen lentes para los RX, la información de fase no se tiene y el trabajo del cristalógrafo consiste en encontrar esta información faltante para calcular la transformada de Fourier inversa que dará una imagen de la densidad electrónica.

El problema de las fases puede ser resuelto experimentalmente por el método de reemplazo isomorfo múltiple (MIR, por *multiple isomorphous replacement*), la utilización de la difusión anómala (AS, por *anomalous scattering*) o el método MAD (*multiwavelength anomalous diffraction*). Si un modelo cercano de la estructura desconocida existe, el reemplazo molecular puede ser utilizado. Consiste

en colocar en el cristal desconocido una molécula modelo cuya estructura es vecina de la desconocida y usar este modelo como punto de partida para la construcción.

El primer esbozo de la estructura, construida a partir del mapa de la densidad electrónica contiene errores y tiene que ser afinado. Esto se realiza mediante un proceso de cálculo que optimiza el acuerdo entre las intensidades medidas de los puntos y los valores que se pueden recalcular a partir del modelo. Este proceso que se tiene que repetir varias veces usa mucho tiempo de cálculo.

El estudio de una nueva proteína puede necesitar hasta un año de trabajo, aunque el rápido aumento de la potencia de cálculo de las computadoras y la existencia de fuentes que utilizan la radiación sincrotrón son más potentes y reducen el tiempo de exposición que tiende a reducir este tiempo.

Los diagramas de Ramachandran [93] proporcionan la repartición de los ángulos diedros  $\Phi$  y  $\Psi$ . Los pares ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) son característicos de una estructura secundaria del esqueleto  $C_\alpha$  de las proteínas. La repartición de estos ángulos da un criterio más de calidad del modelo afinado. Los progresos en la síntesis, la purificación y la cristalización del ARN han permitido la determinación de la estructura de estas moléculas por RX [94].

Muchos trabajos existen en DRX para la determinación de estructuras de moléculas biológicas, dentro de ellos se mencionarán los dos siguientes [95, 96] y la base de datos del Protein Data Bank [97]. Los RX son también usados para estudios en solución pero no permiten alcanzar la resolución obtenida en el caso de la cristalografía [98].

## 8.2. Dispersión de RX a ángulos pequeños

La ley de Bragg nos permite predecir que con instrumentos que pueden medir la milésima de grados, se pueden alcanzar estructuras del tamaño hasta de un micrómetro. A escala atómica las estructuras se caracterizan por un alto grado de orden mientras que a escala más grande este orden puede no ser tan uniforme. Esto se traduce en DRX con picos de difracción finos y en SAXS con bandas más anchas. Fue A. Guinier [99], quien en los años cincuenta realizó las primeras mediciones de SAXS en metales.

En RX, la intensidad difractada es la transformada de Fourier de la función de correlación de la densidad electrónica, que corresponde a la probabilidad de encontrar un difusor a la posición  $r$  en la muestra cuando otro está en la posición  $0$ . A ángulos pequeños, se puede investigar sistemas con tamaños característicos del orden de distancias cristalográficas (décimas de nanómetros) hasta tamaños coloidales (algunos micrómetros).

El número de fotones dispersados por una muestra es proporcional a su volumen y a su contraste electrónico. En el caso de un sistema binario (por ejemplo, difusores de densidad  $\rho_1$  en un solvente de densidad  $\rho_2$ ), el contraste electrónico es  $\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2$ . Mayor el contraste entre partículas y solvente, mayor la señal dispersada.

La intensidad experimental es habitualmente ajustable para determinar la densidad  $\rho(r)$ , el tamaño, la forma y la estructura interna de un difusor elemental, así como la estructura y las interacciones entre dispersores.

Un perfil típico de SAXS es representado en la figura 34, con la intensidad graficada en función del vector de difusión  $s$  en un rango  $s_{\min} - s_{\max}$  definido por el aparato; este rango es habitualmente dividido en tres regiones:

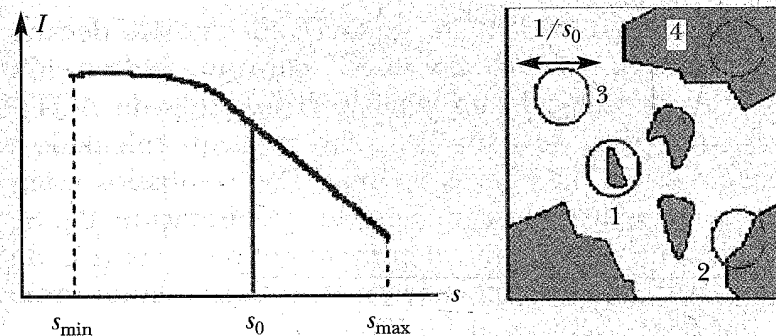


Figura 34. Izquierda: Ejemplo de perfil de intensidad dispersada medido entre  $s_{\min}$  y  $s_{\max}$ . Derecha: Muestra binaria y tamaño de la ventana correspondiendo a un vector de difusión  $s_0$  dado. El contraste es igual a cero en los casos 3 y 4 y diferente de cero en los casos 1 y 2.

- Región de  $s$  grande: la ventana es muy pequeña, hay contraste solamente en una interfase entre dos medios. Esta región es llamada región de Porod y proporciona información sobre la interfase presente en la muestra.
- Zona intermedia: la ventana es del orden de la "celda elemental" del sistema. El factor de forma  $P(s)$  puede ser determinado (tamaño, forma y estructura interna de un partícula).
- Región de  $s$  pequeña: cuando la ventana es muy grande, se puede obtener el orden estructural, es decir el factor de estructura  $F(s)$ , que permite calcular las interacciones en el sistema.

Los factores de forma se pueden calcular de manera relativamente fácil para esferas, cilindros, discos, varillas, micelas, láminas o polímeros gaussianos que son las formas habituales encontradas en materia condensada suave. Por ejemplo, SAXS ha sido utilizada para determinar el contenido de agua en micelas inversas de AOT con decano



[100]. Una gráfica de SAXS de una solución AOT-decano es presentada en la figura 35 para una hidratación  $W_0 = 9$  (9 molécula de agua por molécula de AOT). El radio interno de la micela es directamente calculado a partir del máximo de esta curva. Los resultados están dados en la Fig. 36 en función de la hidratación  $W_0$ . Se obtiene una relación lineal entre el radio del corazón de agua y  $W_0$ . Una extrapolación a  $W_0 = 0$ , nos da un radio de micela de AOT igual a 0.578 nm.

Con esta técnica, Lemaire *et al.* [101] han determinado el parámetro de orden nemático de geles de una arcilla, la laponita. En la referencia [102], se encontraran aplicaciones en biomoléculas.

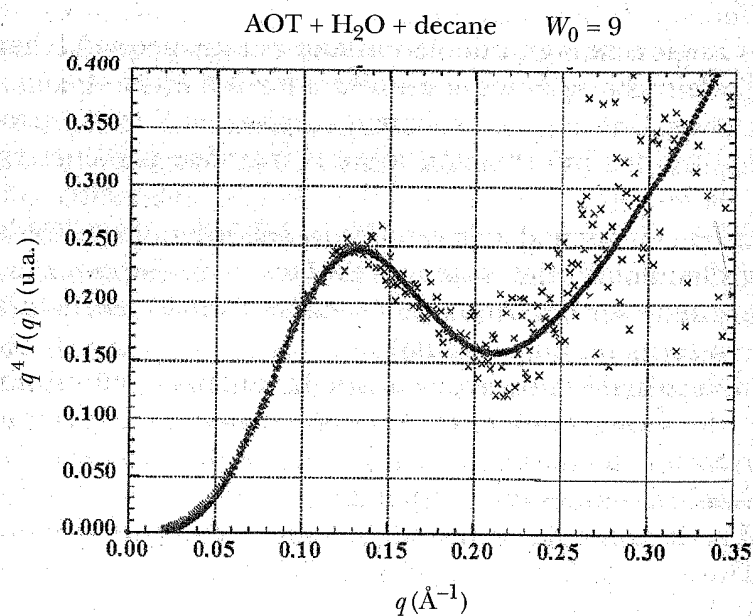


Figura 35. Gráfica de  $q^4 I(q)$  de una microemulsión de AOT-decano a  $W_0 = 9$ , en función del vector de dispersión a 25°C.

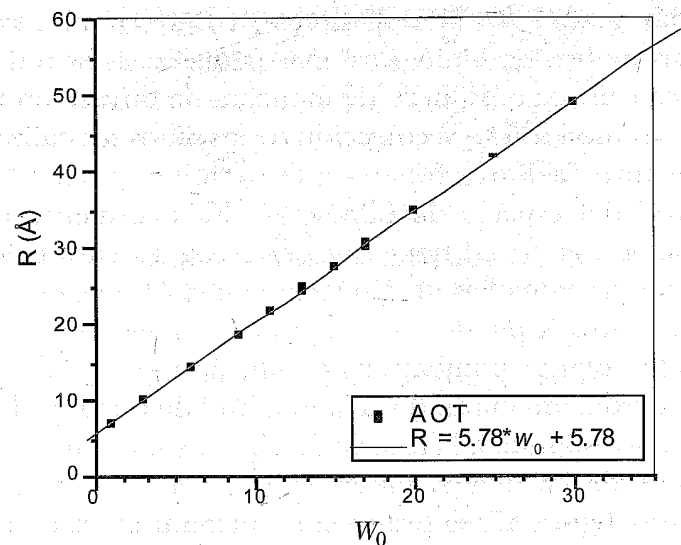


Figura 36. Gráfica del radio interno de micelas de AOT en función de la hidratación a 25°C.

### 8.3. El equipo

Los haces difractados se ven solamente cuando la condición de difracción está satisfecha es decir cuando el vector de difusión coincide con un nodo de la red recíproca. Es necesario que cada nodo de la red recíproca esté en posición de difracción, por lo tanto, se hace girar el cristal alrededor de un eje de rotación perpendicular al haz incidente. La red recíproca describe entonces el mismo movimiento que la red directa. Por lo tanto, es necesario efectuar una rotación de un cierto ángulo mínimo para coleccionar datos que cubran la mayor parte del espacio recíproco, de manera homogénea, sin dejar demasiadas zonas ciegas. Para que las estadísticas sean significativas, es necesario coleccionar más de una vez una reflexión o una de sus reflexiones simétricas.

Más grande es la red directa, como en el caso de macromoléculas biológicas, más pequeña es la red recíproca y un gran número de manchas de difracción tiene que ser medido. La recolección de los datos se realiza con detectores bidimensionales que permiten grabar "rebanadas" del espacio de difracción. El incremento de la rotación del cristal tiene que ser escogido para coleccionar suficientes manchas de difracción en cada imagen.

Los rayos X pueden ser obtenidos con generadores de ánodo rotante bombardeando un ánodo de cobre. El cobre excitado emite RX a la longitud de onda de  $1.54 \text{ \AA}$  que corresponde a la transición  $K_{\alpha}$ . Los sincrotrones son fuentes de RX más potentes.

En la figura 37, se presenta esquemáticamente un dispositivo de DRX. Según la naturaleza de lo que se quiere obtener y según la naturaleza del material, diferentes análisis son posibles. Los métodos son diferentes dependiendo si se usan RX policromáticos o monocromáticos.

