



Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d'arribada limitada d'oxigen

Santiago Esteva i Gras

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**RESPOSTES ADAPTATIVES SANGUÍNIES I
MUSCULARS EN CONDICIONS D'ARRIBADA
LIMITADA D'OXIGEN.**

Tesi Doctoral

Santiago Esteva i Gras

8. Annexos

“Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d’arribada limitada d’oxigen”

Annex 1: Documentació acreditativa del procediment d'experimentació animal.

Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de
la Generalitat de Catalunya.
Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la
Universitat de Barcelona.

Annex 2: El reòmetre.

Què es un reòmetre?

La paraula reòmetre prové del grec i significa “aparell per a mesurar el flux”. És un instrument usat per mesurar la manera com un líquid, suspensió o composició aquosa flueix quan se li apliquen una sèrie de forces externes. S'utilitza per a estudiar els fluids que no poden ser definits amb un únic i estable valor de viscositat i, per tant, necessiten més paràmetres per ser caracteritzats i avaluats. Aquests aparells mesuren la reologia del fluid.

Per altra banda, un viscosímetre (denominat també viscosímetre), és un instrument que mesurar la viscositat d'un fluid. No obstant, és impossible utilitzar-los amb precisió en la determinació de la viscositat dels fluids no-newtonians. Això és un inconvenient ja que la majoria de líquids interessants, des de un punt de vista biològic, tendeixen a comportar-se com a fluids no-newtonians. Per tant, en aquest treball utilitzarem el reòmetre per mesurar la viscositat dels fluids ja que aquesta viscositat estarà sotmesa a diferents condicions de flux.

Fou Isaac Newton qui primer suggerí una fórmula per mesurar la viscositat dels fluids i qui postulà que aquesta força corresponia al producte de l'àrea superficial del líquid pel gradient de velocitat. El 1884, Poiseuille va millorar la tècnica estudiant el moviment de líquids en tubs.

Funcionament del viscosímetre rotacional tipus Con-Placa (Brookfield Engineering Laboratories) usat en el laboratori.

Els viscosímetres de rotació es basen en la idea que la força requerida per a rotar un objecte immers en un fluid i a una velocitat coneguda, pot indicar la viscositat d'aquest fluid. Els viscosímetres de rotació més comuns i més àmpliament usats són els de tipus Brookfield (www.brookfieldengineering.com).

El funcionament del viscosímetre rotacional tipus Con-Placa, consisteix en la rotació d'un con pla sobre una superfície plana (placa) a diferents gradients

de velocitat (*shear-rate*). Aquest aparell, connectat a un bany termostatat que permet reproduir la temperatura en la qual es troba el fluid en condicions *in vivo*, està format per un eix vertical del qual queda suspès el con (Vegi's Fig. 20 i 21). Una petita mostra del fluid se situa en el receptacle entre el con i la placa (Vegi's Fig. 22), la qual ofereix una resistència a la rotació del con i desenvolupa un valor de *torque* (parell de torsió) condicionat per la tensió tangencial (*shear-stress*) en el fluid. Coneixent les constants geomètriques del con i observant la taxa de rotació i el parell de torsió, es poden determinar la tensió tangencial i el gradient de velocitat del líquid de forma separada. Canviant el nombre de revolucions per minut i, per tant, el gradient de velocitat, poden obtenir-se una sèrie de valors de tensió tangencial. Representant aquests valors obtinguts un enfront de l'altre, les característiques reològiques del fluid poden definir-se directament en un diagrama denominat "reograma" en termes de *shear-stress* i *shear-rate*. Altres models de reogrames poden representar els valors de viscositat (*shear-stress/shear-rate*) enfront de *shear-stress* o de *shear-rate*. Les diferents categories de classificació de la viscositat de fluids no-newtonians, es basen en la representació de la relació entre la viscositat i el gradient de velocitat.



Fig. 20. Reòmetre amb bany termostatat programat a una temperatura de 38°C, temperatura corporal dels animals experimentals.