El método de Laue utiliza un cristal pequeño sobre el cual incide el haz policromático de RX. El cristal es inmóvil y la interacción de los RX con los planos reticulares hace que ciertos rayos incidentes satisfacen la ley de Bragg. Los rayos difractados forman manchas que permiten meter en evidencia la simetría cristalina.

El método de Debye-Scherrer (o del polvo) se utiliza cuando el material se puede reducir en un polvo fino (con granos del orden de  $0.01 \text{ mm}$ ) lo que es muy frecuente. En este caso se usa un haz monocromático que incide sobre el polvo microcristalino colocado sobre una lámina o en un capilar. La hipótesis básica es que dentro de todos los microcristales presentes, se encontrarán suficientemente que tengan caras cristalinas tales que las difracciones satisfacen la ley de Bragg.

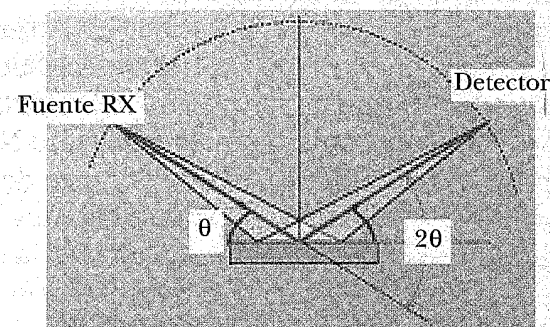


Figura 37. Esquema del dispositivo experimental.

El método del cristal giratorio necesita un monocristal de buena calidad que se coloca en el centro de la cámara. Da vuelta alrededor de su eje y recibe el haz incidente de RX monocromático. Cada haz difractado se traduce por la aparición de una mancha sobre la placa fotográfica.

## 9. DISPERSIÓN DE NEUTRONES

Es una técnica relativamente nueva para la determinación de las estructuras moleculares. Se puede realizar sobre sólidos mono o policristalinos. Tiene varias analogías con la difracción de RX pero puede dar resultados complementarios interesantes. Una de las limitaciones es la necesidad de poseer una pila atómica para producir un flujo suficiente de neutrones.

El neutrón es una partícula elemental que fue descubierta por J. Chadwick en 1932, de masa  $m = 1.67510^{-27} \text{ kg}$ , espín  $s = 1/2$  y de carga eléctrica cero. Asociado a este espín, el neutrón tiene un momento magnético pequeño ( $-1.913 \mu_{\text{BN}}$ , con el magnetón de Bohr nuclear  $\mu_{\text{BN}} =$

$5.05038 \cdot 10^{-27} \text{ J T}^{-1}$ ) pero que permite al neutrón experimentar los campos magnéticos en la materia. Fue utilizado por primera vez en experimentos de difusión por C. Shull en 1946 [103], quien obtuvo el premio Nobel en 1994 por este descubrimiento. Esta técnica se desarrolló posteriormente y se volvió una herramienta muy potente para estudios en todos los aspectos de la materia condensada.

El hecho de no tener carga eléctrica alguna, hace que el neutrón pueda penetrar la materia sin ser parado por una barrera coulombiana. Al contrario de los RX, sensibles a los electrones, que ven la superficie de la materia, los neutrones pueden sondear el interior de las muestras. En particular, se puede detectar el átomo de hidrógeno que no aparece en RX debido a su pequeño número de electrones.

Los neutrones salidos del corazón del reactor nuclear, son termalizados, pasando a través de un moderador a la temperatura  $T$ . Por lo tanto, su distribución de velocidades sigue una ley de Maxwell-Boltzmann alrededor de un valor promedio tal como:

$$E = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{3}{2} k_B T.$$

Los neutrones térmicos, correspondiendo a una temperatura de 300 K, tienen una energía de 25 meV, una velocidad promedio de  $2200 \text{ m s}^{-1}$  y una longitud de onda de 0.18 nm, es decir del orden de magnitud de las distancias interatómicas.

El neutrón es la única onda-partícula que permite tener acceso al mismo tiempo a la estructura, por fenómenos de interferencia y a la dinámica por espectroscopía.

Los lectores interesados podrán consultar las referencias [104] y [106] por lo que concierne toda la parte teórica e instrumental de la dispersión de neutrones.

### 9.1. Interacción neutrón - materia

Existen dos tipos de interacciones entre el neutrón y los átomos: la interacción nuclear (interacción fuerte) y la interacción magnética.

Las fuerzas nucleares que existen entre el neutrón y el núcleo, actúan sobre distancias muy cortas, del orden del tamaño del núcleo,  $10^{-5} \text{ nm}$ .

Los neutrones utilizados en experimentos de dispersión, tienen una longitud de onda que va de  $10^{-2} \text{ nm}$  a 0.5 nm, por lo tanto, se puede representar el potencial de interacción con una función de Dirac, llamada pseudo potencial de Fermi:

$$V_i(\vec{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i),$$

donde  $b_i$  es la longitud de difusión de Fermi, característica de cada núcleo y  $m$  la masa del neutrón. Esta longitud representa la "intensidad" de la interacción. En la figura 38, el fenómeno de difusión está esquematizado.

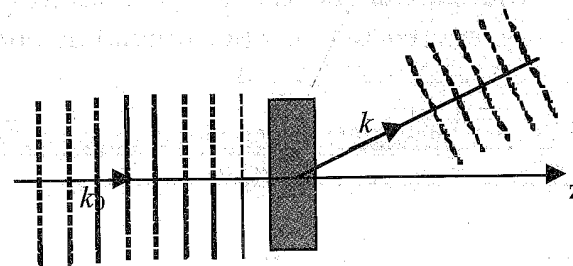


Figura 38. Esquema de la dispersión.

Después de la interacción del haz de neutrones con la muestra, ésta se comporta como una fuente y emite una onda dispersada:

$$\Psi_{dis} = -f(\vec{k}_0, \vec{k}) \frac{e^{i(kr - \omega t)}}{r},$$

donde la amplitud de difusión  $f(\vec{k}_0, \vec{k})$  (tiene la dimensión de una longitud), caracteriza la intensidad de la interacción neutrón-materia. El vector que representa la diferencia entre los dos vectores de onda es llamado vector de difusión:

$$\vec{Q} = \vec{k} - \vec{k}_0.$$

Con el potencial anterior, tenemos:

$$f(\vec{k}_0, \vec{k}) = \frac{m}{2\pi\hbar^2} \langle \vec{k} | V_i | \vec{k}_0 \rangle = b_i.$$

Lo que se mide en un experimento de dispersión es la fracción de neutrones de energía incidente  $E_0$ , dispersados en un ángulo sólido  $d\Omega$ , con una energía comprendida entre  $E$  y  $E + dE$ . Esta cantidad se llama la sección eficaz diferencial parcial que se expresa en barns ( $1 \text{ barn} = 10^{-28} \text{ m}^2$ ) por estereorradián y por unidad de energía:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{1}{\phi_0} \frac{\text{núm. de neutrones dispersados por seg. en } d\Omega \text{ y } dE}{d\Omega dE},$$

donde  $\phi_0$  es el flujo de neutrones, es decir el número de neutrones por unidad de tiempo y unidad de superficie.

En el caso en que no se analizará la energía de los neutrones dispersados, pero que se contarán todos los neutrones dispersados en  $d\Omega$ , se mide la sección eficaz diferencial que se expresa en barns por estereorradián:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \int \frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} dE = \frac{1}{\phi_0} \frac{\text{núm. de neutrones dispersados por seg. en } d\Omega}{d\Omega}.$$

Finalmente, si se integran los neutrones dispersados en todas las direcciones del espacio, se llega a la sección eficaz de dispersión total que se expresa en barns:

$$\sigma_{dis} = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \frac{n}{\phi_0}.$$

Cuando un haz de neutrones atraviesa la materia, una parte puede ser absorbida por los núcleos; éstos van a estar excitados y pueden emitir un protón, una partícula  $\alpha$ , un fotón  $\gamma$  y aun llevar a una fisión.

En el caso de una muestra delgada, la tasa de reacción  $R$  (número de reacciones por unidad de tiempo) es proporcional a la intensidad del haz  $I_0$  (número de neutrones por unidad de tiempo), a la densidad de núcleos  $n$  (número de núcleos por unidad de superficie):

$$R = I_0 n \sigma_a.$$

La constante de proporcionalidad  $\sigma_a$ , tiene las dimensiones de una superficie y se expresa habitualmente en barns. Esta constante es llamada sección eficaz de absorción y caracteriza la capacidad de cada núcleo a absorber neutrones.

En el caso de una muestra más espesa, hay que tomar en cuenta en cada capa, la atenuación debida a las capas anteriores. En este caso, la intensidad del haz a la salida se escribe:

$$I = I_0 e^{-\mu l},$$

donde  $l$  es el espesor de la muestra y  $\mu$  el coeficiente de absorción lineal,  $\mu = N\sigma_a$  con  $N$ , la densidad de núcleos.

En el caso de los RX,  $\mu$  es del orden de 100 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , pero en el caso de los neutrones es del orden de 0.01 a 1  $\text{cm}^{-1}$ . La materia es mucho más transparente a los neutrones que a los RX.

Sin embargo, no hay que olvidar que en el interior de la muestra, la intensidad del haz no solamente disminuye por la absorción de los neutrones pero también por su dispersión y se tiene que usar un coeficiente de absorción lineal aparente:

$$\mu_{ap} = N(\sigma_a + \sigma),$$

donde  $\sigma$  es la sección eficaz de difusión total del núcleo y es independiente de la longitud de onda.

El fenómeno de refracción, bien conocido para la luz, existe también para los neutrones pero este efecto es muy débil ya que para los neutrones el índice es cercano a 1.

En realidad, la situación es un poco más complicada ya que la interacción neutrón-núcleo depende del espín en particular cuando el núcleo tiene un espín nuclear,  $S$ .

La longitud de difusión cambia no solamente de una especie química a otra sino también para los diferentes isótopos de la misma especie porque la interacción neutrón-núcleo depende no solamente de la naturaleza del núcleo sino también del estado de espín del sistema total.

La longitud de difusión es un número complejo; la parte imaginaria corresponde a la absorción y la parte real determina la amplitud de difusión y puede tomar valores positivos o negativos.

Cuando  $S \neq 0$ , se encuentran dos valores ( $b_+$  o  $b_-$ ) para la longitud de difusión, según que el espín total (núcleo más neutrón) tome el valor  $S + 1/2$  o  $S - 1/2$ , respectivamente.

En la práctica, aun si los neutrones son polarizados, no lo son los núcleos y los neutrones son dispersados al azar, con una longitud de difusión  $b_+$  o  $b_-$ . Para calcular el promedio, hay que tomar en cuenta el hecho que la probabilidad del espín total  $S + 1/2$  es  $(S + 1)/(2S + 1)$ , mientras que para el espín total  $S - 1/2$ , es  $S/(2S + 1)$ .

Como cada isótopo tiene su propia longitud de difusión, la longitud de difusión promedio tiene que tomar en cuenta la concentración de cada isótopo. Para una especie  $i$  dada, el promedio  $\bar{b}_i$  de las longitudes de difusión sobre los diferentes isótopos y sobre todos los estados de espín es llamada la longitud de difusión coherente  $b_i^{coh} = \bar{b}_i$ . Mientras tanto, la longitud de difusión incoherente, se define por:

$$b_i^{inc} = \sqrt{b_i^2 - \bar{b}_i^2}.$$

Estas dos longitudes tienen naturalezas muy diferentes: la difusión coherente es la que ocurriría si todos los átomos de una misma especie tuvieran la misma longitud de difusión  $\bar{b}_i$ ; en este caso, el neutrón estaría interactuando con un potencial uniforme promedio, pudiendo dar lugar a fenómenos de interferencias. Debido a que la longitud de onda de los neutrones es comparable a las



distancias interatómicas, estas interferencias proporcionan informaciones sobre la estructura local de los sistemas. La difusión incoherente, es la que se suma a la coherente para obtener la difusión del sistema real y proviene de las diferencias con el potencial promedio.

El caso más sencillo es el de un solo isótopo de espín nuclear cero. En este caso todas las longitudes de difusión son iguales y la difusión es solamente coherente.

Con un solo isótopo de espín nuclear  $S$ , tenemos:

$$b^{coh} = \frac{1}{2S+1} [(S+1)b_+ + Sb_-]$$

$$\bar{b}^2 = \frac{1}{2S+1} [(S+1)(b_+)^2 + S(b_-)^2].$$

En el caso general, hay que sumar sobre las diferentes especies atómicas presentes en la muestra. Si los neutrones o si los espines nucleares son alineados, los  $2s+2$  estados de espín del sistema neutron-núcleo no son equiprobables, por lo tanto las expresiones anteriores de los promedios no son más válidas.

Estas expresiones de  $\bar{b}$  y  $\bar{b}^2$  permiten evaluar las secciones eficaces:

$$\sigma_{coh} = 4\pi\bar{b}^2$$

$$\sigma_{inc} = 4\pi(\bar{b}^2 - \bar{b}^2)$$

y la sección eficaz total:

$$\sigma_{tot} = \sigma_{coh} + \sigma_{inc} = 4\pi\bar{b}^2$$

El protón único de espín  $1/2$ , que constituye el núcleo del átomo de hidrógeno, es un caso particular interesante. Las longitudes de difusión son  $b^+ = 1.08 \cdot 10^{-12}$  cm para el estado total triplete  $S^+ = 1/2$ ,  $n^+ = 3$  y  $b^- = -4.74 \cdot 10^{-12}$  cm para el estado total singulete  $S^- = 0$ ,  $n^- = 1$ . Los valores de las longitudes de difusión y de las secciones eficaces para el hidrógeno y algunos elementos están presentados en la tabla 8.

La diferencia muy importante entre  $\sigma_{coh}$  y  $\sigma_{inc}$  para el hidrógeno proviene esencialmente de los signos opuestos de  $b^+$  y  $b^-$ . La sección eficaz incoherente del hidrógeno es mucho mayor que la de cualquier otro elemento, lo que hace de la difusión incoherente de los neutrones una herramienta privilegiada para el estudio de los compuestos hidrogenados, por lo tanto de las moléculas biológicas. El caso del deuterio es muy diferente. Su espín nuclear es  $s = 1$ . Para el estado  $S^+ = 3/2$ ,  $n^+ = 4$ , la longitud de difusión es  $b^+ = 0.95 \cdot 10^{-12}$  cm, mientras que para el estado  $S^- = 1/2$ ,  $n^- = 2$ , es  $b^- = 0.10 \cdot 10^{-12}$  cm. Como se puede ver en la tabla 8, la parte relativa de la difusión incoherente en la difusión total es mucho más reducida que en el caso del hidrógeno. De esta manera, si uno se interesa en la difusión coherente de los neutrones por compuestos orgánicos, es mejor, cada vez que sea posible, realizar los experimentos con compuestos deuteriados. Por otra parte, las mediciones en difusión incoherente de neutrones pueden sacar ventaja de una deuteriación selectiva de la muestra con el objetivo de hacer variar las contribuciones respectivas de los diferentes grupos funcionales en la intensidad dispersada.

Tabla 8  
LONGITUDES DE DIFUSIÓN Y SECCIONES EFICACES  
DE ALGUNOS ELEMENTOS

Z	A	Espín	$b_{coh}$ ( $10^{-15}$ m)	$b_{inc}$ ( $10^{-15}$ m)	$\sigma_{coh}$ (barn)	$\sigma_{inc}$ (barn)
H	1	1/2	-3.742	25.22	1.760	79.91
$^2\text{H}$	1	1	6.674	4.03	5.597	2.04
C	6	0	6.653	0.01	5.563	0.001
O	8	0	5.805	0.56	4.235	0.04
Mg	12	0	5.4	0.8	3.631	0.08
Cl	17	3/2	9.6	6.5	11.53	5.3

Asociado a su espín, el neutrón tiene también un momento magnético  $\mu_N$  que es sensible a todos los campos emitidos por los momentos magnéticos debidos a las capas electrónicas incompletas de los átomos. Con esta interacción se pueden también estudiar las estructuras magnéticas y su dinámica.

## 9.2. Difusión coherente e incoherente

Si uno abre un libro de física nuclear, puede verificar la definición de las secciones eficaces de difusión coherente e incoherente de un núcleo. Se explica que la sección eficaz de difusión incoherente implica una inversión del espín del neutrón, mientras la coherente corresponde a un proceso sin cambio de espín. Se trata por lo tanto, de una propiedad individual de un núcleo correspondiendo a una reacción nuclear precisa. Para los físicos nucleares, la difusión coherente se llama también elástica ya que no implica una excitación del núcleo hacia otro nivel.

Sin embargo, los libros de física de la materia condensada dicen que la difusión coherente se asocia a una información colectiva y la incoherente a un comportamiento individual. ¿Cómo acordar las dos visiones?

La respuesta tiene que ver con lo que pasa en mecánica cuántica en la experiencia de Young cuando las partículas (fotones) que pasan por las dos rendijas forman poco a poco franjas de interferencias. La difusión coherente de los neutrones corresponde a un comportamiento ondulatorio, mientras que en la difusión incoherente el neutrón se comporta como una partícula.

Las dos cantidades principales medidas son: el vector de difusión

$$\vec{Q} = \vec{k} - \vec{k}_0,$$

la diferencia entre los vectores de onda del haz dispersado y del haz incidente y la diferencia energética

$$E - E_0 = \frac{\hbar^2}{2m} (k^2 - k_0^2).$$

El formalismo de Van Hove está en la base de todo el desarrollo teórico en difusión de neutrones. La expresión básica de la dispersión nuclear, que calcula la probabilidad de que un neutrón llegando sobre  $N$  núcleos, con la energía  $E_0$  y el vector de onda  $\vec{k}_0$ , sea dispersado con el vector  $\vec{k}$  en el elemento de ángulo sólido  $d\Omega$  alrededor de la dirección de  $\vec{k}$  (figura 38) y con una energía comprendida entre  $E$  y  $E + dE$  es:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{k}{k_0} \frac{1}{2\pi\hbar} \sum_j \sum_{j'} \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle b_j b_{j'} e^{-i\vec{Q}\cdot\vec{r}_j(0)} e^{i\vec{Q}\cdot\vec{r}_{j'}(t)} \right\rangle e^{-i\omega t} dt.$$

El promedio es sobre las posiciones de los núcleos y los estados de espín. Esta expresión se obtiene del operador densidad de partículas

$$\rho(\vec{r}, t) = \sum_j \delta(\vec{r} - \vec{r}_j(t)).$$

Con el cual se puede calcular la función de correlación de pares, que es la probabilidad de encontrar una partícula en  $(\vec{r}, t)$  cuando ésta se encuentra en  $(0, 0)$ :

$$\begin{aligned} G(\vec{r}, t) &= \frac{1}{N} \int \langle \rho(\vec{r}', 0) \rho(\vec{r}' + \vec{r}, t) \rangle d\vec{r}' \\ &= \frac{1}{N} \sum_{j, j'} \int \langle \delta[\vec{r}' - \vec{r}_j(0)] \delta[\vec{r}' + \vec{r} - \vec{r}_{j'}(t)] \rangle d\vec{r}'. \end{aligned}$$

Cuando  $j = j'$ , se obtiene la función de autocorrelación que permite seguir los movimientos de una partícula. Para obtener la sección eficaz diferencial parcial, es necesario realizar dos transformadas de Fourier. La primera en el espacio, con la cual se obtiene la función de dispersión intermedia:

$$F(\vec{Q}, t) = \int G(\vec{r}, t) e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} = \frac{1}{N} \sum_{j, j'} \langle e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{r}_j(0)} e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{j'}(t)} \rangle$$

y la segunda en el tiempo, con la cual se obtiene el factor de estructura dinámico:

$$S(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} F(\vec{Q}, t) e^{-i\omega t} dt = \frac{1}{2\pi\hbar N} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{j, j'} \langle e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{r}_j(0)} e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{j'}(t)} \rangle e^{-i\omega t} dt.$$

Finalmente, la sección eficaz diferencial parcial es proporcional a este factor de estructura.

En general, no hay acoplamiento entre la longitud de difusión de un núcleo y su posición, de tal manera que se pueden separar el promedio sobre los estados de espín del promedio sobre las coordenadas en la expresión de la sección eficaz diferencial parcial. Por lo tanto:

$$\begin{aligned} \frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} &= \frac{k}{k_0} \frac{1}{2\pi\hbar} \sum_j \sum_{j'} \langle b_j b_{j'} \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \langle e^{i\vec{Q} \cdot [\vec{r}_j(t) - \vec{r}_j(0)]} \rangle e^{-i\omega t} dt \\ &= \frac{k}{k_0} NS(\vec{Q}, \omega). \end{aligned}$$

Esta relación toma en cuenta el cociente  $k/k_0$  entre las velocidades después y antes de la dispersión para asegurar la conservación del flujo de neutrones.

Una particularidad importante de la dispersión de neutrones, se debe a que los diferentes átomos de un mismo elemento dispersan los neutrones con longitudes de difusión que no son las mismas de un átomo a otro. Este fenómeno existe en RX solamente en algunos casos particulares, pero no tiene el carácter sistemático que encontramos aquí. En dispersión nuclear, la diferencia de las longitudes de difusión proviene por una parte, de la presencia de isótopos (cada uno con su propia longitud de Fermi) y por otra parte, en el caso de isótopos con espín nuclear, de la existencia de dos posibilidades  $b_+$  o  $b_-$  como longitud de difusión.