Fig. 21. Reòmetre rotacional tipus Con-Placa.



Fig. 22. Receptacle per a la mostra de fluid a analitzar.

Ja d'una forma més específica, el model de reòmetre utilitzat en el nostre laboratori és un Brookfield DV-III+ programable adaptat a fluids biològics de baixa viscositat i amb un valor màxim de 673 dines·cm de parell de torsió al ressort. Aquest aparell és capaç de mesurar diferents paràmetres reològics dels fluids, tal com la tensió tangencial i viscositat, quan apliquem diferents gradients de velocitat. El principi operatiu del DV-III+ consisteix en la fricció viscosa del fluid contra el con, la qual és mesurada per la deflació del ressort. La deflació del ressort, a la vegada, és mesurada per un transductor rotacional. El rang de mesura del DV-III+ (en centipoises) és determinat per la velocitat rotacional del con, la talla i mida d'aquest, el receptacle en el qual el con gira, i l'escala del parell de torsió del ressort calibrat.

Totes les unitats de cadascun dels paràmetres obtinguts del viscosímetre són les següents:

Paràmetre	CGS	SI
Viscositat	cP	mPa·s
Shear-Stress	Dines/cm ²	N/m ²
Shear-Rate	1/sec	1/sec
Torque	Dines·cm (%)	N·m (%)

Les unitats equivalents de mesura en el SI estan calculades usant les següents conversions:

Viscositat: 1 mPa·s (SI) = 1 cP (CGS)

Shear-Stress: 1 Newton/m² (SI) = 10 dines/cm² (CGS)

Torque. 1 N·m (SI) = 10⁷ dines·cm (CGS)

En aquest estudi, totes les referències estaran donades en unitats CGS.

Rheocalc software:

El programa *Rheocalc* de *Brookfield Engineering* (Vegi's Fig. 23 i 24), ens permet automatitzar l'anàlisi de la mostra amb una màxima precisió. És un programa que ens dóna l'opció de dirigir i controlar el reòmetre des de l'ordinador. Els gradients de velocitat utilitzats per mesurar de la viscositat sanguínia foren (en r.p.m): 0'3, 0'6, 1'5, 3, 6, 12, 30, 60. Per a la viscositat del plasma, al tractar-se d'un líquid newtonià, sotmetérem la mostra a un únic gradient de velocitat: 60 r.p.m.