Para simplificar, vamos a suponer que el sistema es monoatómico con una longitud de Fermi real (sin absorción). Para cada átomo podemos escribir:

$$b_j = \bar{b} + \Delta b_j,$$

donde  $\Delta b_j$  representa la distancia al valor promedio, por tanto

$$\langle \Delta b_j \rangle = 0.$$

Se tiene que evaluar

$$\langle b_j b_{j'} \rangle = \langle (\bar{b} + \Delta b_j)(\bar{b} + \Delta b_{j'}) \rangle = \langle \bar{b}^2 + \bar{b} \Delta b_{j'} + \bar{b} \Delta b_j + \Delta b_j \Delta b_{j'} \rangle.$$

El promedio del segundo y del tercer término es cero, para el cuarto hay que distinguir

$$\langle \Delta b_j \Delta b_{j'} \rangle = 0 \text{ si } j = j'$$

$$\langle \Delta b_j \Delta b_{j'} \rangle = \overline{(\Delta b)^2} \text{ si } j \neq j'.$$

Por lo tanto, la expresión de la sección eficaz diferencial parcial anterior se puede separar en dos tomando en cuenta los casos  $j \neq j'$  y  $j = j'$  en las sumas

$$\begin{aligned} \frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} &= \frac{k}{k_0} \frac{1}{2\pi\hbar} \bar{b}^2 \sum_{j, j' \neq j} \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\bar{Q}[\bar{r}_{j'}(t) - \bar{r}_j(0)]} \right\rangle e^{-i\omega t} dt \\ &+ \frac{k}{k_0} \frac{1}{2\pi\hbar} (\bar{b}^2 - \bar{b}^2) \sum_j \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{i\bar{Q}[\bar{r}_j(t) - \bar{r}_j(0)]} \right\rangle e^{-i\omega t} dt, \end{aligned}$$

donde hemos separado las secciones eficaces diferenciales parciales de difusión coherente e incoherente:

$$\frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} = \left( \frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} \right)_{coh} + \left( \frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} \right)_{inc}.$$

Para todos los sistemas, se puede separar la función de correlación de pares dependiendo del tiempo de la manera siguiente

$$G(\vec{r}, t) = G(\vec{r}, \infty) + G'(\vec{r}, t) \quad \text{con} \quad \lim_{t \rightarrow \infty} G'(\vec{r}, t) = 0.$$

De la misma manera se puede separar la función de dispersión intermediaria

$$F(\vec{Q}, t) = F(\vec{Q}, \infty) + F'(\vec{Q}, t) \quad \text{con} \quad \lim_{t \rightarrow \infty} F'(\vec{Q}, t) = 0,$$

esto nos permite escribir el factor de estructura dinámica:

$$\begin{aligned} S(\vec{Q}, \omega) &= \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} [F(\vec{Q}, \infty) + F'(\vec{Q}, t)] e^{-i\omega t} dt \\ &= \frac{\delta(\omega)}{2\pi\hbar} F(\vec{Q}, \infty) + \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} F'(\vec{Q}, t) dt \\ &= S^{el}(\vec{Q}, \omega) + S^{inel}(\vec{Q}, \omega), \end{aligned}$$

lo que permite escribir la sección diferencial parcial eficaz

$$\frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} = \left( \frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} \right)^{el} + \left( \frac{d^2 \sigma}{d\Omega dE} \right)^{inel}.$$

Así, además del aspecto coherencia/incoherencia, se tiene que tomar en cuenta al aspecto energético. Si los neutrones dispersados tienen la misma energía que los neutrones incidentes, se obtiene una dispersión elástica;

si no tienen la misma energía (pérdida o incremento), se obtiene una dispersión inelástica.

Tomando en cuenta que para la parte elástica  $k = k_0$ , se obtiene para la parte elástica de la dispersión coherente:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{coh}^{el} = \sum_{jj'} \overline{b_j b_{j'}} e^{-i\vec{Q}[\vec{r}_j(0) - \vec{r}_{j'}(\infty)]} = \overline{b}^2 \sum_{jj'} e^{-i\vec{Q}[\vec{r}_j(0) - \vec{r}_{j'}(\infty)]}$$

y para la parte elástica de la dispersión incoherente:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{inc}^{el} = \sum_j \overline{b_j b_j} e^{-i\vec{Q}[\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(\infty)]} = (\overline{b}^2 - \overline{b}^2) \sum_j e^{-i\vec{Q}[\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(\infty)]}$$

La difusión elástica representa para la parte coherente, las interferencias entre pares de átomos: un átomo al tiempo cero y otro al tiempo infinito y para la parte incoherente, las interferencias entre un átomo al tiempo cero y el mismo al tiempo infinito.

En el caso de la dispersión elástica  $E - E_0 = 0$  y la transferencia de vector de onda es

$$Q_{elast} = \frac{4\pi}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2},$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre el vector  $\vec{k}_0$  y el vector  $\vec{k}$ . Esta expresión no es otra cosa más que la ley de Bragg.

Estudiar una estructura, es estudiar cómo se colocan los átomos los unos con respecto a los otros o, a escala más grande, cómo se colocan unos subconjuntos con respecto a otros subconjuntos. Por lo tanto, es la dispersión coherente la técnica apropiada y la estructura se mani-

festará por efectos de interferencias. Además, se consideran que estos átomos o subconjuntos son fijos o, por lo menos ocupan una posición de equilibrio alrededor de la cual se pueden mover, y se tratará de dispersión coherente.

Para estudiar la dinámica, lo que conviene es observar las correlaciones temporales entre un átomo al tiempo 0 y este mismo al tiempo  $t$ , por lo tanto se tratará de dispersión incoherente inelástica.

Si uno considera la parte elástica de la dispersión incoherente, lo que se va a medir son las interferencias entre un átomo al tiempo cero y el mismo al tiempo infinito. Si el átomo se va lejos, no hay correlaciones para dar lugar a una dispersión elástica incoherente, pero si el átomo se queda confinado en una parte del espacio, la medición corresponde a una función de  $Q$  que representa la transformada de Fourier de esta parte del espacio.

### 9.3. Algunos resultados

Dentro de los resultados muy interesantes que utilizaron la dispersión de neutrones se vale mencionar los que tratan de la hidratación de las proteínas. Existen varios trabajos de revisión al respecto [107-110]. Bellissent-Funel *et al.* [111-113] han trabajado sobre la c-ficocianina deuteriada a diferentes temperaturas y grados de hidratación. La c-ficocianina es una proteína globular soluble cuya estructura fue determinada con una muy buena resolución por DRX. Su estructura secundaria contiene 83% de hélices alfa. Se encuentra en abundancia en las cianobacterias en donde está implicada en la fotosíntesis, en la cual la energía luminosa colectada por los cromóforos es convertida en energía química. En una proteína, el 50% de los átomos son de hidrógeno, por lo que es



necesario poder separar los efectos debidos a los átomos de hidrógeno de la proteína y a los del agua. Para esto se crecen las cianobacterias en agua pesada ( $D_2O$ ), lo que hace que en las cianobacterias no quede más que el 1% de átomos de hidrógeno y de ésta se extrae la c-ficocianina deuteriada.

Cuando se hidrata esta última con proporciones variables de agua ligera, se puede seguir por difusión inelástica de neutrones la dinámica del agua en la superficie de la proteína. A tiempos cortos, del orden de los picosegundos, las moléculas de agua poseen movimientos de difusión limitados a saltos sobre sitios adyacentes a lo largo de la interfase. En el agua en bulto esta difusión se hace por saltos aleatorios y cuatro veces más rápido. La comparación de las propiedades dinámicas del agua en bulto y las del agua interfacial ha mostrado que esta última a temperatura ambiente se comportaba como agua superenfriada (agua líquida debajo del punto de cristalización) a baja temperatura. El agua interfacial a  $25^\circ C$  se parece al agua super enfriada a  $0^\circ C$ .

#### 9.4. Dispersión de neutrones a ángulos pequeños

La dispersión de neutrones a pequeños ángulos (SANS por sus siglas en inglés), es una técnica de dispersión elástica que permite sondear las propiedades estáticas de la materia sobre una escala de algunas décimas de nanómetros a algunos nanómetros [102, 114]. Por lo tanto, esta técnica está muy bien adaptada al estudio de macromoléculas en solución.

Todo lo que hemos visto anteriormente es válido, pero nos interesaremos en particular en la sección eficaz diferencial coherente ya que la dispersión incoherente que

no depende del vector de difusión produce un ruido de fondo que se tiene que restar.

En SANS, se considera que no hay intercambio de energía entre la muestra y los neutrones y el parámetro físico es el vector de difusión:

$$Q_{elast} = \frac{4\pi}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}.$$

El análisis de la curva  $I(Q)$  es posible con las dos condiciones: i)  $Q^{-1}$  tiene que ser del mismo orden de magnitud que el de las distancias medidas. Como la longitud de onda de los neutrones se encuentra entre 0.2 y 2 nm, los valores de  $Q$  interesantes correspondientes a tamaños característicos entre 0.5 y 50 nm son solamente accesibles con ángulos  $\theta < 10^\circ$ ; ii) la intensidad dispersada tiene que ser medible, lo que necesita la existencia de un contraste entre el objeto estudiado y el medio que lo rodea [115, 116].

La especificidad de esta técnica es su capacidad para explorar la estructura de la materia a una escala de distancias superiores a 0.5 nm. A esta escala, se puede considerar que los *difusores elementales* ya no son más los núcleos, sino moléculas de tamaño mayor. Por lo tanto, la longitud de difusión de estos difusores es la suma de las longitudes de difusión coherente de los átomos que las componen. Además, a esta escala de  $Q$ , las fluctuaciones de densidad son despreciables.

Una vez restado el término de dispersión incoherente, la sección eficaz diferencial se puede escribir

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \Omega} = N_p V_p^2 (\Delta \delta)^2 P(Q) S(Q),$$

donde  $N_p$  es la concentración de difusores,  $V_p$  es el volumen de un difusor,  $(\Delta\delta)^2$  es el contraste, cuadrado de la diferencia de las longitudes de difusión,  $P(Q)$  el factor de forma y  $S(Q)$  el factor de estructura.

Afortunadamente, existen expresiones analíticas del factor de forma en el caso de las formas más comunes. Por ejemplo, el factor de forma para una esfera de radio  $R_p$  se escribe

$$P(Q) = \left\{ \frac{3 \left[ \text{sen}(QR_p) - QR_p \cos(QR_p) \right]}{(QR_p)^3} \right\}^2$$

En [99], el lector interesado encontrará las expresiones para otras formas como discos, varillas, cilindros, etcétera.

Recientemente, experimentos originales [117], han permitido determinar la compresibilidad de la mioglobina. Los experimentos fueron efectuados en agua deuteriada para reducir la dispersión incoherente del hidrógeno. Mediciones de la sección eficaz coherente por unidad de volumen, han sido realizadas en función del vector de difusión para diferentes presiones hidrostáticas, aprovechando los cambios de densidad entre el soluto y el solvente debidos a los cambios de presión. Otras aplicaciones se pueden encontrar en [118-122].

### 9.5. El equipo

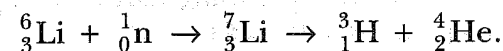
Los neutrones se producen de la fusión o de la fisión, en reacciones nucleares resultando del choque de partículas cargadas (electrones, protones) acelerados sobre

un blanco. Por fisión atómica, alcanzan una velocidad inicial muy elevada. Para hacer decrecer la longitud de onda a 0.1 nm, necesaria a la difracción por los cristales, hay que frenar los neutrones por colisiones atómicas con los átomos de un moderador (agua, agua pesada, berilio y grafito) colocados en la pila atómica para obtener neutrones térmicos. Las fuentes frías y calientes termalizan los neutrones a 25 K o 6000 K y permiten mover el máximo de la distribución hacia las grandes longitudes de onda (0.35 nm) o a las pequeñas longitudes de onda (0.04 nm), respectivamente.

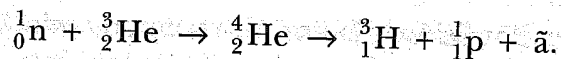
Se obtiene un haz de neutrones abriendo un canal en la protección y el moderador de la pila. Por este hoyo, los neutrones bien colocados y bien dirigidos se pueden escapar y van en la dirección impuesta por el canal. Sus velocidades tienen una distribución de Maxwell-Boltzman que corresponde a la temperatura del moderador.