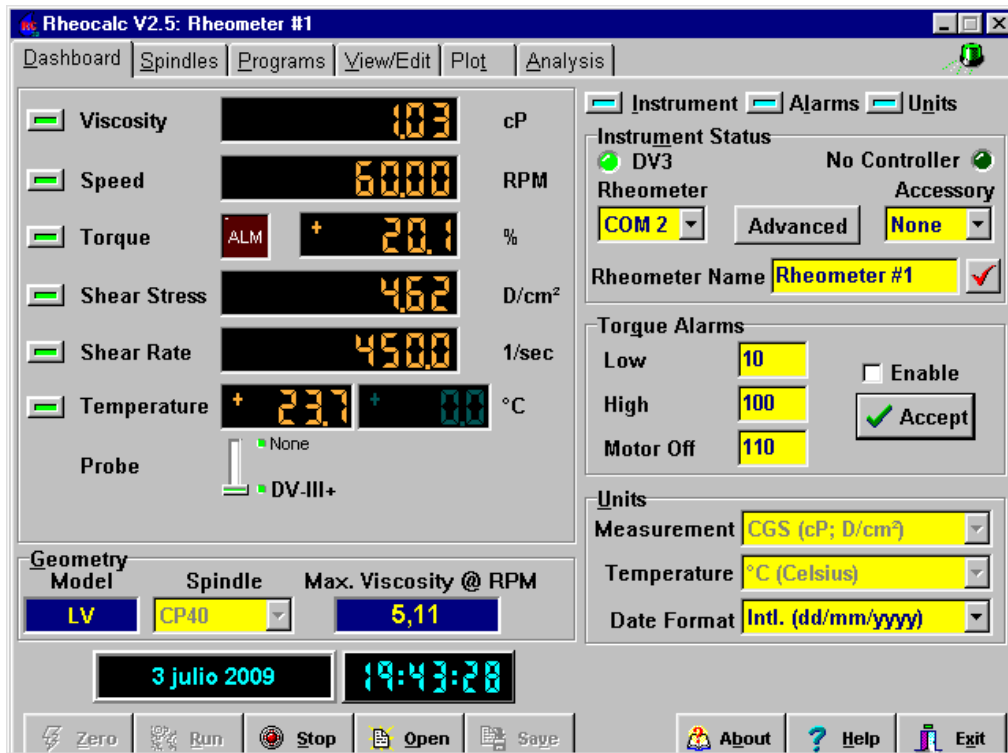
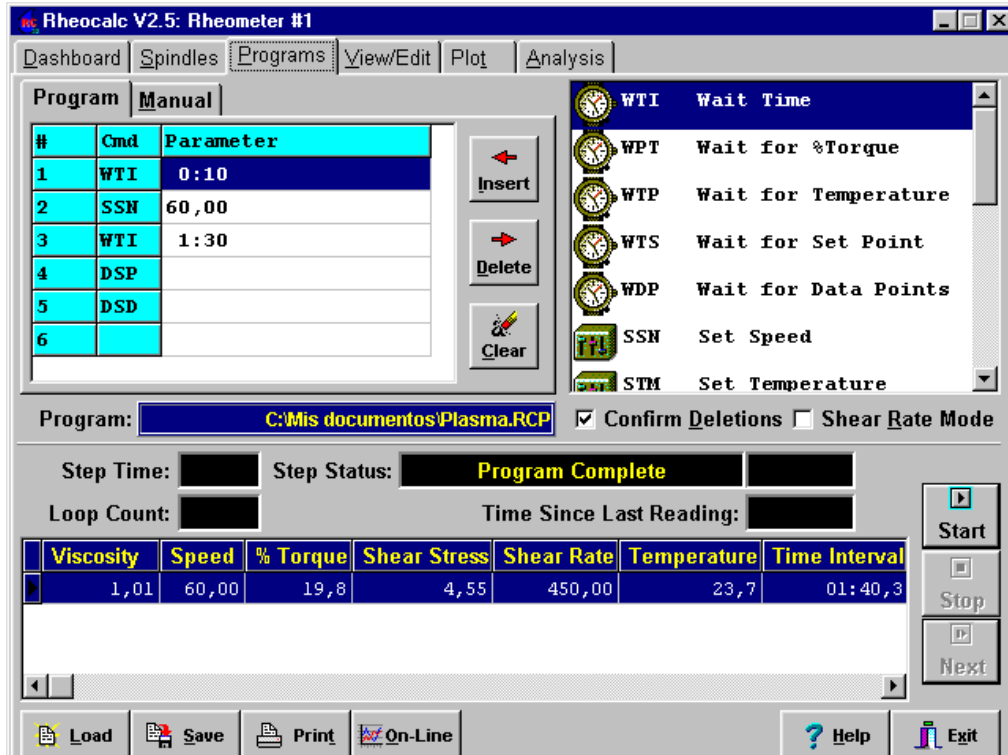


Fig. 23 i 24. Pantalles de comandament del software Rheocalc.

Annex 3: Model de Casson.