El haz, una vez disminuida su energía por el efecto del moderador, incide sobre un cristal monocromador que permite seleccionar la longitud de onda. Una vez que el haz ha interactuado con la muestra, los detectores disponibles permiten el conteo de los neutrones en función del ángulo de difracción.

Como el neutrón no tiene carga, para detectarlo tiene que provocar una reacción nuclear y lo que se detecta son las partículas cargadas o los fotones emitidos durante esta reacción. Hay por ejemplo, detectores basados en  ${}^3_2\text{He}$ , el cual se genera mediante la irradiación de  ${}^6_3\text{Li}$  en un reactor, siguiendo la reacción



A continuación  ${}^3_1\text{H}$  decae en  ${}^3_2\text{He}$  y los neutrones transmitidos reaccionan como



Los protones generados de esta manera producen una ionización del gas del detector, y los electrones resultantes son recogidos en el ánodo, dando lugar a un pulso posteriormente amplificado.

En dispersión de neutrones, existen diferentes aparatos que tienen que ver con los diferentes tipos de dispersión que existen. En el caso de la dispersión elástica, se usan difractómetros y en el caso de dispersión inelástica se usan espectrómetros.

## 10. TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), es una de las principales técnicas, con la cristalografía de RX, que permite determinar estructuras tridimensionales con una resolución atómica. Es un método de análisis para núcleos que poseen un número de espín diferente de cero. En particular, permite estudiar las propiedades de estos núcleos que están influenciados por su entorno, permite la identificación y la dosificación de los constituyentes de un compuesto. Se realiza *in vitro* sobre muestras, pero también *in vivo* en equipos de imagenología recientes.

La resonancia paramagnética electrónica (RPE), estudia las interacciones con los momentos magnéticos de los electrones de moléculas paramagnéticas que poseen al menos un electrón no apareado.

### 10.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Un núcleo atómico en rotación, posee un momento angular instantáneo o espín, que resulta de los espines individuales de los protones y neutrones que constituyen el núcleo. El espín  $l$  puede tomar los valores 0, 1/2, 1, 3/2 (en unidades de  $\hbar$ ) y puede tomar  $2l+1$  orientaciones posibles  $(-l, \dots, 0, \dots, l)$  en un campo magnético externo. Los estados de espín, están cuantificados y un cuanto de energía puede producir una transición de una orientación a la otra. Es posible provocar un fenómeno de resonancia con una fuente de energía electromagnética (oscilador) en un campo magnético intenso.

Los núcleos que tienen un número idéntico y par de neutrones y protones como  ${}^{12}\text{C}$ ,  ${}^{16}\text{O}$  tienen un espín global cero  $l=0$  y no presentan fenómeno de resonancia por RMN. Los núcleos con número idéntico e impar de neutrones y protones, como  ${}^2\text{H}$  (deuterio),  ${}^{14}\text{N}$  tienen un espín global  $l=1$  (tres orientaciones posibles) y no presentan el fenómeno de resonancia por RMN. En contraparte, los núcleos que tienen un número de protones y neutrones diferente, como  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{17}\text{N}$  y  ${}^{31}\text{P}$  tienen un espín global  $l=1/2$  y pueden tomar dos orientaciones opuestas:  $\uparrow$  y  $\downarrow$  en un campo magnético. Estos elementos dan una señal RMN característica.

En ausencia de campo magnético externo, los momentos magnéticos de espín de los protones están orientados al azar. Pero inmerso en un campo magnético intenso, cada momento magnético podrá tomar dos orientaciones posibles, paralelo ( $\uparrow$ ) o antiparalelo ( $\downarrow$ ), correspondiendo a dos niveles energéticos diferentes.

Si  $\bar{\alpha}$  es el momento magnético de espín,  $\bar{\mu}$  el momento magnético y  $\gamma$  la constante giromagnética del núcleo, tenemos

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{a} = \gamma \hbar \vec{l}$$

La energía del núcleo en el campo  $H_0$  orientado según  $z$  es

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 = \mu_z H_0 = \gamma \hbar l H_0.$$

La transición entre los dos niveles de espines  $-1/2$  y  $+1/2$  tendrá lugar para diferencias de energía:

$$\Delta E = \gamma \hbar H_0 = h \nu_1$$

y

$$\nu_1 = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

Un esquema de la transición entre las dos posiciones del momento magnético del núcleo se presenta en la figura 39.

Según la relación anterior, un núcleo debería de dar una sola resonancia de frecuencia  $\nu_1$ . Sin embargo, se observan resonancias de frecuencias diferentes que son

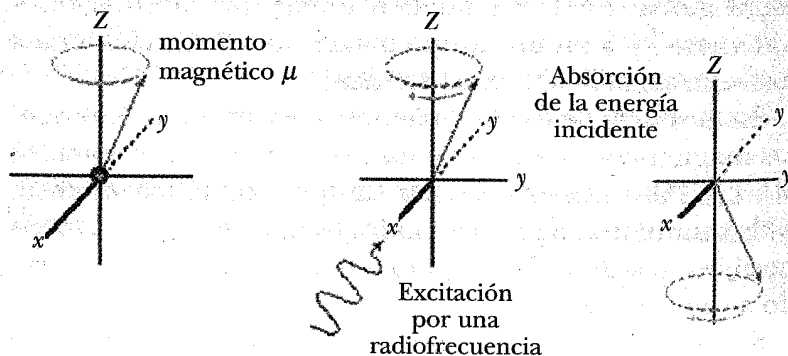


Figura 39. Esquema de la transición del momento magnético.

función del entorno químico inmediato del núcleo y son debidas al apantallamiento de los electrones que poseen también un momento magnético que cambia el valor del campo que se ejerce realmente a nivel del núcleo.

Si  $H_1$  representa el campo magnético local,  $H_i$  el campo magnético inducido y  $\sigma$  la constante de apantallamiento, el campo magnético efectivo a nivel del núcleo es  $H_1 = H_0 - H_i$ , con  $H_i = \sigma H_0$ , por lo tanto

$$H_1 = H_0 (1 - \sigma).$$

Para que haya resonancia a una frecuencia dada, habría que aplicar externamente un campo  $H_a$  superior a  $H_0$  para compensar el efecto de apantallamiento.

Es difícil medir exactamente el valor del campo magnético donde aparece la resonancia, por lo tanto se añade a la muestra en estudio, una sustancia de referencia, por ejemplo el tetrametilsilano (TMS), molécula inerte y volátil cuyos protones equivalentes están muy "blindados" (constante de apantallamiento grande) y resuenan para un campo de valor más grande que la mayoría de los otros protones. A frecuencia constante ( $\nu_{ref}$ ), la frecuencia de resonancia de protones de moléculas orgánicas menos blindadas ocurre para campos aplicados  $H_a$  menores que  $H_0$ .

La diferencia entre la posición de cualquier pico y el de la molécula de referencia TMS se llama el desplazamiento químico  $\delta$ . Para que  $\delta$  sea independiente de la frecuencia del oscilador,  $\delta$  se define como

$$\delta = \frac{H_{ref} - H_a}{H_{ref}} 10^{-6}$$

y se expresa en ppm (parte por millón).

Sólo los protones que tienen el mismo entorno químico inmediato resonarán para un mismo campo aplicado. Dos protones diferentes darán frecuencias de resonancia diferentes. La tabla 9 presenta los desplazamientos químicos del protón de diferentes grupos.

Cualquier efecto que tienda a disminuir la densidad electrónica alrededor del núcleo disminuye la constante de apantallamiento  $\sigma$  y desplaza la resonancia hacia los campos pequeños entonces  $\delta$  aumenta. Se habla de "desblindaje" del protón. Entre C, N y O, la electronegatividad aumenta, por lo tanto  $\sigma$  disminuye y  $\delta$  aumenta. Ejemplos:  $\delta = 0.9$  para C-H,  $\delta = 2.2$  para N-H y  $\delta > 3.0$  para O-H;  $\delta = 2.19$  para CH<sub>3</sub>-I,  $\delta = 2.69$  para CH<sub>3</sub>-Br,  $\delta = 4.26$  para CH<sub>3</sub>-F.

En el caso del grupo aldehído -CHO, el protón es desblindado por el efecto electrónico del grupo carbonilo C=O y debería de resonar en 5-6 ppm. Pero, experimentalmente se observa en 9-10 ppm. El movimiento de los electrones no enlazantes de los dobles del oxígeno (electrones  $\pi$ ), crea un efecto de apantallamiento extra

Tabla 9  
DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DEL PROTÓN

Grupo	$\delta$ en ppm	Grupo	$\delta$ en ppm
-CH-C	0.8-1	-CH-X	2.5-4
-CH-C-C-X	0.8-1.2	-CH-O-C=O	3.7-4.8
-CH-C=C-	1.6-2.2	CH <sub>2</sub> =C<	4.5-5.3
-CH-C-X	1-1.8	R-NH-	1-5
-CH-C-CN	2-3	R-OH	1-6
-CH-N<	2.1-3	-C(=O)-NH-	5.5-8.5
-C≡C-H	2.3-3.2	H-C(=O)-N<	8
-CH-C=O	2-2.7	R-CHO	9.5-9.9
-CH-O	3-4	R-CO <sub>2</sub> H	10-13

de anisotropía magnética. El campo  $H_0$  aplicado induce un campo extra que se superpone y desplaza la resonancia hacia los campos pequeños y  $\delta$  aumenta. Este fenómeno existe también para el grupo >C=C< ( $\delta = 5-6$  ppm) y los ciclos aromáticos ( $\delta = 7-8$  ppm).

En función de la resolución del espectrómetro RMN utilizado, se pueden separar bandas anchas en varios picos delgados. La comparación de los espectros RMN del bromo-etano (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Br) muestra que, a baja resolución (30 MHz), se detectan dos bandas anchas cuya superficie es proporcional al número de protones que resuenan, mientras que a alta resolución (60 MHz), estas bandas se separan respectivamente en tres y cuatro picos. El área global queda proporcional al número de protones que resuenan. Las separaciones entre los picos son idénticas e iguales a 7 Hz. Esta diferencia corresponde a la constante de acoplamiento  $J$  entre los protones resonantes. Este valor es independiente de la frecuencia del campo, pero no del desplazamiento químico  $\delta$  y es, por lo tanto, una característica intrínseca de la molécula estudiada.

Las constantes de acoplamiento dependen de: i) la distancia entre los protones resonantes y del número de enlaces sobre el heteroátomo ligado a los protones (ejemplo:  $J = 12$  Hz para dos enlaces H-C-H,  $J = 6-7$  Hz para tres enlaces H-C-C-H); ii) la delocalización de los electrones en los sistemas conjugados, el acoplamiento se puede producir entre protones separados por cuatro enlaces (benceno: acoplamiento orto  $J_o = 9$  Hz, meta  $J_m = 3$  Hz, para  $J_p = 0-1$  Hz); iii) el ángulo diedro entre los enlaces de los protones (alqueno: protones *cis*  $J = 10$  Hz, protones *trans*  $J = 16$  Hz).

En el caso de una constante de acoplamiento pequeña con respecto a la diferencia de los desplazamientos



químicos, la multiplicidad de los picos se explica por la influencia recíproca de los momentos magnéticos de un protón sobre otro protón colocado en un átomo adyacente.

Si  $n$  protones equivalentes de un átomo  $i$  influyen a  $n'$  protones de un átomo adyacente  $j$ , y viceversa, como el valor del espín es  $\pm 1/2$  (o  $\uparrow$  y  $\downarrow$ ), se obtendrá la multiplicidad de los picos siguientes:

- Para el átomo  $i$  ligado a  $n$  protones, hay un grupo de  $n' + 1$  picos;
- Para el átomo  $j$  ligado a  $n'$  protones, hay un grupo de  $n + 1$  picos.

La intensidad de los picos del grupo toma los valores del "triángulo de Pascal": 1-1, 1-2-1, 1-3-3-1, 1-4-6-4-1, 1-5-10-10-5-1, ... Un ejemplo está dado en la figura 40.

### Ejemplos

i) En el caso del bromo-etano ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Br}$ ), los tres protones equivalentes del grupo  $\text{-CH}_3$  reciben influencia de los dos protones del átomo de carbono adyacente. Los espines de los dos protones pueden estar orientados de la manera siguiente: ( $\uparrow\uparrow$ ) o ( $\uparrow\downarrow$ ;  $\downarrow\uparrow$ ) o ( $\downarrow\downarrow$ ), o sea una intensidad relativa 1-2-1.

ii) Los dos protones equivalentes del grupo  $>\text{CH}_2$  reciben la influencia de los tres protones del átomo de carbono adyacente. Los espines de los tres protones pueden estar orientados de la manera siguiente: ( $\uparrow\uparrow\uparrow$ ) o ( $\uparrow\uparrow\downarrow$ ;  $\uparrow\downarrow\uparrow$ ;  $\downarrow\uparrow\uparrow$ ) o ( $\downarrow\downarrow\uparrow$ ;  $\downarrow\uparrow\downarrow$ ;  $\uparrow\downarrow\downarrow$ ) o ( $\downarrow\downarrow\downarrow$ ), sea una intensidad relativa 1-3-3-1.

La RMN es un método cuantitativo: existe una relación de proporcionalidad entre la superficie debajo de la señal

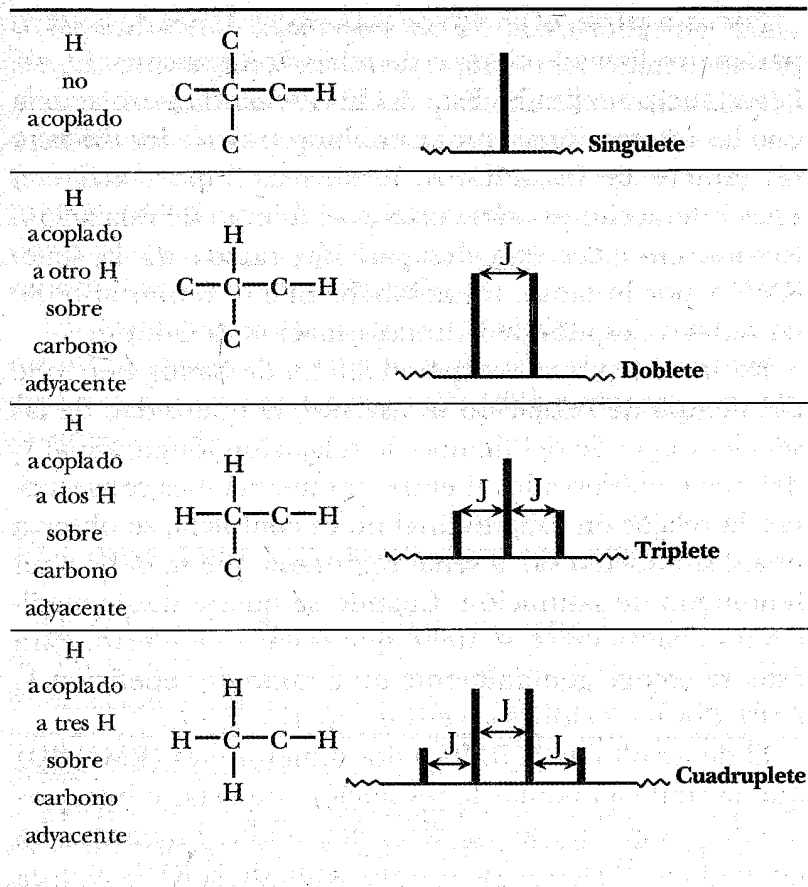


Figura 40. Multiplicidad de los espines del protón en función del entorno del carbono adyacente.

medida (integral) y la cantidad de núcleos resonando efectivamente a la frecuencia indicada. Si la medición se efectúa sobre un volumen determinado (tubo que contiene la muestra), se puede admitir la proporcionalidad entre la integral de las señales y la concentración de la sustancia analizada.

Por otra parte, el ancho de las señales depende de otro parámetro llamado tiempo de relajación transversal  $t_2$  de la sustancia analizada. Este ancho de banda se relaciona con las interacciones que se establecen entre los diferentes espines de los núcleos. Entre más importantes son estas interacciones, más corto es el tiempo de relajación. Resulta entonces una desaparición rápida de la señal RMN y por lo tanto, un ensanchamiento importante de las señales después de la transformación de Fourier.

De la misma manera que el ancho de banda depende del tiempo de relajación transversal, la intensidad de las señales depende del tiempo de relajación longitudinal  $t_1$  del núcleo observado. Si entre dos mediciones consecutivas, la relajación longitudinal no es completa, se observa una disminución de la señal registrada que se debe a un fenómeno de saturación. Cuando se quiere hacer mediciones cuantitativas, se tiene que evitar este efecto. Para esto, se escoge generalmente un tiempo de repetición  $t_R$  entre dos mediciones sucesivas superior a  $5 t_1$ .

El desarrollo de la RMN a dos dimensiones (RMN 2D) que permite aumentar la resolución, detectar e interpretar efectos que no se pueden tratar a una dimensión, ha aumentado el campo de investigación de la RMN al estudio de las estructuras de macromoléculas. Las dos dimensiones provienen de los dos intervalos de tiempo  $t_1$  y  $t_2$ . Un experimento de RMN 2D consiste en una serie de experimentos de RMN 1D en los cuales el tiempo  $t_1$  es incrementado y la señal se registra durante el tiempo  $t_2$ . El espectro bidimensional se obtiene con una doble transformada de Fourier. Los picos diagonales son los desplazamientos químicos del espectro RMN 1D. Los picos fuera de la diagonal, resultan de interacciones entre átomos [123].

Cambiando la naturaleza de las pulsaciones de radiofrecuencia, se pueden observar diferentes interacciones: el experimento de tipo COSY, permite evidenciar acoplamientos escalares y por lo tanto, establecer el entorno químico hasta 2 a 3 enlaces químicos; el tipo de experimento NOESY revela las interacciones dipolares entre dos espines aislados y permite establecer el entorno en el espacio hasta 0.5 nm [124-126].

Últimamente, se ha utilizado para observar movimientos intramoleculares, interacciones con el entorno biológico o con otras moléculas [127-129] y plegamiento de proteínas [130-132].

### 10.2. Resonancia paramagnética electrónica (RPE)

La RPE concierne a las radiaciones situadas en el rango de las hiperfrecuencias, entre 1 a 10 GHz. Estudia sus interacciones con los momentos magnéticos de los electrones de moléculas paramagnéticas que poseen al menos un electrón no apareado.

Existen moléculas paramagnéticas estables como el oxígeno triplete, los radicales nitróxidos, los complejos de coordinación de iones metálicos o semiconductores por ejemplo. Pero un número importante de especies paramagnéticas pueden ser creadas por oxidorreducción, combustión, fotólisis, radiólisis o polimerización.

La caracterización de estas especies por RPE permite estudiar los procesos que intervienen en reacciones que producen radicales libres. Utilizando sondas paramagnéticas (marcadores de espines), se pueden también determinar propiedades mecánicas (viscosidad, polaridades locales en medios heterogéneos, movilidad de cadenas macromoleculares en polímeros) o del orden molecular

de medios organizados como las membranas biológicas por ejemplo.

El origen del paramagnetismo se debe a la existencia de un espín electrónico diferente de cero ( $\vec{S}$ ), es decir a la existencia de un momento magnético ( $\vec{\mu}_S$ ). En el caso de un electrón libre, el momento magnético es

$$\vec{\mu}_S = g_e \gamma \vec{S},$$

donde  $g_e$  es el factor de Landé (2.003 para el electrón libre) y  $\gamma$  la constante giromagnética.

En un campo magnético  $\vec{B}_0$ ,  $\vec{S}$  puede tomar solamente dos orientaciones con respecto a este campo. Estas orientaciones corresponden a los números cuánticos de espín  $\pm 1/2$  y a las dos funciones de espín correspondientes. A estos estados corresponden dos estados de energía

$$E = \pm \frac{g_e \mu_B B_0}{2}$$

con  $\mu_B$  el magnetón de Bohr.

Los espines electrónicos efectúan un movimiento de precesión alrededor de  $\vec{B}_0$  (precesión de Larmor) a una velocidad angular  $\omega_0$  proporcional a  $B_0$ . Las transiciones entre los niveles de energía pueden ser inducidas por la componente magnética de una radiación electromagnética de frecuencia adecuada y de orientación perpendicular a  $\vec{B}_0$  tal como:

$$\Delta E = h\nu_0 = g_e \mu_B B_0.$$

Aunque la física de los fenómenos RMN y RPE es parecida, las señales de absorción en espectroscopía RPE

se presentan para una frecuencia fija en función del campo magnético. La forma de banda es parecida a una curva gaussiana o lorentziana. Sin embargo, la intensidad de esta señal es en general débil ya que está relacionada con la cantidad de especies paramagnéticas en la muestra. Para una mayor sensibilidad, los aparatos presentan una señal que es la derivada primera de la curva inicial. El lector podrá encontrar aplicaciones de esta técnica en el campo biológico en la referencia [133].

## 11. CONCLUSIÓN

Numerosas técnicas experimentales se ofrecen para el estudio de la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas. Presentamos aquí, las más utilizadas para la caracterización de estas moléculas. No hemos hablado de las técnicas importantes de preparación y obtención de muestras las más puras posibles. Tampoco hemos tratado las técnicas computacionales que frecuentemente ayudan a la comprensión e interpretación de los resultados experimentales. Varias referencias de la lista dada a continuación utilizan también estas técnicas. Hay que notar que en los últimos años, son pocos los artículos de investigación que reportan el uso de una sola técnica; frecuentemente, se usan dos o más, lo que favorece también la interdisciplina y la colaboración entre diferentes equipos de investigación.

## REFERENCIAS

1. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical chemistry, part II, Techniques for the study of biological structure and the function*, W. H. Freeman and Co., San Francisco (1980).