Model de Casson

La representació gràfica de l'equació de Casson de les mostres de sang obtingudes, és un model que ens permetrà visualitzar i contrastar el comportament reològic d'aquestes com una recta, i per tant, d'una manera més còmoda (Casson, 1957; Casson 1959) (Vegi's Fig. 25). Aquest tipus de gràfic presenta la relació entre les arrels quadrades de la tensió tangencial $\tau^{1/2}$ i del gradient de velocitat $\dot{\gamma}^{1/2}$ amb l'objectiu de comparar els valors obtinguts d'acord amb l'equació de Casson ($\tau^{1/2} = \eta_c^{1/2} \cdot \dot{\gamma}^{1/2} + \tau_0^{1/2}$) (Merrill et al., 1963; Schmid-Schoenbein et al., 1969; Jain, 1988). Aquesta representació ens permetrà identificar el pendent (η_c , viscositat de Casson en cP) i la tensió tangencial crítica o llindar de fluïdesa (τ_0 , dines/cm²). El llindar de fluïdesa suposa l'esforç teòric necessari perquè la mostra comenci a fluir i s'extrapolerà del tram recte. Malgrat que en el nostre estudi serà un concepte teòric ja que la sang *in vivo* flueix de forma permanent, aquest model ens permetrà una comparació més fàcil entre les quatre condicions experimentals (Scott Blair, 1966). Un exemple on s'aprecia clarament aquest criteri, són els dispensadors de ketchup que trobem en molts restaurants de menjar ràpid. En aquest cas, el que es mesura és el treball que hauríem d'emprar per fer moure el ketchup al llarg de tota la columna fins que sortís per l'orifici dosificador.

Aquesta representació gràfica de l'Equació de Casson és una de les més utilitzades d'entre tots els possibles mètodes de representació del comportament reològic d'un fluid. Ofereix una representació matemàtica reològica mitjançant una línia recta i, per tant, molt més fàcil d'interpretar i comparar que els reogrames de τ enfront $\dot{\gamma}$ (on el llindar de fluïdesa és complicat de trobar), η enfront $\dot{\gamma}$ (la viscositat surt de la gràfica vers l'infinit a un gradient de velocitat 0) o η enfront τ (l'extrapolació del llindar de fluïdesa a un valor de viscositat recíproc de zero és irreal i carent de significació

fisiològica, donat que la sang mai deixa de fluir en condicions normals) (Merrill et al., 1963). Tot i el seu freqüent ús en aplicacions industrials, en els fluids biològics la relació deixa de ser lineal a valors molt baixos de gradient de velocitat i la corba passa per l'origen de coordenades.

Aquest model matemàtic també permet calcular el coeficient de correlació (r) entre les dues variables, com en qualsevol altra relació lineal. Així doncs, podem obtenir-lo per cada una de les rectes de Casson.

Resultats:

L'interès que ofereix aplicar aquest model en el nostre estudi, malgrat que la sang a valors molt baixos de gradient de velocitat no s'hi ajusta, és el càlcul de η_c i τ_0 per tal de contrastar el comportament hemoreològic entre els quatre grups experimentals. El què és important en aquesta gràfica, és el fet d'identificar el teòric lliandar de fluïdesa per a cada una de les quatre rectes obtingudes. El lliandar de fluïdesa indica el punt en el qual cada recta talla amb l'eix d'ordenades (tensió tangencial). Quan el tall es produeix en un valor alt d'aquest eix, més difícil serà posar en moviment el fluid en repòs. Com ja hem comentat anteriorment, en el nostre estudi serà un concepte teòric.

Tal com s'observa a la Fig. 25, apreciem només diferències significatives ($p > 0,01$) quan els grups H són comparats amb la resta a un alt gradient de velocitat ($\dot{\gamma} = 225s^{-1}$). A gradients baixos de velocitat, tot i que la recta corresponent a aquest grup H també es presenta separada de les altres, no es mostren diferències significatives. Pel que fa al grup P20, a baixos gradients de velocitat, presenta un comportament més aviat similar al grup H mentre que, a alts gradients, presenta més similituds amb els grups C i P40. Per tant, podem deduir que, a elevats gradients de velocitat, la deformabilitat eritrocitària en aquests animals fa que la sang es comporti d'una manera similar al grup C i al grup P40. Aquest fenomen es pot justificar donat que els eritròcits més envellits i menys deformables són retinguts al sistema llacunar

del parènquima de la melsa i d'aquesta manera desapareixen ràpidament del torrent sanguini.