2. J. Dupont-Roc, C. Cohen-Tannoudji, G. Gryndberg, *Atom-Photon interaction*, Wiley, Nueva York (1992).
3. C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, F. Laloë, *Quantum Mechanics*, vol. 1 y 2, Wiley-Interscience, Nueva York (1977).
4. I. Tinoco, K. Sauer, J. C. Wang, J. D. Puglisi, *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological sciences*, 4<sup>a</sup> ed., Pearson, Prentice Hall, Harlow (2002).
5. D. J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3<sup>a</sup> ed., Addison Wesley, Longman, Harlow (1998).
6. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, Nueva York (1983).
7. J. R. Lakowicz, ed., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 1 *Techniques*, Plenum Press, Nueva York (1991).
8. J. R. Lakowicz, ed., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 2 *Principles*, Plenum Press, Nueva York (1991).
9. J. R. Lakowicz, ed., *Topics in Fluorescence Spectroscopy* vol. 3 *Applications*, Plenum Press, Nueva York (1991).
10. D. C. Harris, *Exploring Chemical Analysis*, 3<sup>a</sup> ed., W. H. Freeman, Nueva York (2005).
11. M. Eftink, *Fluorescence Techniques for Studying Protein Structure*, en *Protein Structure Determination: Methods of Biochemical Analysis*, vol. 35, C. H. Suelter, editor, John Wiley and Sons, Nueva York (1990).
12. D. R. Buckler, E. Haas, H. A. Scheraga, *Analysis of the structure of ribonuclease A in native and partially denaturated states by time-resolved nonradiative dynamic excitation energy transfer between site-specific extrinsic probes*, *Biochemistry* **34**, 15965-15978 (1995).
13. B. E. Jones, J. M. Beechem, C. R. Matthews, *Local and global dynamics during the folding of Escherichia coli dihydrofolate reductase by time-resolved fluorescence spectroscopy*, *Biochemistry* **34**, 1868-1877 (1995).
14. C. Rischel, P. Thyberg, R. Rigler, F. M. Poulsen, *Time-resolved fluorescence studies of the molten globule state of apomyoglobin*, *J. Mol. Biol.* **257**, 877-885 (1996).
15. S. Georghiou, T. D. Bradrick, A. Philippetis, J. M. Beechem, *Large-amplitude picosecond anisotropy decay of the intrinsic fluorescence of double-stranded DNA*, *Biophys. J.* **70**, 1909-1922 (1996).
16. D. P. Millar, *Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 322-326 (1996).
17. P. K. Hammen, D. G. Gorenstein, H. Weiner, *Structure of the signal sequences for the two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import*, *Biochemistry* **33**, 8610-8617 (1994).
18. D. Axelrod, P. Ravdin, D. E. Koppel, J. Schlessinger, W. W. Webb, E. L. Elson y T. R. Podleski, *Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**, 4594-4598 (1976).
19. D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. L. Elson, W. W. Webb, *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*, *Biophys. J.* **16**, 1055-1069 (1976).
20. M. Bassilana, R.A. Arkowitz, *Rac1 and Cdc42 have different roles in Candida albicans development*, *Eukaryot Cell* **5**, 321-329 (2006).
21. J. C. G. Blonk, A. Don, H. van Aalsr, J. J. Birmingham, *Fluorescence photobleaching recovery in the confocal scanning light microscope*, *J. Microsc.* **169**, 363-374 (1993).
22. C. Biskup, T. Zimmer, L. Kelbaskas, B. Hoffmann, N. Klöcker, W. Becker, A. Bergmann, K. Benndorf, *Multi-Dimensional Fluorescence Lifetime and FRET Measurements*, *Microsc. Res. Tech.* **70**, 442-451 (2002).
23. M. Stallings-Mann, L. Jamieson, R. P. Regala, C. Weems, N. R. Murray, A. P. Fields, *A novel small-molecule inhibitor of protein kinase Ciota blocks transformed growth of non-small-cell lung cancer cells*, *Cancer Res.* **66**, 1767-1774 (2006).
24. S. Murata, P. Herman, M. Iwashina, K. Mochizuki, T. Nakazawa, T. Kondo, N. Nakamura, J. R. Lakowicz y R. J. Katoh, *Applications of microscopic Forster resonance energy transfer to cytological diagnosis of the thyroid tumors*, *J. Biomed. Opt.* **10**, 034008 (2005).
25. L. A. Woodward, *Introduction to the theory of molecular vibrations and vibrational spectroscopy*, Oxford Univ Press, Oxford (1972).
26. N. B. Colthup, L. H. Daly y S. E. Wimberly, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, 3<sup>a</sup> edición, Academic Press, San Diego (1990).
27. B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons, Chichester (2004).
28. G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts*, John Wiley and Sons, Nueva York (2004).
29. I. N. Serdyuk, N. R. Zaccai, J. Zaccai, G. Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function*, Cambridge University Press (2007).
30. Y. N. Chirgadze, N. A. Nevskaya, *Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet*, *Biopolymers* **15**, 607-625 (1976); **15**, 627-636 (1976).

31. N. A. Nevskaya, Y. N. Chirgadze, *Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of  $\alpha$ -helix*, *Biopolymers* **15**, 637-648 (1976).
32. J. Bandekar, S. Krimm, *Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: Characteristic amides bands of beta-turns*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 774-777 (1979).
33. S. Krimm, J. Bandekar, *Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins*, *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-364 (1986).
34. H. Susi, D. M. Byler, *Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes*, *Methods Enzymol.* **130**, 290-311 (1986).
35. H. Susi, D. M. Byler, *Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: seconde derivative spectra*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 391-397 (1983).
36. D. M. Byler, H. Susi, *Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra*, *Biopolymers* **25**, 469-487 (1986).
37. J. L. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F. M. Goni, *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23-56 (1993).
38. J. L. Arrondo, F. M. Goni, *Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 367-405 (1999).
39. W. K. Surewicz, T. M. Stepanik, A. G. Szabo y H. H. Mantsch, *Lipid-induced changes in the secondary structure of snake venom cardiotoxins*, *J. Biol. Chem.* **263**, 786-790 (1988).
40. B. H. Stuart, *FTIR of biomolecules*, en *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine*, vol. 4, 651-683, R. A. Meyers, editor, Wiley-VCH, Weinheim (2004).
41. W. Zeroual, M. Manfait, C. Choisy, *FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*)*, *Pathol. Biol. (Paris)* **43**, 300-305 (1995).
42. G. D. Sockalingum, W. Bouhedja, P. Pina, P. Allouch, C. Bloy, M. Manfait, *FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterization of microorganisms*, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **44**, 261-269 (1998).
43. P. Lasch y J. Kneipp, editores, *Biomedical vibrational spectroscopy*, John Wiley & sons, Hoboken (2008).
44. D. A. Long, *Raman spectroscopy*, McGraw-Hill, Maidenhead (1977).
45. R.E. Kast, G. K. Serhatkulu, A. Cao, A. K. Pandya, H. Dai, J. S. Thakur, V. M. Naik, R. Naik, M. D. Klein, G.W. Auner, R. Rabah, *Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model* *Biopolymers* **89**, 235-241 (2007).
46. P. R. Carey, *Raman spectroscopy, the sleeping giant in structural biology, awakes*, *J. Biol. Chem.* **274**, 26625-26628 (1999).
47. L. P. Choo-Smith, H. G. Edwards, H. P. Endtz, J. M. Kros, F. Heule, H. Barr, J. S. Jr. Robinson, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation*, *Biopolymers* **67**, 1-9 (2002).
48. J. R. Baena, B. Lendl, *Raman spectroscopy in chemical bioanalysis*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 534-539 (2004).
49. A. P. Esposito, C. E. Talley, T. Huser, C. W. Hollars, C. M. Schaldach, S. M. Lane, *Analysis of single bacterial spores by micro-Raman spectroscopy*, *Appl. Spectrosc.* **57**, 868-871 (2003).
50. N. S. Eikje, A. Aizawa, Y. Ozaki, *Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours*, *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 191-225 (2005).
51. A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12371-12376 (2005).
52. J. R. Mourant, K.W. Short, S. Carpenter, N. Kunapareddy, L. Coburn, T. M. Powers, J. P. Freyer, *Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy*, *J. Biomed. Opt.* **10**, 031106 (2005).
53. R. Malini, K. Venkatakrishna, J. Kurien, M. P. K, L. Rao, V. B. Kartha, C. M. Krishna, *Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study*, *Biopolymers* **81**, 179-193 (2005).
54. M. S. Ibelings, K. Maquelin, H. P. Endtz, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy*, *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 353-358 (2005).
55. C. Mello, D. Ribeiro, F. Novaes, R. J. Poppi, *Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis*, *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 701-706 (2005).
56. C. Medina-Gutiérrez, J. Luis Quintanar, C. Frausto-Reyes y R. Sato-Berrú, *The application of NIR Raman spectroscopy in the assessment of serum thyroid-stimulating hormone in rats*, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 87-91 (2005).



57. P. R. T. Jess, D. D. W. Smith, M. Mazilu, K. Dholokia, A. C. Riches y C. S. Herrington, *Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy*, *Int. J. Cancer* **121**, 2723-2728 (2007).
58. M. Moskovits, *Surface-enhanced spectroscopy*, *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783-826 (1985).
59. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Surface Enhanced Raman Scattering and Biophysics*, *J. Phys. Condens. Matter* **14**, R597-R624 (2002).
60. M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode*, *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163-166 (1974).
61. D. L. Jeanmaire, R. P. VanDuyne, *Surface raman spectro-electrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*, *J. Electroanal. Chem.* **84**, 1-20 (1977).
62. M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode*, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215-5217 (1977).
63. A. Champion, P. Kambhampati, *Surface Enhanced Raman Scattering*, *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241-250 (1998).
64. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman spectroscopy*, *Chem. Rev.* **99**, 2957-2975 (1999).
65. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, Acad. Press, Nueva York (1994).
66. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Detection and identification of a single DNA base molecule using Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)*, *Phys. Rev. E* **57**: R6281-R6284 (1998).
67. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Surface-enhanced Raman scattering can detect single molecules and probe "hot" vibrational transitions*, *J. Raman Spectroscopy* **29**, 743-747 (1998).
68. G. Breuzard, J. F. Angiboust, P. Jeannesson, M. Manfait, J. M. Millot, *Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 615-621 (2004).
69. I. S. Patel, W. R. Premarisi, D. T. Moir y L.D. Ziegler, *Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification*, *J. Raman Spectrosc.* **39**, 1660-1672 (2008).
70. A. Ashkin, *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4853-4860 (1997).
71. K. Svoboda and S. M. Block, *Biological Applications of Optical Forces*, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247-285 (1994).
72. K. Visscher, S. M. Block, *Versatile optical traps with feedback control*, *Methods Enzymol.* **298**, 460-489 (1998).
73. C. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li, *Near-infrared raman spectroscopy of single optically trapped biological cells*, *Opt. Lett.* **27**, 249-251 (2002).
74. K. Ramser, K. Logg, M. Goksoy, J. Enger, M. Kall, D. Hanstorp, *Résonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes*, *J. Biomed. Opt.* **9**, 593-600 (2004).
75. J. W. Chan, A. P. Esposito, C. E. Talley, C. W. Hollars, S. M. Lane, T. Huser, *Reagentless identification of single bacterial spores in aqueous solution by confocal laser tweezers Raman spectroscopy*, *Anal. Chem.* **76**, 599-603 (2004).
76. J. M. Sanderson, A. D. Ward, *Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers*, *Chem. Commun. (Camb)* **7**, 1120-1121 (2004).
77. R. Gessner, C. Winter, P. Rosch, M. Schmitt, R. Petry, W. Kiefer, M. Lankers, J. Popp, *Identification of biotic and abiotic particles by using a combination of optical tweezers and in situ Raman spectroscopy*, *Chemphyschem* **5**, 1159-1170 (2004).
78. M. D. Mannie, T. J. McConnell, C. Xie, Y. Q. Li, *Activation-dependent phases of T cells distinguished by use of optical tweezers and near-infrared Raman spectroscopy*, *J. Immunol. Methods* **297**, 53-60 (2005).
79. K. E. Hamden, B. A. Bryan, P. W. Ford, C. Xie, Y. Q. Li, S. M. Akula, *Spectroscopic analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infected cells by Raman tweezers*, *J. Virol. Methods* **145-151** (2005).
80. C. Xie, D. Chen, Y. Q. Li, *Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers*, *Opt. Lett.* **30**, 1800-1802 (2005).
81. C. Xie, J. Mace, M.A. Dinno, Y. Q. Li, W. Tang, R. J. Newton, P. J. Gemperline, *Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy*, *Anal. Chem.* **77**, 4390-4397 (2005).
82. G. Turrell and J. Corset, editores, *Raman Microscopy. Developments and Applications*, Academic Press, Londres (1996).
83. Y. Courtois, W. Guschlnbauer y P. Fromageot, *Interactions entre pigments et acides nucléiques 6. Etude de l'interaction de l'actinomycine avec le DNA par dispersion optique rotatoire*, *European J. Biochem.* **6**, 106-113 (1968).

84. J. A. Gordon, *Optical Rotatory Dispersion Studies of Globular Proteins, Including  $\alpha$ -Chymotrypsin I. Effect of concentration*, *J. Biol. Chem.* **243**, 4615-4625 (1968).
85. N. Greenfield, G. D. Fasman, *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*, *Biochemistry* **8**, 4108-4116 (1969).
86. D. S. Jois, K. R. Easwaran, M. Bednarek, E. R. Blout, *Conformational and ion binding properties of a cyclic octapeptide, cyclo (Ala-Leu-Pro-Gly)<sub>2</sub>*, *Biopolymers* **32**, 993-1001 (1992).
87. H. Lamthanh, M. Leonetti, E. Navedryk, A. Menez, *CD and FTIR studies of an immunogenic disulphide cyclized octadecapeptide, a fragment of a snake curaremimetic toxin*, *Biochem. Biophys. Acta* **1203**, 191-198 (1993).
88. K. Burgess, D. Lim, S.A. Mousa, *Synthesis and solution conformation of cyclo (RGDRGD): a cyclic peptide with selectivity for the alpha V beta 3 receptor*, *J. Med. Chem.* **39**, 4520-4526 (1996).
89. M. Dong, L. Ladavière, F. Penin, G. Deleage, L. G. Baggetto, *Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis*, *Biochem. Biophys. Acta* **1371**, 317-334 (1998).
90. D. S. Moore, T. E. Wagner, *Double-helical DNA and RNA circular dichroism. Calculations on base-sugar-phosphate helix interactions*, *Biopolymers* **13**, 977-986 (1974).
91. D. L. Ross and J. R. Marrack, *The Optical Rotatory Dispersion of Antigen-Antibody Complexes*, *Immunology* **23**, 375-394 (1972).
92. M. Kipping, T. Zarnt, S. Kiessig, U. Reimer, G. Fischer y P. Bayer, *Increased backbone flexibility in threonine45-phosphorylated hirudin upon pH change*, *Biochemistry* **40**, 7957-7963 (2001).
93. G. N. Ramachandran and V. Sasisekharan, *Conformation of polypeptides and proteins*, *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-438 (1968).
94. S. E. Lietzke, C. L. Barnes, C. E. Kundrot, *Crystallisation and structure determination of RNA*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 645-649 (1995).
95. T. N. Bhat, G. A. Bentley, G. Boulot, M. I. Greene, D. Tello, W. Dall'Acqua, H. Souchon, F. P. Schwarz, R. A. Mariuzza and R. J. Poljak, *Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1089-1093 (1994).
96. C. A. Bottoms, J. P. Schuermann, S. Agah, M. T. Henzl y J. J. Tanner, *Crystal structure of rat  $\alpha$ -parvalbumin at 1.05 Å resolution*, *Protein Sci.* **13**, 1724-1734 (2004).
97. <http://www.rscb.org/>
98. J. Zaccai, *Les molécules passés au crible des neutrons*, *Biofutur* **102**, 37-42 (1991).
99. A. Guinier, G. Fournet, *Small angle scattering of X-rays*, John Wiley, Nueva York (1955).
100. M. Picquart, D. Valdez, H. Vázquez, W. Urbach y M. Waks, *Bound and free water in surfactant micelles and lipid vesicles*, in *Materials Science and Applied Physics*, 2<sup>nd</sup> Mexican Meeting on Mathematical and Experimental Physics, J. L. Hernández-Pozos, R. Olayo-González, editores, *AIP Conference Proceedings* **759**, 103-110 (2005).
101. B. J. Lemaire, P. Panine, J. C. P. Gabriel y P. Davidson, *The measurement by SAXS of the nematic order parameter of laponite gels*, *Europhys. Lett.* **59**, 55-61 (2002).
102. C. Neylon, *Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature*, *Eur. Biophys. J.* **37**, 531-541 (2008).
103. C. G. Shull, E.O. Wollan, *The diffraction of neutrons by crystalline powders*, *Meeting of the American Physical Society*, Washington D. C. (1947).
104. G. E. Bacon, *Neutron diffraction*, Clarendon Press, Oxford (1975).
105. K. Sköld and D. L. Price, editores, *Neutron Scattering in Methods of Experimental Physics, vol. 23, Parts A, B and C*, Academic Press, Orlando; parte A (1986), partes B y C (1987).
106. J. Schweizer, *Que peut-on voir avec des neutrons? Une introduction pour des non spécialistes*, *J. Phys. IV* **130**, 3-35 (2005).
107. A. A. Kossiakof, *The application of neutron crystallography to the study of dynamic and hydration properties of proteins*, *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1195-1227 (1985).
108. H. Savage, *Water structure in crystalline solids: Ices to proteins*, *Water Sci. Rev.* **2**, 67-148 (1986).
109. H. Savage y A. Wlodawer, *Determination of water structure around biomolecules using X-ray and neutron diffraction methods*, *Methods Enzymol.* **127**, 162-183 (1986).
110. W. Saenger, *Structure and dynamics of water surrounding biomolecules*, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **16**, 93-114 (1987).
111. M. C. Bellissent-Funel, J. Teixeira, K. F. Bradley y S. H. Chen, *Dynamics of hydration water in protein*, *J. Phys. I* **2**, 995-1001 (1992).

112. M. C. Bellissent-Funel, J. Lal, K. F. Bradley y S. H. Chen, *Neutron structure factors of in-vivo deuterated amorphous protein c-phycoyanin*, *Biophys. J.* **64**, 1542-1549 (1993).
113. M. C. Bellissent-Funel, J. M. Zanotti y S. H. Chen, *Slow dynamics of water molecules on surface of a globular protein*, *Faraday Disc.* **103**, 281-294 (2006).
114. D. Lairez y J. Pelta, *Diffusion de neutrons aux petits angles : application à l'étude des macromolécules biologiques en solution*, *J. Phys. IV* **130**, 39-62 (2005).
115. J. P. Cotton, *Variations on contrast in sans: determination of self and distinct correlation functions*, *Adv. Colloid Interf. Sci.* **69**, 1-29 (1996).
116. J. P. Cotton, *Diffusion de neutrons aux petits angles*, *J. Phys. IV* **9**, 21-49 (1999).
117. C. Loupiac, M. Bonetti, S. Pin y P. Calmettes, *High-pressure effects on horse heart metmyoglobin studied by small-angle neutron scattering*, *Eur. J. Biochem.* **269**, 4731-4737 (2002).
118. M. S. Capel, D.M. Engelman, B. R. Freeborn, M. Kjeldgaard, J. A. Langer, V. Ramakrishnan, D. G. Schindler, D. K. Schneider, B. P. Schoenborn, I. Y. Sillers, S. Yabuki y P. B. Moore, *A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of Escherichia coli*, *Science* **238**, 1403-1406 (1987).
119. M. Hammermann, N. Brun, K. V. Klenin, R. May, K. Tóth y J. Langoeski, *Salt-dependent DNA superhelix diameter studied by small-angle neutron scattering measurements and Monte-Carlo simulations*, *Biophys. J.* **75**, 3057-3063 (1998).
120. J. Pelta, H. Berry, G.C. Falda, E. Pauthe y D. Lairez, *Statistical conformation of human plasma fibronectin*, *Biochemistry* **39**, 5146-5154 (2000).
121. T. V. Budkevich, A. A. Timochenko, E. I. Tiktopulo, B. S. Negrutskii, V. F. Shalak, Z. M. Petrushenko, V. L. Aksenov, R. Willumeit, J. Kohlbrecher, N. Serdyuk y A.V. El'skaya, *Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1 a in solution*, *Biochemistry* **41**, 15342-15349 (2002).
122. S. Krueger, S. K. Gregurick, J. Zondlo y E. Eisenstein, *Interaction of Groel and Groel/Groes complexes with a nonnative subtilisin variant: a small-angle neutron scattering study*, *J. Struct. Biol.* **141**, 240-258 (2003).
123. D. Marion, *Résonance magnétique nucléaire et modélisation: les macromolécules biologiques*, *Biofutur* **38**, 12-16 (1990).
124. G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Structure of larger proteins in solutions: the three-and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy*, *Science* **252**, 1390-1399 (1991).
125. J. M. Bonmatin, M. Genest, H. Labbé, M. Ptak, *Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by <sup>1</sup>H-NMR, distance geometry and molecular dynamics*, *Biopolymers* **34**, 975-986 (1994).
126. M. Nilges, *Structure calculation from NMR data*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 617-623 (1996).
127. L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax, *Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to Staphylococcal nuclease*, *Biochemistry* **28**, 8972-8979 (1989).
128. C. A. Lepre, J. W. Cheng, J. M. Moore, *Dynamics of a receptor-bound ligand by heteronuclear NMR: FK506 bound to FKBP-12*, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4929-4930 (1993).
129. V. P. Kutysenko, M. Cortijo, *Water-protein interactions in the molten-globule of carbonic anhydrase b: An NMR spin-diffusion study*, *Protein Sci.* **9**, 1540-1547 (2000).
130. J. Yon-Khan, *Evolution des concepts sur le repliement des protéines*, *Ecole IMABIO, Structure-Fontion des Protéines. Règles et Prédications* **8**, 35-47 (1993).
131. A. R. Fersht, *Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase*, *FEBS Letters* **325**, 5-16 (1993).
132. P. Schanda, V. Forge, B. Brutscher, *Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**, 11257-11262 (2007).
133. R. Cammack, *ESR/EPR spectroscopy*, en *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 338-342, J. Kendrew, E. Lawrence, editores, Blackwell Science, Oxford (1994).

**AÑO DE LOS CENTENARIOS**

**1810**

**1910**

Este libro se terminó de imprimir y encuadernar el 30 de noviembre de 2010 en los talleres de Editorial Cromocolor, S. A. de C. V., Miravalle 703 Col. Portales, C. P. 03300, México, D. F. La edición consta de 1000 ejemplares. La composición estuvo a cargo de Aline y Cristina Ortiz-Herrera.

**Editor: Carlos Francisco Zúñiga**