Pel que fa als resultats obtinguts en η_c , τ_0 i r (Vegi's requadre Fig. 25) no observem diferències significatives quan els quatre grups son comparats entre sí (tot i que una lleu tendència a l'alça és observada en el valors η_c del grup H). És destacable l'alt nivell de correlació en les equacions del model Casson.

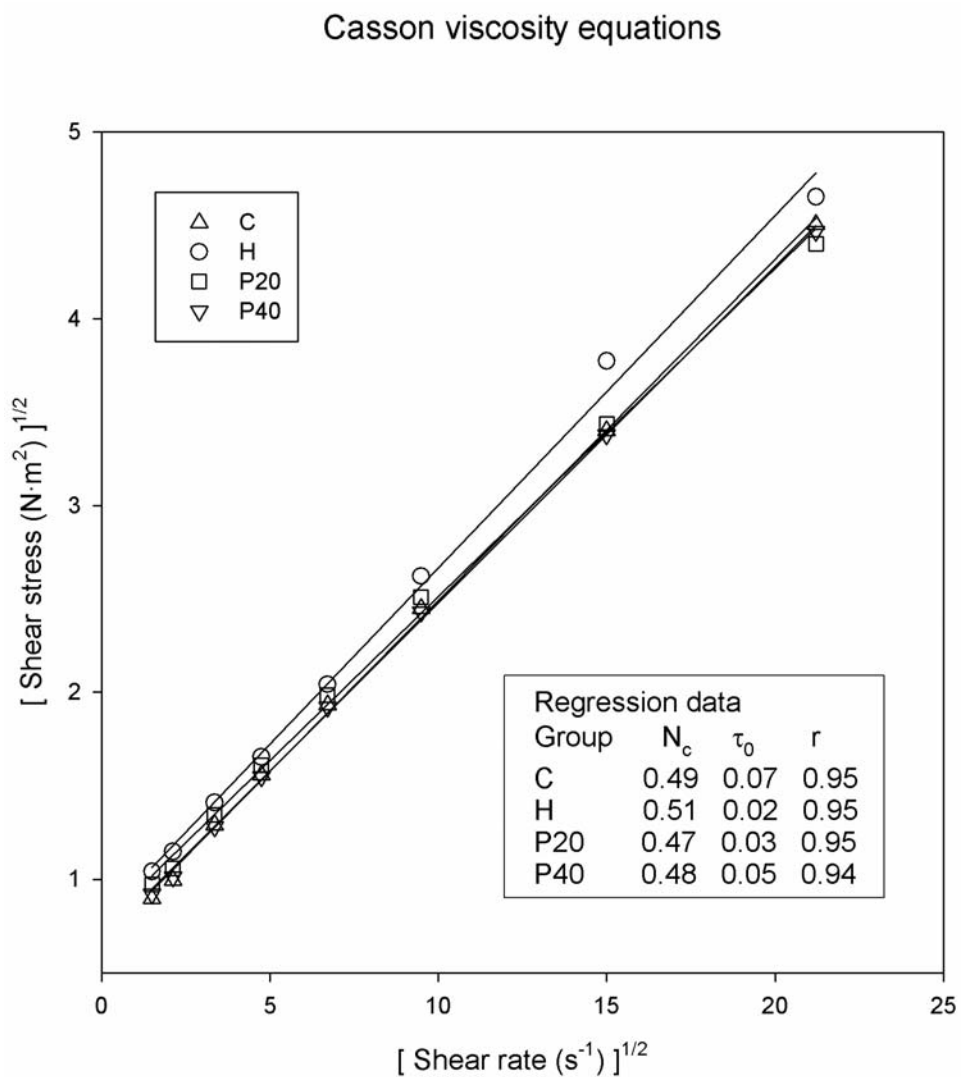


Fig. 25. Representació de les rectes de Casson.